

# NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘC TỔ RICIN TRONG MỘT SỐ MẪU THỰC PHẨM VÀ ĐỒ UỐNG BẰNG KỸ THUẬT ELISA

Lê Minh Quý<sup>1</sup>, Lê Thị Bích Trâm<sup>1\*</sup>  
Bùi Liêm Chính<sup>1</sup>, Hoàng Thế Yên<sup>1</sup>, Trần Minh Trí<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Xây dựng quy trình xác định độc tố ricin trong một số mẫu thực phẩm, đồ uống bằng kỹ thuật ELISA tại Viện Khoa học và Công nghệ (Bộ Công an).

**Phương pháp:** Nghiên cứu thực nghiệm.

**Kết quả:** Xây dựng thành công quy trình xác định độc tố ricin bằng kỹ thuật ELISA trong một số mẫu thực phẩm, đồ uống (bột mì, sữa bột, sữa tươi, nước sinh hoạt), sử dụng bộ KIT phát hiện độc tố ricin (hãng Tetraco - Hoa Kỳ). Phương trình đường chuẩn xây dựng được là  $y = 0,5129\ln(x) + 0,0815$  với giá trị  $R^2 = 0,9461$ . Giá trị thu được COV là 0,276; tương đương với giá trị nồng độ 1,7 ng/ml. Thời gian thực hiện quy trình trong vòng 24 giờ, tính từ khâu xử lý mẫu. Quy trình sử dụng phương pháp ELISA sandwich có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, phù hợp với điều kiện trang thiết bị, cơ sở vật chất sẵn có tại Viện Khoa học và Công nghệ (Bộ Công an).

**Từ khóa:** Ricin, ELISA, độc tố, thực phẩm, đồ uống.

## ABSTRACT

**Objectives:** Develop a process to determine ricin toxin in some food and beverage samples by ELISA technique at the Institute of Science and Technology - Ministry of Public Security.

**Methods:** Experimental study.

**Results:** Successfully built a process to detect ricin toxin by ELISA technique in some food and beverage samples (wheat flour, powdered milk, fresh milk, domestic water) using the ricin ELISA KIT (Tetraco - USA). The built-in standard curve equation is  $y = 0,5129\ln(x) + 0,0815$  with the value  $R^2 = 0.9461$ . The cut of value (COV) is 0.276 equivalent to ricin concentration of 1.7ng/ml. The process takes about 24 hours, including sample processing step. The procedure using the sandwich ELISA method has high sensitivity and specificity and is suitable for the conditions of equipment and facilities available at the Institute of Science and Technology (Ministry of Public Security).

**Keywords:** Ricin detection, ELISA, toxin, food, bevarage.

Chịu trách nhiệm nội dung: Lê Thị Bích Trâm, Email: lebichtram94@gmail.com

Ngày nhận bài: 27/02/2023; mời phản biện khoa học: 3/2023; chấp nhận đăng: 14/4/2023.

<sup>1</sup> Viện Khoa học và Công nghệ, Bộ Công an.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ricin là một loại protein có nguồn gốc từ hạt cây Thầu dầu (*Ricinus communis* L.); có độc tính mạnh và tương đối dễ tiếp cận. Theo Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ, ricin được phân nhóm là tác nhân khủng bố sinh học loại B. Chất độc ricin có tính chất không màu, không mùi, không vị, có liều gây chết rất thấp và hiện chưa có thuốc giải độc đặc hiệu. Do đó, đây là một tác nhân sinh học tiềm tàng, có thể gây nguy hiểm cho con người khi được sử dụng trong khủng bố hoặc chiến tranh sinh học. Việc xây dựng các quy trình phát hiện độc tố sinh học, trong đó có ricin là nhiệm vụ hết sức cần thiết, đáp ứng yêu cầu công tác theo

chức năng nhiệm vụ được giao của Viện Khoa học và Công nghệ (Bộ Công an).

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi triển khai nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình xác định độc tố ricin trong một số mẫu thực phẩm và đồ uống bằng kỹ thuật ELISA.

## 2. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, nguyên liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu:

+ Mẫu chuẩn độc tố ricin - Viện Hóa học môi trường Quân sự cung cấp; được pha loãng ở các nồng độ khác nhau từ 0,488-500 ng/ml.

+ Một số loại mẫu thực phẩm, đồ uống, như mẫu bột mì, sữa bột, sữa tươi, nước sinh hoạt...

- Nguyên liệu nghiên cứu:

+ Kit phát hiện độc tố ricin: Ricin ELISA KIT (Non-Coated, hãng Tetraco, Hoa Kỳ).

+ Test nhanh Environic (Hoa Kỳ).

+ PBS 1X, Tween 20, nước deion...

+ Màng lọc 0,25µm (Millipore).

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

- Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu thực nghiệm, xây dựng quy trình xác định độc tố ricin.

- Chuẩn bị mẫu nghiên cứu:

+ Mẫu chuẩn: pha mẫu chuẩn dạng dung dịch gốc, nồng độ 1.000 ng/ml. Sau đó, pha loãng mẫu ở các nồng độ khác nhau theo hướng dẫn sử dụng của bộ KIT (500 ng/ml; 250 ng/ml; 125 ng/ml; 62,5 ng/ml; 31,3 ng/ml; 15,6 ng/ml; 7,8 ng/ml; 3,9 ng/ml; 1,95 ng/ml; 0,975 ng/ml; 0,488 ng/ml).

+ Mẫu thử (giả định), gồm mẫu bột mì: lấy 500 µl dung dịch ricin nồng độ 1.000 ng/ml bổ sung vào 0,5 g bột mì; mẫu sữa bột: lấy 500 µl dung dịch ricin nồng độ 1.000 ng/ml bổ sung vào 0,5 g sữa bột trẻ em. Bổ sung đệm ELISA coating buffer cho đủ tổng thể tích là 5 ml với cả hai mẫu trên và trộn đều bằng máy voltex. Mẫu sữa tươi: lấy 500 µl dung dịch ricin nồng độ 1.000 ng/ml bổ sung vào 4,5 ml sữa tươi tiệt trùng, trộn đều bằng máy voltex. Mẫu nước sinh hoạt: lấy 500 µl dung dịch ricin nồng độ 1.000 ng/ml bổ sung vào 4,5 ml nước sinh hoạt, trộn đều bằng máy voltex. Sau khi trộn đều, các mẫu được lọc qua màng lọc 0,25 µm. Pha loãng dịch lọc thu được (có nồng độ ricin ban đầu 100 ng/ml) trong đệm PBS 1X để tạo các nồng độ khác nhau theo dải nồng độ từ 50-0,04875 ng/ml, cụ thể như sau:

Độ pha loãng (V/V)	Nồng độ (ng/ml)
1/2	50
1/4	25
1/8	12,5
1/16	6,25
1/32	3,125
1/64	1,56
1/128	0,78
1/256	0,39
1/512	0,195
1/1.024	0,0975
1/2.048	0,04875

- Các bước thực hiện kỹ thuật ELISA phát hiện độc tố ricin: tiến hành theo hướng dẫn sử dụng KIT phát hiện độc tố ricin (hãng Tetraco, Hoa Kỳ). Giá trị ngưỡng (COV, cut-off value) theo khuyến cáo của nhà sản xuất được tính theo công thức:

$$COV = NC + 0,15$$

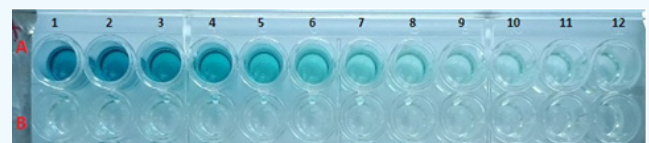
(NC là giá trị trung bình độ lệch chuẩn của 3 mẫu chứng âm - không có kháng nguyên).

- Thiết bị nghiên cứu: hệ thống máy ELISA của hãng Biotek; máy voltex, ly tâm, tủ mát, lọ thủy tinh, micropipette và các dụng cụ cần thiết khác.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN**

**3.1. Kết quả xây dựng đường chuẩn**

Đường chuẩn được tiến hành xây dựng theo các sơ đồ bố trí thí nghiệm và trình tự các bước của kỹ thuật ELISA (theo hướng dẫn sử dụng của bộ KIT). Mẫu chuẩn được pha loãng thành dải nồng độ khác nhau từ 0,488-500 ng/ml để sử dụng cho xây dựng đường chuẩn. Quá trình thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả ELISA trên đĩa 96 giếng (thể hiện ở hình 1):

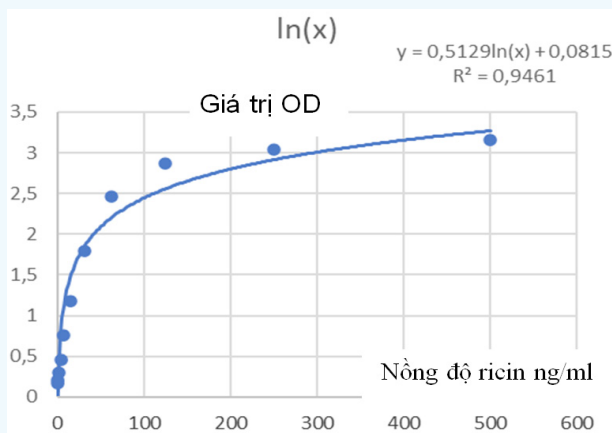


Hình 1. Kết quả ELISA trong thí nghiệm xây dựng đường chuẩn.

Giếng A (A1 đến A12) được phủ kháng thể kháng ricin (positive capture antibody) nồng độ 10 µg/ml. Nồng độ mẫu chuẩn ricin từ A1 đến A11 tương ứng là 500 ng; 250 ng; 125 ng; 62,5 ng; 31,3 ng; 15,6 ng; 7,8 ng; 3,9 ng; 1,95 ng; 0,975 ng; 0,488 ng/ml nồng độ pha. Giếng A12: đối chứng âm (không có ricin). Giếng B (B1 đến B12) được phủ kháng thể thông thường, không kháng ricin (negative capture antibody) nồng độ 10 µg/ml. Nồng độ mẫu chuẩn ricin từ B1 đến B11 tương ứng là 500 ng; 250 ng; 125 ng; 62,5ng; 31,3 ng; 15,6 ng; 7,8 ng; 3,9 ng; 1,95 ng; 0,975 ng; 0,488 ng/ml nồng độ pha. Giếng B12: đối chứng âm (không có ricin).

Kết quả ELISA (quan sát bằng mắt thường) cho thấy, cường độ màu xanh giảm dần từ giếng A1-A11, tương ứng với nồng độ chất chuẩn giảm dần. Giếng B1-B12 màu xanh không xuất hiện, điều này đúng với sơ đồ bố trí thí nghiệm, bởi giếng B1-B12 được phủ bởi kháng thể âm tính không bắt giữ ricin.

- Hình ảnh hiện màu trên đĩa ELISA được đọc trên máy 800 TS Microplate reader, giá trị OD trung bình của 3 lần thử nghiệm được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Kết quả trên đồ thị (hình 2):



Hình 2. Biểu đồ đường chuẩn ELISA.

Phương trình đường chuẩn được xác định là hàm số:  $y = 0,5129\ln(x) + 0,0815$  với giá trị  $R^2 = 0,9461$ . Giá trị  $R^2$  tiến sát đến giá trị 1, cho thấy phương trình được xác lập trên là tin cậy.

### 3.2. Thử nghiệm trên mẫu giả định

Qua tham khảo tài liệu và các thông tin về tình hình thực tế, việc đầu độc bằng ricin có thể được tiến hành qua các nguồn nước, thực phẩm [6]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo 4 loại mẫu giả định có chứa ricin, bao gồm mẫu nước sinh hoạt, mẫu sữa tươi, mẫu sữa bột và mẫu bột mì. Quá trình chuẩn bị và phân tích được lặp lại 3 lần. Các mẫu giả định sau khi chuẩn bị xong được kiểm tra bằng việc sử dụng các test thử nhanh phát hiện ricin (hãng Environic - Hoa Kỳ) tại nồng độ ban đầu 100 ng/ml. Các mẫu đều cho kết quả dương tính với độc tố ricin trên test nhanh. Các mẫu này được tiếp tục pha loãng và thử nghiệm xác định ricin bằng bộ KIT ELISA (Tetracore - Hoa Kỳ). Quá trình thực hiện theo các sơ đồ bố trí thí nghiệm và trình tự các bước kĩ thuật ELISA theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

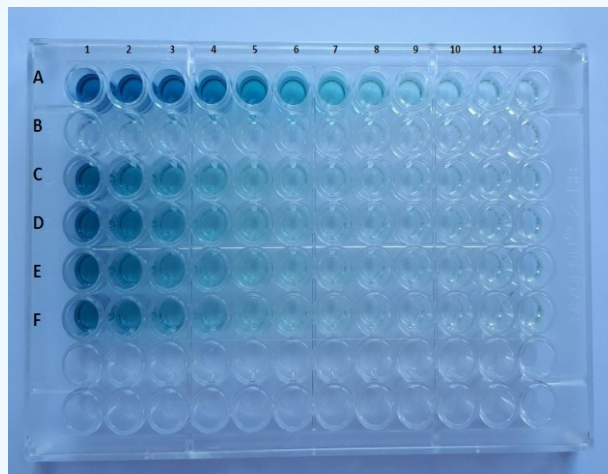
- Kết quả thử nghiệm ELISA xác định ricin trong các mẫu giả định (hình 3):

+ Giếng hàng A (A1-A12): phủ kháng thể kháng ricin, nồng độ 10 µg/ml. Nồng độ mẫu chuẩn ricin từ A1-A11 tương ứng là 500 ng; 250 ng; 125 ng; 62,5ng; 31,3 ng; 15,6 ng; 7,8 ng; 3,9 ng; 1,95 ng; 0,975 ng; 0,488 ng/ml nồng độ pha. Giếng A12: đối chứng âm (không có ricin).

+ Giếng hàng B (B1-B12): phủ kháng thể thông thường, không kháng ricin, nồng độ 10 µg/ml. Nồng độ mẫu chuẩn ricin từ B1-B11 tương ứng là 500 ng; 250 ng; 125 ng; 62,5ng; 31,3 ng; 15,6 ng; 7,8 ng; 3,9 ng; 1,95 ng; 0,975 ng; 0,488 ng/ml nồng độ pha. Giếng B12: đối chứng âm (không có ricin).

+ Các giếng hàng C, D, E, F: tương ứng với mẫu nước sạch, mẫu sữa tươi, mẫu sữa bột, mẫu bột mì có ricin với các nồng độ pha loãng giảm dần

từ giếng 1 đến giếng 11. Giếng 12: đối chứng âm (không có ricin).



Hình 3. Kết quả thử nghiệm ELISA trên các mẫu giả định.

Quan sát bằng mắt thường trên đĩa ELISA, thấy tại các giếng A (từ A1-A12) cường độ màu xanh giảm dần tương ứng với nồng độ chất chuẩn giảm dần. Tại các giếng B (từ B1-B12) không xuất hiện màu, điều này đúng với sơ đồ bố trí thí nghiệm do giếng B1-B12 được phủ bởi kháng thể thông thường, là giếng có kháng thể không kháng với ricin. Tại các giếng hàng C, D, E, F cường độ màu cũng giảm dần theo độ pha loãng mẫu từ ô số 1 đến ô số 11. Quan sát bằng mắt thường, thấy màu xanh không xuất hiện ở các nồng độ pha loãng từ 1/128 trở đi (ô số 7-11). Tại độ pha loãng mẫu là 1/64, cường độ màu quan sát bằng mắt thường tương đương với màu tại ô A9 của chất chuẩn (nồng độ 1,95 ng/ml).

- Sử dụng máy đọc ELISA đo cường độ màu qua chỉ số OD, thu được kết quả (bảng 1):

Hàng A1 đến A12: chất chuẩn; hàng B1 đến B12: đối chứng âm (các giếng chứa kháng thể không kháng ricin); hàng C1 đến C11: mẫu nước sạch có ricin ở các nồng độ đã pha loãng; hàng D1 đến D12: mẫu sữa tươi có ricin ở các nồng độ đã pha loãng; hàng E1 đến E12: mẫu sữa bột có ricin ở các nồng độ đã pha loãng; hàng F1 đến F12: mẫu bột mì có ricin ở các nồng độ đã pha loãng. C12 và F12: mẫu không có ricin.

Từ kết quả thu được, chúng tôi tính giá trị ngưỡng (COV, cut-off value) theo công thức khuyến cáo của nhà sản xuất. Giá trị thu được  $COV = 0,276$ , tương đương giá trị nồng độ là 1,7 ng/ml. Hiện nay, để phát hiện và định lượng ricin, phương pháp sử dụng phổ biến là kĩ thuật ELISA. Một số kết quả trong các báo cáo trước đây cho thấy, giới hạn phát hiện độc tố ricin cũng khá tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi [5].

**Bảng 1. Kết quả đo chỉ số OD trên các mẫu giả định.**

Giếng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,163	3,044	2,874	2,465	1,796	1,176	0,757	0,453	0,293	0,21	0,169	0,125
B	0,078	0,08	0,078	0,078	0,077	0,078	0,078	0,088	0,079	0,077	0,077	0,076
C	1,826	1,182	0,796	0,484	0,316	0,218	0,182	0,161	0,138	0,131	0,131	0,124
D	1,821	1,208	0,771	0,465	0,308	0,235	0,17	0,15	0,138	0,131	0,131	0,127
E	1,637	1,094	0,76	0,463	0,302	0,214	0,172	0,151	0,14	0,134	0,13	0,128
F	1,741	1,125	0,744	0,458	0,282	0,195	0,143	0,128	0,119	0,117	0,12	0,129

Một số nghiên cứu trước đây đã cho thấy, liều gây chết (LD50) của ricin là từ 1-20 mg/kg tỉ trọng ở người (qua đường tiêu hóa) [1]; từ 5-10 µg/ml ở chuột [3] và từ 3-5 µg/kg ở thỏ (qua đường tiêm) [4]. Như vậy, ngưỡng phát hiện trong kĩ thuật ELISA là rất thấp so với nguy cơ nhiễm độc trong tự nhiên cũng như trong các tình huống cố ý sử dụng độc tố ricin với mục đích đầu độc. Điều này chỉ ra, khả năng ứng dụng cao của kĩ thuật trong việc phát hiện các độc tố sinh học nguy hiểm.

Bảng 1 cho thấy, không có sự khác biệt lớn về chỉ số OD khi thử nghiệm xác định ricin trên các nền mẫu khác nhau. Khi tính toán nồng độ ricin xác định được trên các mẫu (dựa trên chỉ số OD và công thức đường chuẩn), chúng tôi thấy hàm lượng ricin xác định được có sự hao hụt so với hàm lượng chuẩn bị ban đầu. Tuy nhiên, trong giới hạn điều kiện nghiên cứu với số lượng mẫu nhỏ, đây mới chỉ là đánh giá sơ bộ.

**3.3. Đánh giá quy trình**

Quy trình được thực hiện trên nguyên lí sử dụng kĩ thuật ELISA dạng sandwich, với 1 kháng thể đa dòng và 1 kháng thể đơn dòng bất cặp đặc hiệu với ricin, có kháng thể khuếch đại tín hiệu, do đó có khả năng phát hiện độc tố ricin ở nồng độ thấp, với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Giá trị ngưỡng (COV) xác định được là 0,276 tương đương giá trị nồng độ 1,7 ng/ml. Khả năng ứng dụng kĩ thuật này trong phân tích độc tố ricin tốt, đặc biệt, với mục đích phân tích xác định độc tố ở các tình huống sử dụng có chủ đích (như một tác nhân khủng bố sinh học). Thời gian thực hiện các bước phân tích hoàn thiện quy trình trong vòng 24 giờ, tính từ khi xử lí mẫu. Đây là thời gian phù hợp khi sử dụng kĩ thuật ELISA.

Với các trang thiết bị, điều kiện cơ sở vật chất sẵn có tại đơn vị, việc xây dựng và áp dụng quy trình phân tích ricin bằng kĩ thuật ELISA trong một số mẫu thực phẩm và đồ uống là phù hợp, đáp ứng tốt yêu cầu nhiệm vụ được giao. Từ quy trình xây dựng được với một số mẫu nghiên cứu nêu trên, có thể tiếp tục thử nghiệm đa dạng hơn đối với các mẫu thực phẩm, đồ uống khác nhau, nhằm đáp

ứng yêu cầu thực tiễn công tác khi có tình huống khủng bố sinh học xảy ra.

**4. KẾT LUẬN**

Nghiên cứu xây dựng thành công quy trình xác định độc tố ricin trong một số mẫu thực phẩm và đồ uống bằng kĩ thuật ELISA, phù hợp với điều kiện trang thiết bị hiện có của Phòng Sinh học nghiệp vụ và Môi trường, Viện Khoa học và Công nghệ (Bộ Công an). Đã xây dựng được quy trình phân tích ricin ở một số mẫu thực phẩm, đồ uống bằng kĩ thuật ELISA sử dụng bộ KIT của hãng Tetracore (Hoa Kỳ), với độ nhạy cao, giới hạn phát hiện là 1,7 ng/ml.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Bradberry S.M, Dickers K.J, Rice P, Griffiths G.D, Vale J.A (2003), "Ricin Poisoning", *Toxicol. Rev*, 2003; 22: 65-70. doi: 10.2165/00139709-200322010-00007.
2. Chen H.Y, Tran H, Foo L.Y, et al (2014), "Development and validation of an ELISA kit for the detection of ricin toxins from biological specimens and environmental samples", *Anal Bioanal Chem*, 406, 5157-5169.
3. Godal A, Fodstad O, Ingebrigtsen K, Pihl A (1984), "Pharmacological Studies of Ricin in Mice and Humans", *Cancer Chemother. Pharmacol*, 1984; 13: 157-163. doi: 10.1007/BF00269021.
4. Griffiths G.D (2011), "Understanding Ricin from a Defensive Viewpoint", *Toxins*, 2011; 3:1373-1392. doi: 10.3390/toxins3111373.
5. Shyu H.F, Chiao D.J, Liu H.W, Tang S.S (2004), "Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay for Detection of Ricin Hybrid", *Hybridomics*, 21: 69-73, doi: 10.1089/15368590252917665.
6. Thomas Rodda (2013), *Rapid Detection of Ricin in Liquid Foods Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy A thesis submitted to the Faculty of the graduate school of the University of Minnesota.* □