

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH  
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★★★★★★★



**BÙI THỊ CẨM NHUNG**

**DÙNG CỘT SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH VÀ HUỖNH  
QUANG KẾ ĐỊNH LƯỢNG OCHRATOXIN A**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ  
CHUYÊN NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**  
**BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



**DÙNG CỘT SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH VÀ HUỖNH**  
**QUANG KẾ ĐỊNH LƯỢNG OCHRATOXIN A**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ**  
**CHUYÊN NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Giáo viên hướng dẫn**

**PGS.TSKH. NGUYỄN LÊ TRANG**

**TS. NGUYỄN NGỌC HẢI**

**Sinh viên thực hiện**

**BÙI THỊ CẨM NHUNG**

**KHÓA: 2002 – 2006**

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING  
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY**

★★★★★★★



**USING THE IMMUNO AFFINITY  
CHROMATOGRAPHY AND FLUOROMETER TO  
QUANTIFY OCHRATOXIN A**

**GRADUATION THESIS  
MAJOR: BIOTECHNOLOGY**

**Professor**

**PhD. NGUYEN LE TRANG**

**Dr. NGUYEN NGOC HAI**

**Student**

**BUI THI CAM NHUNG**

**TERM: 2002 - 2006**

HCMC, 09/2006

## LỜI CẢM ƠN

*Em xin chân thành cảm ơn:*

*Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho em trong suốt thời gian học tập.*

*Các Thầy Cô trong Bộ môn Công nghệ sinh học cùng các Thầy Cô đã luôn tận tình hướng dẫn, giảng dạy, giúp đỡ và động viên em.*

*PGS. TSKH. Nguyễn Lê Trang và TS. Nguyễn Ngọc Hải và đã tận tâm chỉ bảo, hướng dẫn và đóng góp nhiều ý kiến quý báu trong suốt thời gian em thực tập và hoàn thành khóa luận này.*

*BGD Viện Pasteur, phòng Miễn Dịch Viện Pasteur: Th.s Nguyễn Thị Nguyệt Thu, CN. Dương Ngọc Diễm, KTV. Lạc Ngọc Thêm, KS. Đỗ Thị Châm, KS. Võ Thị Mỹ Duyên, chị Doãn Thị Sim đã tận tình giúp đỡ, chỉ bảo em trong suốt thời gian thực hiện khoá luận.*

*Toàn thể lớp CNSH 28 đã hỗ trợ, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian học tại trường.*

*Sau cùng con xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ba Mẹ cùng những người thân trong gia đình góp phần tạo cho con kiến thức ngày hôm nay.*

*Tháng 08 năm 2006*

*Bùi Thị Cẩm Nhung*

## TÓM TẮT KHÓA LUẬN

BÙI THỊ CẨM NHUNG, Đại Học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, tháng 08/2006,  
“DÙNG CỘT SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH VÀ HUỖNH QUANG KẾ ĐỊNH LƯỢNG  
OCHRATOXIN A”.

Hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TSKH. Nguyễn Lê Trang
2. TS. Nguyễn Ngọc Hải

Đề tài được tiến hành từ ngày 06/02/2006 đến ngày 30/06/2006 tại Phòng Miễn Dịch – Viện Pasteur TPHCM.

Đối tượng được nghiên cứu trong đề tài là độc tố ochratoxin A. Ochratoxin là độc tố gây tác hại vào các cơ quan quan trọng của cơ thể như: thần kinh, gan, thận và hệ miễn dịch. OTA gây hậu quả nghiêm trọng đối với người và động vật nuôi ở nồng độ cực thấp (ppb).

Sắc ký ái lực miễn dịch (Immuno Affinity Chromatography – IAC) được sử dụng với 2 mục đích chính:

- Đồng thời vừa tinh sạch vừa cô đặc độc tố.
- Định lượng trực tiếp theo phương pháp huỳnh quang kế.

Mục đích của đề tài:

- Tạo cột sắc ký ái lực bắt ochratoxin.
- Xác định các điều kiện tối ưu trong việc dùng cột sắc ký ái lực miễn dịch và huỳnh quang kế trong định lượng ochratoxin A (OTA), cụ thể xác định hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với OTA

Kết quả đạt được như sau:

1. Tạo được cột IAC có khả năng bắt giữ OTA.
2. Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với OTA chuẩn tốt (đạt trên 90%).
3. Hiệu suất thu hồi OTA trong mẫu tự tạo (bia) đạt yêu cầu khi lượng OTA nhiễm trong mẫu dưới 20 ng (đạt trên 90%).

# MỤC LỤC

NỘI DUNG	TRANG
Bìa.....	i
Trang tựa.....	ii
Lời cảm ơn.....	iii
Tóm tắt khóa luận.....	iv
Mục lục.....	v
Danh sách các từ viết tắt.....	viii
Danh sách các bảng.....	ix
Danh sách các hình và các biểu đồ.....	x
<b>Chương 1. MỞ ĐẦU.....</b>	<b>1</b>
1.1 Đặt vấn đề.....	1
1.2 Mục đích của đề tài.....	2
1.3 Nội dung thực hiện.....	2
<b>Chương 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>	<b>3</b>
2.1 Nấm mốc.....	3
2.2 Độc tố nấm mốc.....	3
2.3 Độc tố ochratoxin.....	5
2.3.1 Giới thiệu.....	5
2.3.2 Các loài nấm mốc sinh ochratoxin.....	6
2.3.3 Cấu trúc hóa học của ochratoxin.....	7
2.3.4 Tính chất hóa lý của ochratoxin.....	8
2.3.5 Độc tính và tình hình nhiễm ochratoxin A.....	8
2.3.6 Các quy định về ochratoxin trong thực phẩm.....	10
2.4 Các phương pháp phân tích ochratoxin.....	10
2.4.1 Các phương pháp hóa lý.....	10
2.4.1.1 Sắc ký mỏng lớp (TCL).....	11
2.4.1.2 Sắc ký lỏng cao áp (HPLC).....	12

2.4.2 Các phương pháp sinh học .....	12
2.4.2.1 Phương pháp thử nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (ELISA)...	12
2.4.2.2 Phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch (IAC).....	13
2.4.3 Sơ lược cách chế tạo cột IAC do viện Pasteur sản xuất .....	14
2.4.3.1 Gây miễn dịch thỏ và thu kháng huyết thanh kháng OTA .....	14
2.4.3.2 Tinh chế kháng thể kháng OTA.....	14
2.4.3.3 Cộng hợp IgG <sub>OTA</sub> lên Sepharose 4B và tạo cột IAC.....	14
<b>Chương 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>16</b>
3.1 Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài.....	16
3.2 Vật liệu.....	16
3.2.1 Đối tượng nghiên cứu.....	16
3.2.2 Thiết bị.....	16
3.2.3 Dụng cụ.....	16
3.2.4 Hóa chất.....	16
3.3 Phương pháp .....	17
3.3.1 Các phương pháp phục vụ nghiên cứu .....	17
3.3.1.1 Phương pháp quang phổ kế xác định nồng độ OTA.....	17
3.3.1.2 Phương pháp huỳnh quang kế đo hàm lượng ochratoxin .....	18
3.3.1.3 Chuẩn bị dung dịch OTA chuẩn và xác định nồng độ .....	18
3.3.2 Quy trình tạo cột IAC .....	19
3.3.2.1 Chuẩn bị kháng thể.....	19
3.3.2.2 Chuẩn bị gel .....	19
3.3.2.3 Cộng hợp IgG vào Sepharose .....	19
3.3.2.4 Nén cột .....	19
3.3.3 Xây dựng mối tương quan giữa lượng OTA (đo bằng huỳnh quang) trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế (methanol) .....	20
3.3.4 Dựn đường chuẩn OTA .....	21
3.3.5 Quy trình tinh chế, cô đặc bằng cột IAC và định lượng bằng huỳnh quang kế .....	21

3.3.6	Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng.....	22
3.3.7	Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu tự tạo.....	23
3.3.7.1	Phương pháp chọn mẫu nền.....	23
3.3.7.2	Phương pháp tạo mẫu giả.....	23
3.3.7.3	Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu bia Sài Gòn.....	23
3.3.8	Tình hình nhiễm OTA của một số mẫu thực phẩm trên thị trường.....	24
3.4	Phương pháp xử lý số liệu.....	24
<b>Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>		<b>25</b>
4.1	Tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch.....	25
4.2	Xây dựng mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA (đo bằng huỳnh quang kế) trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế (methanol).....	25
4.3	Dựng đường chuẩn OTA.....	27
4.4	Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng.....	28
4.5	Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu bia.....	29
4.6	Tình hình nhiễm OTA của một số mẫu thực phẩm trên thị trường.....	30
<b>Chương 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....</b>		<b>31</b>
5.1	Kết luận.....	31
5.2	Đề nghị.....	31
<b>TÀI LIỆU KHAM KHẢO.....</b>		<b>32</b>
<b>TIẾNG VIỆT.....</b>		<b>32</b>
<b>TIẾNG ANH.....</b>		<b>33</b>
<b>TRANG WEB.....</b>		<b>33</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>		<b>34</b>



## DANH SÁCH CÁC TỪ VIẾT TẮT

AOAC	Association of Official Analytical Chemists Hiệp hội các nhà phân tích hóa học
CV	Coefficient of variation, hệ số biến thiên
BSA	Bovine serum albumin Albumin huyết thanh bò
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay Thử nghiệm miễn dịch liên kết với enzyme
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên Hiệp Quốc
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Sắc ký lỏng cao áp
IAC	Immuno affinity chromatography, sắc ký ái lực miễn dịch hay Immuno affinity column, cột ái lực miễn dịch
IARC	International Agency for Research on Cancer Cơ quan quốc tế nghiên cứu về ung thư
LD <sub>50</sub>	Lethal Dose 50, liều gây chết 50 %
OTA	Ochratoxin A
OD	Optical density, mật độ quang đo
ppm	Part per million (µg/g)
ppb	Part per billion (ng/g)
SD	Standard deviation, độ lệch chuẩn
TLC	Thin Layer Chromatography, sắc ký lớp mỏng
UV	Ultra Violet, bức xạ tử ngoại
IgG <sub>OTA</sub>	Kháng thể kháng OTA

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Trang
Bảng 2.1 Một số độc tố nấm mốc .....	4
Bảng 2.2 Một số độc tố nấm mốc trong nông sản .....	4
Bảng 2.3 Ảnh hưởng độc tố nấm mốc đối với các cơ quan trong cơ thể .....	5
Bảng 2.4 Cơ quan đích của một số nấm mốc .....	5
Bảng 2.5 Độc tính của OTA đối với động vật thí nghiệm .....	8
Bảng 2.6 Tình hình nhiễm OTA trong máu người .....	9
Bảng 3.1 Mối tương quan giữa lượng OTA trong dịch đầy chuẩn và dịch đầy thay thế. ....	20
Bảng 3.2 Bố trí thí nghiệm dựng đường chuẩn OTA .....	21
Bảng 3.3 Bố trí thí nghiệm khảo sát hiệu suất thu hồi OTA của cột IAC đối với mẫu trắng .....	23
Bảng 3.4 Bố trí thí nghiệm khảo sát hiệu suất thu hồi OTA của cột IAC đối với mẫu tự tạo .....	24
Bảng 3.5 Bố trí thí nghiệm khảo sát tình hình nhiễm OTA của một số mẫu trên thị trường .....	24
Bảng 4.1 Mối tương quan giữa lượng OTA trong dịch đầy chuẩn và dịch đầy thay thế .....	25
Bảng 4.2 Kết quả dựng đường chuẩn OTA .....	27
Bảng 4.3 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng .....	28
Bảng 4.4 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu tự tạo .....	29
Bảng 4.5 Tình hình nhiễm OTA của một số mẫu thực phẩm trên thị trường .....	30

## DANH MỤC CÁC HÌNH VÀ BIỂU ĐỒ

HÌNH	TRANG
Hình 2.1 Khuẩn lạc <i>A. ochraceus</i> trong môi trường MA 25 <sup>0</sup> C .....	6
Hình 2.2 Bào tử <i>A. ochraceus</i> .....	6
Hình 2.3 Khuẩn lạc <i>P. verrucosum</i> trên môi trường CYA ở 25 <sup>0</sup> C .....	7
Hình 2.4 Cấu tạo OTA.....	7
Hình 2.5 Nguyên tắc hoạt động của cột IAC .....	13
Hình 3.1 Sơ đồ hoạt động của máy quang phổ tử ngoại .....	17
Hình 3.2 Sơ đồ hoạt động của huỳnh quang kế.....	18
Hình 4.1 Cột IAC .....	25
BIỂU ĐỒ	TRANG
Biểu đồ 2.1 Tình hình nhiễm OTA trong cà phê hạt .....	9
Biểu đồ 4.1 Mối tương quan giữa lượng OTA trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế .....	26
Biểu đồ 4.2 Đường chuẩn OTA.....	27
Biểu đồ 4.3 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng .....	28
Biểu đồ 4.4 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu bia.....	29

# Chương 1. MỞ ĐẦU

## 1.1 Đặt vấn đề

Sự hiện diện của vi sinh vật nói chung và nấm mốc nói riêng là một trong những rào cản kinh tế đối với việc xuất khẩu thực phẩm của nước ta. Trong tình hình phát triển kinh tế theo hướng hội nhập như hiện nay, công tác kiểm tra chất lượng thực phẩm cần phải được chú trọng.

Với khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, Việt Nam là nước thích hợp cho sự sinh sản và phát triển của nấm mốc. Do đó nấm mốc có mặt khắp mọi nơi: đất, nước, không khí, nguyên vật liệu, lương thực, thực phẩm... Cùng với việc bảo quản chưa tốt, các loại thực phẩm như: bia, cà phê, ngũ cốc dễ dàng bị nhiễm nấm mốc và sinh độc tố. Ochratoxin là một trong những độc tố nguy hiểm. Ngộ độc cấp tính do ăn phải thức ăn có nồng độ ochratoxin cao dẫn đến co giật, nôn, mệt lã, tê liệt và có thể gây tử vong. Dài hạn ochratoxin còn gây, viêm thận, ung thư, sảy thai. Vì vậy công tác định lượng và định tính ochratoxin là rất cần thiết. Quy trình phân tích ochratoxin bằng các phương pháp như: sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lỏng cao áp (HPLC) thường phải qua nhiều giai đoạn chiết xuất, làm sạch, cô đặc, dễ bị sai số do phải qua nhiều thao tác, tăng thất thoát trong các công đoạn. Trước những khó khăn trên, sắc ký ái lực miễn dịch (Immuno Affinity Chromatography – IAC) ra đời, sử dụng trong công đoạn vừa tinh sạch vừa cô đặc độc tố, dựa trên nguyên lý gắn kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, tạo khả năng chọn lọc cao mà các phương pháp khác không có được, quy trình chiết và tinh chế ochratoxin của phương pháp IAC lại đơn giản đã đáp ứng được nhu cầu về độ tin cậy cao trong các kết quả phân tích.

Từ những cơ sở trên, phòng Miễn Dịch – Viện Pasteur Tp. Hồ Chí Minh đã tiến hành thực hiện đề tài “*Sản xuất giá ái lực miễn dịch bắt ochratoxin A*”. Cột sắc ký ái lực tạo nên đã cho hiệu quả cao trong phân tích định lượng ochratoxin A.

Được sự đồng ý của Bộ môn CNSH, trường Đại Học Nông Lâm TP HCM, dưới sự hướng dẫn của PGS. TSKH. Nguyễn Lê Trang, TS. Nguyễn Ngọc Hải, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài:

**“Dùng cột sắc ký ái lực miễn dịch và huỳnh quang kế định lượng ochratoxin A”.**

## 1.2 Mục đích của đề tài

Tạo cột sắc ký ái lực bắt ochratoxin.

Xác định các điều kiện tối ưu trong việc dùng cột sắc ký ái lực miễn dịch và huỳnh quang kế trong định lượng ochratoxin A (OTA).

### **1.3 Nội dung thực hiện**

Tạo giá ái lực bắt ochratoxin A trên cơ sở đã có kháng thể kháng OTA.

Tiến hành xác định hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với OTA trong mẫu trắng và mẫu tự tạo.

Đánh giá tình hình nhiễm OTA của một số mẫu thực phẩm trên thị trường.

## Chương 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 2.1 Nấm mốc

Nấm mốc phân bố rộng rãi trong tự nhiên (đất, nước, không khí, nguyên vật liệu, lương thực, thực phẩm...). Nấm mốc là loài vi nấm sống ký sinh hay hoại sinh trên nhiều cơ chất khác nhau, đặc biệt là chất hữu cơ. Nấm mốc phát triển rất nhanh nhất là khi gặp khí hậu nóng ẩm. Điều kiện tối ưu cho nấm mốc phát triển có ẩm độ trên 80%, nhiệt độ: 20 – 30<sup>0</sup>C. Sự phát triển của nấm mốc còn phụ thuộc vào ánh sáng, cơ chất dinh dưỡng, pH, hàm lượng O<sub>2</sub>, ngoài ra có tác động tương hỗ của nhiều loài có mặt trên cùng cơ chất.

Nấm mốc sống nhờ vào hệ sợi bám vào chất hữu cơ, gọi là khuẩn ty. Một số khuẩn ty ăn sâu vào cơ chất gọi là khuẩn ty dinh dưỡng hay khuẩn ty cơ chất, một số mọc ra bề ngoài gọi là khuẩn ty khí sinh. Những khuẩn ty khí sinh là những lông tơ màu trắng, mọc thành lớp sợi mềm, sẽ có một số sợi phát triển thành cơ quan đặc biệt mang bào tử.

Có hai hình thức sinh sản ở nấm mốc:

- Sinh sản vô tính: tự tế bào hoặc sợi nấm phân chia. Cách thông thường nhất là tạo thành bào tử: bào tử kín, bào tử trần.
- Sinh sản hữu tính: hai đầu sợi nấm tiếp hợp với nhau.

Trong tự nhiên, nấm mốc tham gia tích cực vào vòng tuần hoàn vật chất, nhất là quá trình phân giải chất hữu cơ và hình thành chất mùn. Nấm mốc giữ vai trò quan trọng trong công nghiệp lên men sản xuất enzyme, kháng sinh, vitamin, acid amin và trong công nghệ thực phẩm: tương, chao... Bên cạnh đó, nấm mốc cũng là nguyên nhân gây nên những bệnh khá phổ biến và khó điều trị ở người (hắc bào, nấm vẩy rồng, nấm kẽ chân...). Đặc biệt những loài tiết ra độc tố gây ngộ độc và quan trọng hơn gây viêm thận, ung thư, sảy thai (Bảng 2.1, trang 4).

### 2.2 Độc tố nấm mốc

Trong điều kiện thích hợp về nhiệt độ, ẩm độ môi trường, hàm lượng nước trong vật chất, phương thức bảo quản đã tạo điều kiện để nấm mốc phát triển, sinh sản và sinh ra độc tố. Độc tố nấm mốc là sản phẩm thứ cấp do nấm mốc sinh ra, là những hợp chất có khối lượng phân tử thấp, khó bị phân hủy khi chế biến, gây độc cho người

ở nồng độ cực thấp (ppb). Cho đến nay người ta phát hiện trên 300 độc tố nấm mốc trong đó có khoảng 20 chất có độc lực cao thường hay gây nguy hiểm cho người và vật nuôi. Chủ yếu sinh ra bởi 4 giống *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* [5].

**Bảng 2.1: Một số độc tố nấm mốc [ 14 ]**

Độc tố nấm mốc	Loài nấm mốc
Aflatoxins	<i>Aspergillus flavus</i> và <i>A. parasiticus</i>
Ochratoxins	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. niger aggregate</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Penicillium nordicum</i> .
Trichothecenes	<i>Fusarium</i> species; <i>Trichothecium roseum</i>
Zearalenone	<i>F. culmorum</i>
Fumonisin	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
Patulin	<i>P. expansum</i>

Theo số liệu của tổ chức Nông nghiệp và Lương thực của Liên Hiệp Quốc (FAO, 1974), lương thực thực phẩm trên thế giới hư hao khoảng 20%, trong đó một nửa là do nấm mốc gây ra. Ngoài ra còn tổn thất khác mà chưa tính toán được do độc tố nấm mốc nhiễm vào nông sản gây ảnh hưởng sức khỏe người và gia súc.

**Bảng 2.2: Một số độc tố nấm mốc trong nông sản [5].**

Độc tố	Ngô	Gạo	Lúa mì
Aflatoxins	+		+
Cinitrin	+	+	+
Ochratoxins	+	+	+
Sterigmatocystin	+		+
Zearalenone	+		+
T – 2 toxin	+		+
Nivalenon	+		+
Diacetocyclopropenol (DAS)	+		+

Một độc tố nấm ít gây ảnh hưởng nhưng khi kết hợp các nhóm khác thì trở nên trầm trọng. Do một số độc tố có khả năng kết hợp hoặc có thể gây phản ứng hóa học với các phân tử trong cơ thể, đặc biệt khi được gắn đồng trị vào các phân tử có chức năng quan trọng và tồn tại lâu trong cơ thể (protein, DHA).

**Bảng 2.3: Ảnh hưởng độc tố nấm mốc đối với các cơ quan trong cơ thể [5].**

Đối với cơ quan nội tạng	Độc tố tác động
Gây ung thư gan	Aflatoxins, Patulin, Sterigmatocystin, Lutroskyrin
Độc với gan	Aflatoxins, Ochratoxins, Rubratoxin, Lutroskyrin
Độc với thận	Ochratoxins, Cinitrin
Độc với cơ quan sinh dục	Zearalenone
Độc với thần kinh	Esgotamin, Citroviridin
Độc với da và niêm mạc	T – 2 toxin, Nivalenol, Diacetocyscirpenol

Con người bị đe dọa bởi các độc tố nấm theo 2 cách, thứ nhất là tiêu thụ trực tiếp các nguyên liệu bị nhiễm nấm sinh độc tố, thứ hai thông qua thịt sữa, trứng của động vật ăn phải thức ăn bị nhiễm khuẩn lạc nấm, con người hấp thu độc tố này, đặc biệt là gan, thận là nơi độc tố nấm được lưu giữ trong thời gian giải độc và đào thải .

Ngộ độc cấp tính do ăn phải thức ăn có nồng độ độc tố cao dẫn đến co giật, nôn, mê lã, tê liệt và có thể gây tử vong.

Nếu ở nồng độ thấp thì độc tố được chuyển hóa bởi các enzyme ở gan, thận, các cơ quan thuộc hệ tiêu hóa và được tích lũy trong mô bào, nội tạng, trứng, sữa... đây là nguyên nhân gây nhiễm độc ở người. Tác động lâu dài của độc tố gây đột biến, ung thư, dị tật thai...

**Bảng 2.4: Cơ quan đích của một số nấm mốc [5].**

Độc tố	Gan	Thận	Hệ thần kinh	Hạch nội tiết	Da
Aflatoxins	+	+	+	+	
Cinitrin		+	+		
Ochratoxins	+	+	+		
Trichothecenes			+		+
Zearalenone	+	+		+	

## 2.3 Độc tố ochratoxin A

### 2.3.1 Giới thiệu độc tố

Ochratoxin là độc tố gây tác hại vào các cơ quan quan trọng của cơ thể: thần kinh, gan và thận, hệ miễn dịch gây hậu quả nghiêm trọng đối với người và động vật nuôi. Là độc tố có tác hại nghiêm trọng đến sức khỏe con người.



Trong nhóm ochratoxin thì ochratoxin A (OTA) là chất độc nhất. OTA là tác nhân gây biến đổi steroid như progesterol. Được phát hiện đầu tiên bởi Scott, VanderMerve và ctv (1965) [4]. Cơ quan quốc tế nghiên cứu về ung thư (International Agency for Research on Cancer – IARC) phân loại OTA thuộc nhóm dương tính đối với ung thư (nhóm 2B) [11].

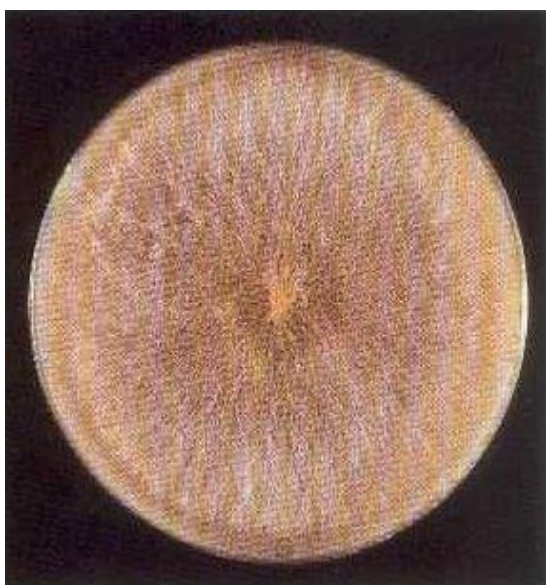
Ochratoxin được tìm thấy nhiều ở ngũ cốc, rau củ, cà phê, trái cây khô, sản phẩm sữa, rượu, bia...

### 2.3.2 Các loài nấm mốc sinh Ochratoxin

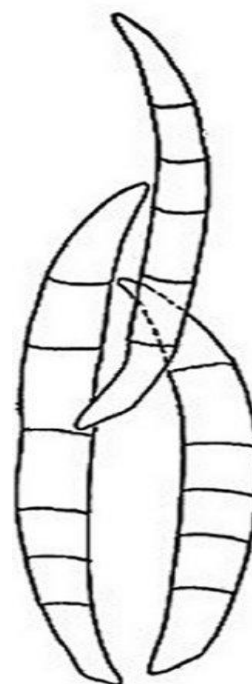
Ochratoxin là độc tố vi nấm được sản sinh bởi một số loài nấm thuộc giống *Aspergillus* và *Penicillium*. Qua phân lập và định danh hệ nấm mốc trong cà phê nhân Robusta cho thấy hệ nấm mốc phát triển khá phong phú và đa dạng gồm 15 loài thuộc giống *Aspergillus* và *Penicillium*, trong đó *A. ochraceus* và *P. verrucosum* là hai loài nấm mốc chủ yếu sinh ra ochratoxin, những loài thuộc *A. ochraceus* nhiễm với tần suất 7 – 25% [6]. Ngoài ra, nhiều loài có thể tạo ochratoxin như: *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. carbonarius*, *A. melleus*, *Penicillium nordicum*...

- *A. ochraceus*

Khuẩn ty có vách ngăn, các bào tử đính xòe ra như những bông cúc và mang màu sắc đặc trưng (màu vàng nâu).



**Hình 2.1:** Khuẩn lạc *A. ochraceus* trong môi trường MA 25°C [16]



**Hình 2.2:** Bào tử *A. ochraceus*

- *P. verrucosum* :

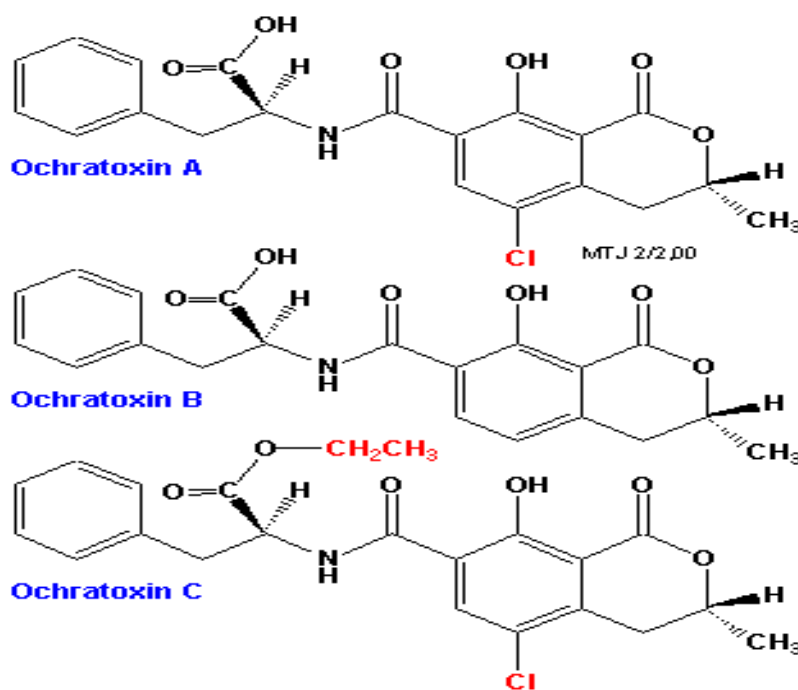
Khuẩn ty có vách ngăn và phân nhánh, bào tử đính có màu xanh khi chín nên còn được gọi là mốc xanh.



Hình 2.3: Khuẩn lạc *P. verrucosum* trên môi trường CYA ở 25<sup>0</sup>C [17].

### 2.3.3 Cấu trúc hóa học của ochratoxin

Hiện nay, người ta biết OTA, OTB và những dẫn xuất ester của nó: ester ethylic của OTA (gọi là OTC) và ester methylic của nó. Các ochratoxin B, C được tạo thành trong điều kiện nuôi cấy trong phòng thí nghiệm hoặc phát hiện trong nước tiểu súc vật ăn thức ăn nhiễm OTA.



Hình 2.4: Cấu tạo OTA [15]

### 2.3.4 Tính chất hóa lý của ochratoxin A

Trọng lượng phân tử OTA: 403,8

Điểm nóng chảy: 169°C

Phổ hấp phụ UV: 2 đỉnh: 216 – 333 nm

Cấu tạo:  $C_{20}H_{18}O_6HN$

7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylcosomarin

(nhóm 7-carboxy liên kết với L-β-phenylalanine bằng nối amide)

Là tinh thể không màu, bền với nhiệt, tan trong dung môi hữu cơ phân cực như: chloroform, methanol, ethanol, ít tan trong nước và tan trong đệm carbonat loãng.

Đễ bị phân hủy bởi ánh sáng, trong môi trường kiềm hoặc chất tẩy (như sodium hypochlorite).

### 2.3.5 Độc tính và tình hình nhiễm của ochratoxin A

OTA được chứng minh là chất gây hư thận, ức chế miễn dịch (sự suy giảm miễn dịch là do sự teo giảm đi của tuyến ức (Thymus), hàm lượng globulin huyết thanh giảm). Ngoài ra OTA còn ức chế sinh tổng hợp protein do ức chế cạnh tranh tổng hợp phenylalanin-tRNA. OTA còn gây miễn cảm với bệnh truyền nhiễm như Coccidiose (cầu trùng). Trong đó chủ yếu gây tổn thương gan và thận. Liều 70 µg/1 kg cơ thể hằng ngày trong hai năm gây ung thư thận ở chuột đực.

Đối với lợn, ăn liều thấp 200 ppb trong nhiều tuần lễ gây tổn thương thận.

Đối với gia cầm, ảnh hưởng đến gan, thận, hệ miễn dịch và tạo máu. Liều cấp tính có thể làm giảm trọng lượng, tiêu tốn thức ăn, sản lượng trứng, tỷ lệ ấp nở.

**Bảng 2.5: Độc tính của OTA đối với động vật thí nghiệm [5]**

Động vật thí nghiệm	LD <sub>50</sub> (mg/kg trọng lượng)
Vịt con	0,5
Chuột cống	32
Lợn con	6

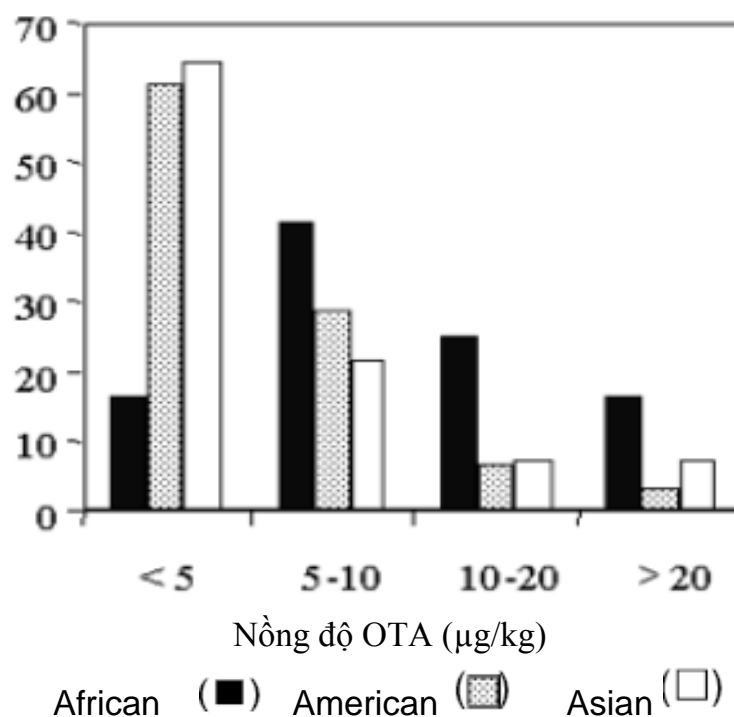
Gà con	3,4
--------	-----

Độc tố này chủ yếu gây độc mãn tính hơn là cấp tính. Nấm mốc sinh ra độc tố OTA đã sinh sôi nảy nở ở một vùng rộng của vùng trồng ngũ cốc và gây bệnh địa phương tại Thụy Điển và Đan Mạch.

Lúa mạch với ẩm độ cao tạo điều kiện nấm mốc phát triển là nguyên nhân gây nhiễm OTA với nồng độ 2 mg/ml máu trong 35% mẫu thịt lấy trong đợt khảo sát lợn giết thịt của đàn lợn tại Thụy Điển (theo Holmberg và cộng sự 1990).

Tình hình nhiễm OTA ở cà phê hạt từ những nguồn gốc khác nhau được trình bày trong Biểu đồ 2.1

Tỷ lệ cà phê nhiễm OTA (%)



**Biểu đồ 2.1: Tình hình nhiễm OTA trong cà phê hạt [11].**

Ở người, OTA được tìm thấy nhiều trong huyết thanh và trong sữa. Tình hình nhiễm OTA trong máu người được thống kê trong Bảng 2.6.

**Bảng 2.6: Tình hình nhiễm OTA trong máu người [12]**

Quốc gia	Số mẫu	Tỷ lệ nhiễm (%)
Đức	306	57
Canada	159	40

Switzerland	386	100
Sweden	297	13

### 2.3.6 Các quy định về ochratoxin trong thực phẩm

Theo cộng đồng chung châu Âu, mức độ thấp nhất hằng ngày cơ thể lấy vào có thể chịu đựng được là 1 – 16 ng/kg thể trọng. Trong đó giới hạn OTA nhiễm trong thực phẩm là 5 µg/kg (5 ppb).

Theo tiêu chuẩn Việt Nam: < 35 µg/kg.

## 2.4 Các phương pháp phân tích ochratoxin

### 2.4.1 Các phương pháp hóa lý

Tất cả phương pháp hóa lý đều phải qua các bước sau:

- Lấy mẫu
- Chiết ochratoxin
- Tinh sạch dịch chiết
- Cô đặc
- Phát hiện và định lượng ochratoxin

– Lấy mẫu: Do lượng độc tố phân bố không đồng đều nên cần lấy một số mẫu có tính phân bố đủ để đại diện cho sản phẩm cần kiểm tra. Mẫu phải được lấy từ nhiều vị trí khác nhau với những lượng khác nhau. Các mẫu này được gộp lại thành mẫu duy nhất và nghiền đồng đều. Và từ mẫu đồng nhất này, một lượng thích hợp sẽ được trích ra để tiến hành phân tích ochratoxin, thường từ 20 – 100 g tùy thuộc vào loại thực phẩm và hàm lượng ochratoxin cao hay thấp trong mẫu.

– Chiết ochratoxin

Loại chất béo

Đối với mẫu có thành phần béo từ 5% trở lên, sử dụng các dung môi: hexane, petroleum ether, ethyl dioxide, pentane nhằm tách chất béo trước khi tiến hành chiết ochratoxin.

Chiết ochratoxin

Dựa vào đặc tính tan của ochratoxin trong các dung môi hữu cơ nên chúng thường được chiết với các dung môi hữu cơ như: dichloromethane, benzene, acetonitril, acetone, chloroform hay methanol. Ochratoxin được chiết bằng cách lắc

với dung môi ở nhiệt độ phòng, nước được thêm vào để làm ẩm cơ chất giúp dung môi dễ dàng thấm sâu vào bên trong mẫu.

– Tinh sạch dịch chiết

Loại bỏ các hợp chất khác có thể hiện diện cùng ochratoxin trong dịch chiết mẫu. Có ba cách tinh sạch phổ biến:

Loại các tạp chất không mong muốn bằng các tác nhân gây tủa: thường dùng để cho mẫu có nguồn gốc thực vật. Các chất gây tủa thường dùng là các muối kim loại nặng như:  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{CuCO}_3$ ...

Loại bằng cách phân chia trên hai pha lỏng (partition): Chiết bằng cách chuyển ochratoxin từ dung môi chiết ban đầu (ví dụ như methanol) vào dung môi khác (ví dụ như chloroform).

Loại tạp bằng cột sắc ký hấp phụ (adsorption chromatography column): Kỹ thuật này có ưu điểm dễ sử dụng và hiệu quả loại tạp rất tốt trên nhiều loại mẫu khác nhau. Ví dụ, cột chiết xuất pha rắn SPE (solid-phase extraction) được chế tạo sẵn chứa các chất hấp phụ thường là silicagel, thích hợp cho phân tích bằng HPLC với hệ dung môi lần lượt là n-hexan, ethyl ether, hỗn hợp chloroform: methanol.

– Cô đặc mẫu

Nồng độ ochratoxin trong dịch chiết thường thấp nên cần cô đặc bằng cách cho bốc hơi trong máy cô quay (Rotary Evaporator) dưới áp suất thấp hoặc dùng nồi chưng cách thủy dưới luồng khí nitơ nhẹ.

– Phát hiện và xác định hàm lượng

Các phương pháp sắc ký thường được sử dụng, dựa trên nguyên tắc phân tách giữa 2 pha: pha tĩnh và pha động (lỏng hoặc khí) khi cho chất cần tách qua lớp sắc ký. Pha tĩnh có tính liên kết với ochratoxin làm chậm sự di chuyển của các chất (do các đặc điểm lý hóa khác nhau) nên tạo ra sự phân biệt giữa chúng.

#### **2.4.1.1 Sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography – TLC)**

Phương pháp này dựa trên sự hấp phụ khác nhau của các ochratoxin trên lớp silicagel (pha tĩnh) và khả năng hòa tan của chúng trong hệ dung môi (pha động). Các ochratoxin lần lượt được tách trong quá trình hệ dung môi di chuyển theo lực mao dẫn trên bản silicagel. Silicagel được phết lên một bản mỏng (nhôm hoặc nhựa) có kích

thước thường là 20 cm x 20 cm, dịch chiết sau khi cô đặc sẽ được hòa vào hỗn hợp dung môi benzen: acetonitril. Chấm khoảng 10 – 50 µl dung dịch ochratoxin đã hòa tan lên bản silicagel, tiến hành song song với chuẩn đã biết trước nồng độ. Sau khi sấy kỹ, sấy khô bản, soi dưới đèn huỳnh quang ở bước sóng 333 nm. Sự hiện diện của ochratoxin trong mẫu được xác định bằng cách so sánh dựa vào vị trí so với vệt huỳnh quang chuẩn. Sự định tính bằng mắt cho kết quả tương đối. Dùng máy đo mật độ phát huỳnh quang (fluorodensimeter) thay mắt thường để giảm sai số.

#### **2.4.1.2 Sắc ký lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography – HPLC).**

Kỹ thuật HPLC nhanh, nhạy, cho kết quả phân tích chính xác hơn TCL. Gồm 2 giai đoạn:

- Giai đoạn tách các chất phân tích: gồm pha tĩnh và pha động.

Pha tĩnh (stationary phase)

Thường dùng cột pha đảo, các chất dùng nhồi trong cột sắc ký có tính phân cực thấp (thường dùng là hợp chất silicagel có gắn các chuỗi alkyl từ C<sub>8</sub> đến C<sub>18</sub>).

Pha động (mobile phase)

Là hỗn hợp các dung môi có độ phân cực khác nhau, qua cột với vận tốc dòng 1 – 10 ml/phút nhờ hệ thống bơm cao áp. Thường sử dụng hệ dung môi gồm nước, alcol (methanol), acetonitril.

- Giai đoạn phân tích các chất sau khi ra khỏi cột:

Dựa vào tính chất của các chất cần phân tích, một thiết bị thích hợp gọi là đầu dò (detector) sẽ được nối trực tiếp vào đầu ra của cột sắc ký để phát hiện từng chất phân giải ra khỏi cột. Đầu dò huỳnh quang thường được sử dụng ở bước sóng kích thích 333 nm, phát xạ ở bước sóng 460 nm. Việc định tính hoàn toàn dựa vào thời gian lưu của các chất phân tích và chuẩn. Sau khi xác định thời gian ra khỏi cột các chất cần phân tích là ochratoxin, dựa vào diện tích của mẫu so với diện tích của chuẩn đã biết trước nồng độ để định lượng ochratoxin có trong mẫu cần phân tích.

### **2.4.2 Các phương pháp sinh học**

**2.4.2.1 Phương pháp thử nghiệm miễn dịch liên kết với enzyme (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA):**

Phương pháp cho kết quả nhanh, tiết kiệm dung môi, có thể phân tích nhiều mẫu cùng lúc nhưng dễ cho kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả.

Nguyên tắc dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Ochratoxin chuẩn được cộng hợp với enzyme, tạo thành phức hợp ochratoxin – enzyme và được sử dụng như một kháng nguyên ở nồng độ nhất định, cạnh tranh với ochratoxin có trong mẫu. Kháng thể đặc hiệu với ochratoxin được gắn lên bề mặt giếng nhựa polystyren.

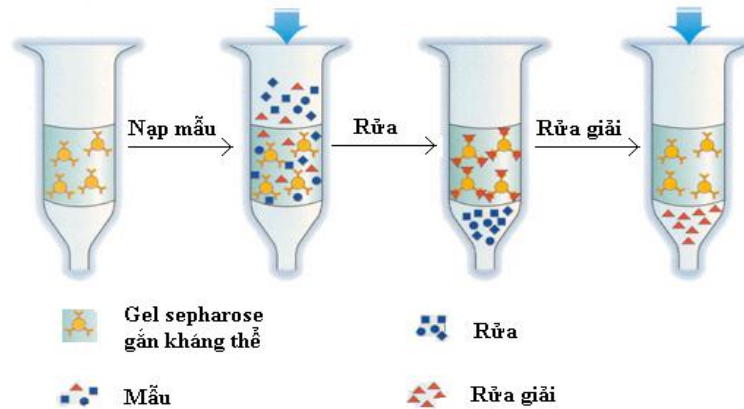
Dịch chiết mẫu trong methanol 70% được trộn với cộng hợp ochratoxin-enzyme và được cho vào giếng có phủ kháng thể, các ochratoxin trong mẫu (nếu có) sẽ cạnh tranh với phức hợp ochratoxin – enzyme để gắn vào kháng thể cố định trên polystyren. Sau đó rửa sạch các phức hợp thừa, cơ chất phản ứng với enzyme được đưa vào để tạo màu. Ở một thời gian sau đó thêm vào dung dịch ngưng phát màu để tạo điều kiện đồng đều về thời gian cho mọi giếng. Tiến hành đo độ hấp thụ của mẫu và dãy chuẩn bằng máy so màu, từ đó tính được nồng độ của ochratoxin có trong mẫu.

Màu càng đậm chứng tỏ cộng hợp ochratoxin – enzyme được giữ trên giếng càng nhiều, đồng nghĩa với nồng độ ochratoxin trong mẫu càng thấp. Ngược lại, màu càng nhạt thì nồng độ ochratoxin trong mẫu càng cao.

#### **2.4.2.2 Phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch (Immuno affinity chromatography – IAC)**

Giống như ELISA, IAC cũng dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Kháng thể đặc hiệu với ochratoxin được gắn lên giá rắn của cột sắc ký (thường dùng Sepharose 4B), tạo cho IAC đặc tính vừa tinh sạch vừa cô đặc ochratoxin. Mẫu được chiết với methanol, sau đó được pha loãng và cho qua cột IAC. Cột được rửa sạch những tạp chất không gắn lên kháng thể và được giải hấp bằng methanol. Tiến hành định lượng bằng HPLC hoặc huỳnh quang kế. Nguyên tắc hoạt động của cột IAC được trình bày trong Hình 2.5.





**Hình 2.5: Nguyên tắc hoạt động của cột IAC**

Ưu điểm của phương pháp IAC:

- Kết quả xét nghiệm đáng tin cậy.
- Tỷ lệ thu hồi ochratoxin rất cao
- Rất đơn giản
- Thời gian phân tích nhanh
- Sử dụng ít dung môi hữu cơ (chloroform... nên ít ảnh hưởng đến môi trường)
- Đồng thời vừa cô đặc vừa tinh chế ochratoxin. Ochratoxin tinh chế không kèm theo tạp chất như với các cột hoạt động theo qui tắc lý hóa
- Giá ái lực miễn dịch giữ hoạt tính ổn định ít nhất là 1 năm

#### 2.4.3 Sơ lược cách chế tạo cột IAC do viện Pasteur sản xuất: (Phụ lục 1)



##### 2.4.3.1 Gây miễn dịch thỏ và thu kháng huyết thanh kháng OTA

Với bản chất là hapten, không có đặc tính sinh đáp ứng miễn dịch, không tạo được kháng thể nên ochratoxin phải cộng hợp với một protein giá (BSA – Bovine serum albumin). Cộng hợp OTA – BSA được tiêm vào thỏ để gây miễn dịch. Khi đó, kháng thể tạo thành sẽ là:

- Kháng thể kháng OTA và BSA
- Kháng thể kháng OTA (không phản ứng với BSA) (IgG<sub>OTA</sub>)
- Kháng thể kháng BSA
- Kháng thể khác

#### **2.4.3.2 Tinh chế kháng thể kháng OTA**

Tinh chế kháng thể kháng OTA bằng cách tủa huyết thanh với amoniumsulfate 45% S. Sau đó loại bỏ kháng thể kháng BSA bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch với cộng hợp gel Sepharose 4B – BSA.

Khi đó, các kháng thể kháng OTA cùng với các kháng thể còn lại đi qua cột.

#### **2.4.3.3 Cộng hợp IgG<sub>OTA</sub> lên polymer Sepharose 4B và tạo cột IAC**

Tiến hành cộng hợp IgG<sub>OTA</sub> lên Sepharose 4B và tạo cột IAC (mục 3.3.2).

Cột được qua thử nghiệm cho kết quả 100% về khả năng thu hồi, tính lặp lại cao, cho thấy sử dụng cột ái lực miễn dịch sản xuất tại Việt Nam với tính hiệu quả cao tương đương với các cột ngoại nhập và giá thành thấp hơn.

## **Chương 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **3.1 Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài**

- Thời gian thực hiện: 6/2/2006 – 30/6/2006
- Địa điểm thực hiện đề tài: Phòng Miễn Dịch – Viện Pasteur TPHCM

### **3.2 Vật liệu**

#### **3.2.1 Đối tượng nghiên cứu**

- Ochratoxin A chuẩn có nồng độ 10 ppm
- Kháng thể kháng ochratoxin do viện Pasteur tinh chế
- Gel: CN–Br activate Sepharose 4B
- Cột: là cột nhựa, có kích thước 0,4 x 10 cm

#### **3.2.2 Thiết bị**

- Huỳnh quang kế (A1501, Vicam, USA)
- Máy khuấy từ đứng (Stuare Sientific Stirrer SS10, UK)
- Cân phân tích (E14130, OHAUS, Switzerland)
- Máy votex (D–79219, IKA, Germany)
- Máy lắc (D–79219, IKA, Germany)
- Tủ hút, tủ lạnh

#### **3.2.3 Dụng cụ**

- Ống đong, phễu thủy tinh, bechers
- Cột sắc ký
- Pipetman 100  $\mu$ l – 1000  $\mu$ l, đầu tip

#### **3.2.4 Hóa chất**

- Methanol (Merk)
- NaCl, Tween 20
- Nước cất
- Hóa chất tẩy rửa
- Dung dịch 1:  $\text{NaN}_3$  0,05% (dd1)

Dung dịch 2: PBS, NaN<sub>3</sub> 0,05% 40 (dd 2)

Dung dịch 3: HCl 1 mM, pH = 3 (dd 3)

Dung dịch 4: NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M; NaCl 0,5 M; Thimerosal 0,01%; pH = 8,7 (dd 4)

Dung dịch 5: Tris – HCl 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH = 8 (dd 5)

Dung dịch 6: NaCl 0,5 M; CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M; pH = 4 (dd 6)

Dung dịch 7: Tris – HCl 0,1 M; NaN<sub>3</sub> 0,05%; NaCl 0,5M; pH = 4 (dd 7)

### 3.3 Phương pháp

#### 3.3.1 Các phương pháp phục vụ nghiên cứu

##### 3.3.1.1 Phương pháp quang phổ kế để xác định nồng độ OTA

###### Nguyên tắc

Quang phổ kế cấu tạo gồm nguồn sáng sau khi qua bộ tạo ánh sáng đơn sắc chỉ cho qua ánh sáng với bước sóng nhất định, và khi qua dung dịch OTA trong cuvet sẽ tác động vào OTA và ánh sáng bị OTA hấp thụ một phần.

Ở mỗi dung dịch pha loãng khác nhau, lượng ánh sáng hấp thụ thay đổi ở một độ dài sóng nhất định (chỉ có điện tử ở các hợp chất có nối đôi hay/và nối ba mới hấp thụ ánh sáng ở vùng tử ngoại). Bộ nhận tín hiệu, bộ khuếch đại tín hiệu sẽ đo mật độ quang của dung dịch.

Cực đại hấp thụ ( $\lambda_{\max}$ ) là bước sóng mà ở đó chất cho độ hấp thụ lớn nhất. Và ở mỗi cực đại hấp thụ, mỗi chất lại có hệ số hấp thụ mol nhất định ( $\Sigma$ ).

Nồng độ của chất phân tích được tính theo công thức:

$$\mu\text{g OTA} = \frac{\text{OD} * a * V}{\Sigma}$$

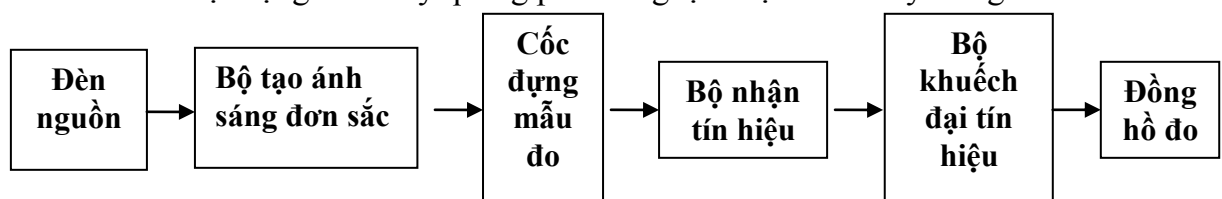
OD: giá trị hấp thụ ở cực đại hấp thụ ( $\lambda_{\max}$ )

a: độ pha loãng dung dịch

V: thể tích dung dịch màu

$\Sigma$ : hệ số hấp phụ phân tử của chất tại cực đại hấp thụ

Sơ đồ hoạt động của máy quang phổ tử ngoại được trình bày trong Hình 3.1.



Hình 3.1: Sơ đồ hoạt động của máy quang phổ tử ngoại (UV-Vis)

### 3.3.1.2 Phương pháp dùng huỳnh quang kế đo lường hàm lượng ochratoxin

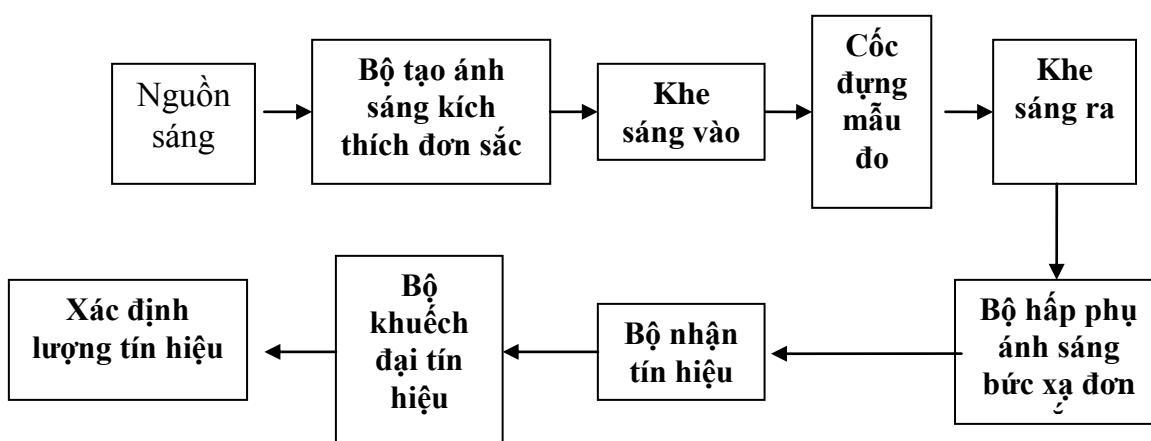
#### Nguyên tắc

Ánh sáng từ nguồn sáng phát ra được điều chỉnh bởi hệ thống kiểm soát độ dài sóng nhằm tạo nên bước sóng kích thích phù hợp. Các phân tử hấp thụ photon ánh sáng chuyển từ trạng thái cơ bản lên trạng thái kích thích.

Tuy nhiên do trạng thái kích thích không bền nên các phân tử ở trạng thái kích thích có thể trở về trạng thái cơ bản bằng cách giải phóng năng lượng dưới dạng photon, tức là tự phát ra ánh sáng, với năng lượng kém đi.

Ở bước sóng phát xạ 460 nm, các bức xạ được tế bào quang điện tại đầu dò chuyển thành tín hiệu điện tử. Lượng ochratoxin có trong mẫu được so sánh với dung dịch ochratoxin chuẩn và máy tự tính ra kết quả.

Sơ đồ hoạt động của huỳnh quang kế được trình bày trong Hình 3.2.



Hình 3.2: Sơ đồ hoạt động của huỳnh quang kế

### 3.3.1.3 Chuẩn bị dung dịch OTA chuẩn và xác định nồng độ

Mục đích: pha loãng dung dịch OTA chuẩn

Tiến hành

Pha OTA nồng độ 0,25 ppm từ OTA chuẩn có nồng độ 10 ppm trong methanol.

Lấy OTA chuẩn nồng độ 10 ppm để nguội ở nhiệt độ phòng khoảng 20 phút. Lấy một thể tích OTA cần sử dụng vào lọ mới, để khô hoàn toàn trong tủ hút. Sau đó thêm methanol theo tỷ lệ mong muốn.

Tiến hành xác định nồng độ OTA bằng huỳnh quang kế.

### 3.3.2 Quy trình tạo cột IAC:

#### 3.3.2.1 Chuẩn bị kháng thể

- Kháng thể kháng OTA dưới dạng tủa trong amoniumsulfate được tiến hành thẩm tích trong dung dịch
  - Thẩm tích tủa trong dung dịch  $\text{NaN}_3$  (dd 1): 1 lít x 2 lần
  - Thẩm tích tủa trong dung dịch PBS (dd 2): 1 lít x 2 lần
- Ly tâm 2000 vòng/phút, thu dịch nổi
- Xác định nồng độ IgG bằng quang phổ kế ở  $\lambda = 280 \text{ nm}$

#### 3.3.2.2 Chuẩn bị gel

Gel CNBr – activated Sepharose 4B

1 g gel khô trương phòng thành 3,5 ml gel

Rửa gel với dung dịch HCl 1 mM (dd 3), thể tích 200 ml dung dịch/1g gel

Cách rửa gel: Cho HCl vào, lắc để gel nở hoàn toàn. Sau đó tiến hành ly tâm

Ly tâm lần 1: 2500 vòng/phút, trong 5 phút

Ly tâm lần 2 – 8: 2500 vòng/phút, trong 2 phút

Ly tâm lần 9: 2500 vòng/phút, trong 5 phút

#### 3.3.2.3 Cộng hợp IgG vào Sepharose 4B

Quá trình cộng hợp thực hiện qua các bước:

- Cho dung dịch  $\text{IgG}_{\text{OTA}}$  vào gel đã rửa (nồng độ 5 mg  $\text{IgG}_{\text{OTA}}/1 \text{ ml gel}$ ), để 2 giờ ở nhiệt độ phòng (lắc)
- Qua đêm ở  $4^\circ\text{C}$  (lắc)
- Ly tâm 2500 vòng/phút, trong 5 phút
- Lấy dịch nổi đo hấp phụ quang ở  $\lambda = 280 \text{ nm}$  ( $\text{OD} = 0$  chứng tỏ kháng thể cộng hợp hoàn toàn)
- Rửa lại 3 lần với đệm carbonat (dd 4) (ly tâm 2500 vòng/phút, 2 phút/ lần)
- Bất hoạt nhóm  $-\text{C}\equiv\text{N}^+$  với đệm Tris (dd 5) (lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ)

- Rửa với đệm acetic (dd 6) (lắc ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ)
- Lần cuối rửa với đệm Tris – HCl (dd 7)

#### 3.3.2.4 Nén cột

Các bước nén cột:

Thể tích gel trên cột là: 0,1 ml gel/cột

- Ngâm frit và cột bằng ethanol trong 3 phút để đuổi hết khí bên trong
- Rửa lại bằng nước cất. Nén frit vào đáy của cột
- Rửa 3 lần với đệm Tris (dd 7)
- Cho gel đã cộng hợp IgG vào cột

Lưu ý: + Khuấy từ đứng hỗn hợp dịch gel trong điều kiện lạnh

+ Pha loãng hỗn hợp 10 lần (hút 1 ml cho vào cột)

- Rửa 3 lần với đệm
- Cho dd đệm (dd 7) vào cột, bảo quản ở 4<sup>0</sup>C

#### 3.3.3 Xây dựng mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế (methanol)

Trong quá trình thực hiện cho thấy nếu sử dụng dịch đẩy chuẩn của hãng Vicam giá thành rất cao. Nên chúng tôi đã tiến hành đẩy bằng dịch đẩy thay thế (methanol tuyệt đối). Do đó để có hiệu quả cần xây dựng mối tương quan giữa lượng OTA trong methanol (dịch đẩy thay thế) và trong dịch đẩy chuẩn. Từ đó, tiến hành đẩy bằng methanol trong các thí nghiệm sau và suy ra được lượng OTA chính xác.

Bố trí thí nghiệm khảo sát mối tương quan:

Chuẩn bị dung dịch OTA có nồng độ 0,25 ppm từ dd OTA chuẩn 10 ppm (mục 3.3.1.3), tiến hành đo hàm lượng OTA bằng huỳnh quang kế.

Bố trí thí nghiệm theo Bảng 3.1

#### **Bảng 3.1: Bố trí thí nghiệm khảo sát mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế (methanol)**

Lượng OTA (ng)	Thể tích dung dịch OTA nồng độ 0,25 ppm ( $\mu$ l)	Thể tích methanol hoặc dung dịch đẩy ( $\mu$ l)
-------------------	---	--

2,5	10	1490
5	20	1480
10	40	1460
20	80	1420
40	160	1340

### 3.3.4 Dựng đường chuẩn OTA

Dựa vào đặc tính phát huỳnh quang của ochratoxin để dựng đường chuẩn nhằm khảo sát mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA và cường độ phát huỳnh quang (đo bằng huỳnh quang kế).

Từ dung dịch OTA chuẩn nồng độ 10 ppm pha thành dung dịch OTA 0,25 ppm trong methanol (mục 3.3.1.3). Thí nghiệm theo Bảng 3.2, mỗi hàm lượng thực hiện 2 lần. Tiến hành đo hàm lượng OTA bằng huỳnh quang kế.

**Bảng 3.2: Bố trí thí nghiệm dựng đường chuẩn OTA**

Lượng OTA (ng)	Số lần lặp lại (n)	Thể tích dịch đầy ( $\mu$ l)
2,5	2	1490
5	2	1480
10	2	1460
20	2	1420
40	2	1340

\* n: Số lần lặp lại.

### 3.3.5 Quy trình tinh chế, cô đặc bằng cột IAC và định lượng bằng huỳnh quang kế

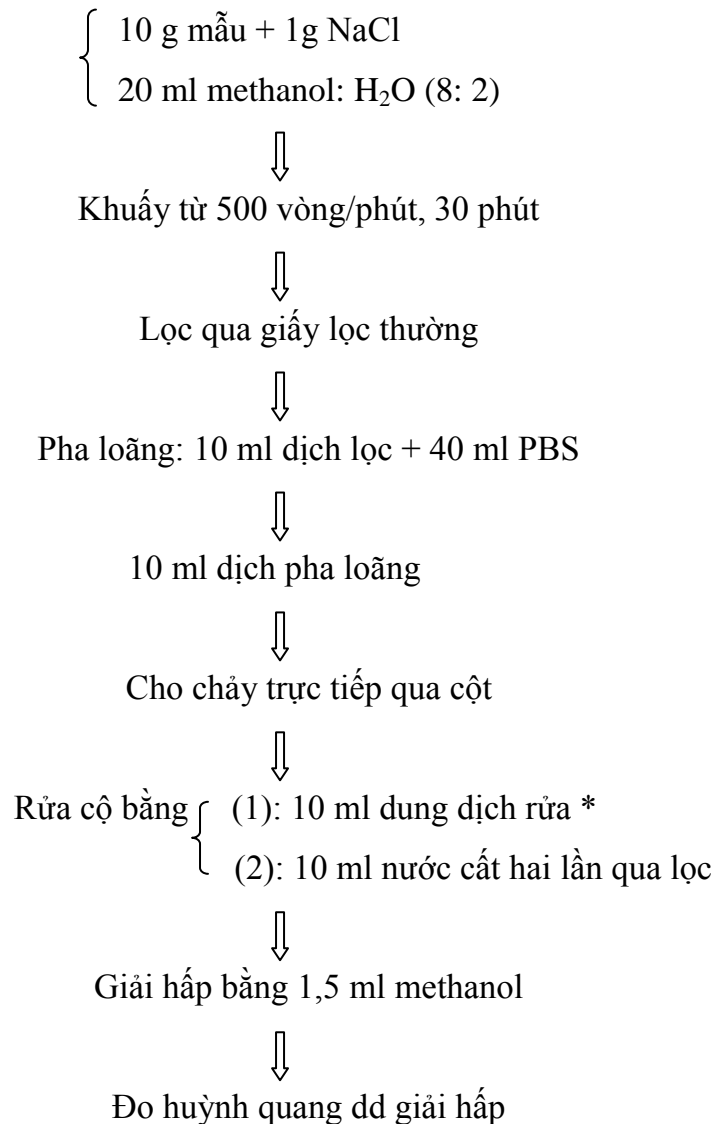
Quy trình:

Sử dụng quy trình của hãng Vicam (Mỹ)

Đề cột cân bằng ở nhiệt độ phòng

Sau đó rửa cột bằng 10 ml nước





\* Dung dịch rửa: 20 ml PBS + 20 µl Tween 20 (0,01 %.)

### 3.3.6 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng

Xác định hiệu suất thu hồi nhằm đánh giá khả năng bắt giữ OTA của cột IAC.

Cho vào cột lượng OTA chuẩn đã biết trước nồng độ (3.3.1.3). Lượng bố trí theo Bảng. Thực hiện theo quy trình (3.3.5). Dịch sau giải hấp tiến hành định lượng bằng huỳnh quang kế. Tiến hành song song với hai cột không bổ sung OTA để làm đối chứng.

Tiến hành bố trí thí nghiệm định xác định hiệu suất thu hồi đối với mẫu trắng theo Bảng 3.3.

**Bảng 3.3: Bố trí thí nghiệm khảo sát hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với OTA chuẩn**

Lượng OTA chuẩn qua IAC (ng)	n
2,5	2
5	2
10	2
20	2
30	2
40	2

Cách tính hiệu suất thu hồi của cột IAC:

$$H\% = \frac{\text{Lượng OTA sau khi qua cột}}{\text{Lượng OTA trước khi qua cột}} \times 100$$

### 3.3.7 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu tự tạo

#### 3.3.7.1 Phương pháp chọn mẫu nền

Mẫu nền được chọn sao cho không bị nhiễm OTA, trong thí nghiệm mẫu nền là mẫu bia Sài Gòn (bia 333). Tiến hành kiểm tra nền của mẫu bia bằng huỳnh quang kế.

#### 3.3.7.2 Phương pháp tạo mẫu giả

Lượng mẫu dùng để phân tích là 5 ml, chiết mẫu theo quy trình (phụ lục 2). Gây nhiễm mẫu bằng một lượng OTA đã biết trước hàm lượng (5, 10, 20 và 40 ng).

#### 3.3.7.3 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu bia Sài Gòn

Mục đích thí nghiệm nhằm đánh giá độ thu hồi của OTA đối với mẫu bia được gây nhiễm nhân tạo.

Mẫu bia được chiết theo quy trình, gây nhiễm mẫu, cho qua IAC, dịch sau giải hấp được định lượng bằng huỳnh quang kế. Bố trí thí nghiệm theo Bảng 3.4.

**Bảng 3.4: Bố trí thí nghiệm khảo sát hiệu suất thu hồi OTA của cột IAC đối với mẫu tự tạo**

Lượng OTA chuẩn qua IAC (ng)	Khối lượng mẫu (ml)	Số lần lặp lại (n)
2,5	5	2
5	5	2
10	5	2
20	5	2
30	5	2
40	5	2

### 3.3.8 Tình hình nhiễm OTA của một số mẫu thực phẩm trên thị trường

Bố trí thí nghiệm theo Bảng 3.5

**Bảng 3.5: Bố trí thí nghiệm khảo sát tình hình nhiễm OTA của một số mẫu trên thị trường**

STT	Mẫu	Lượng OTA (ng) theo kết quả huỳnh quang
1	Cà phê Hiệp Nga	
2	Vinacafe	
3	Millo	
4	Bột ngũ cốc	
5	Nescafe	
6	Bắp (mua ngoài chợ)	
7	Bắp (Viện Pasteur)	
8	Đậu nành (Viện Pasteur)	
9	Tầm (Viện Pasteur)	
10	Bia Sài Gòn (333)	

### 3.4 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel 2003.

## Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1 Tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch

Cột nhựa có kích thước 0,4 x 10 cm.

Nồng độ kháng thể kháng OTA gắn lên cột bằng 5 mg/ml gel Sepharose 4B, có khả năng bắt giữ OTA.



Hình 4.1: Cột IAC

### 4.2 Xây dựng mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA (đo bằng huỳnh quang kế) trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế (methanol).

Tiến hành xây dựng mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA trong methanol (dịch đẩy thay thế) và dịch đẩy chuẩn. Từ đó, tiến hành đẩy bằng methanol trong các thí nghiệm sau và suy ra được lượng OTA chính xác.

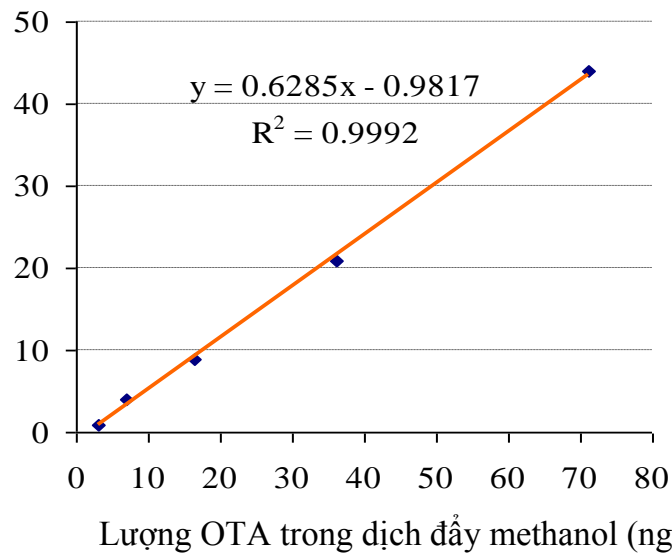
Pha dung dịch OTA nồng độ 0,25 ppm từ dung dịch OTA chuẩn 10 ppm. Định lượng bằng huỳnh quang kế lượng đã biết trước (2,5; 5; 10; 20 và 40 ng) trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế (methanol).

Kết quả xây dựng mối tương quan được trình bày ở Bảng 4.1 và Biểu đồ 4.1

**Bảng 4.1: Mối tương quan giữa lượng OTA trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế**

Lượng OTA (ng)	n	Lượng OTA dựa trên kết quả huỳnh quang					
		Trong dịch đẩy methanol			Trong dịch đẩy chuẩn		
		Lượng OTA (ng)	SD	Cv	Lượng OTA (ng)	SD	Cv
2,5	2	3	0	0	1	0	0
5	2	7	1	14,3	4	0	0
10	2	16,5	0,7	4,2	9	0	0
20	2	36	1,4	3,9	21	0	0
40	2	71	1,4	1,97	44	0	0

Lượng OTA trong dịch đẩy chuẩn (ng)



**Biểu đồ 4.1: Mối tương quan giữa lượng OTA trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế dựa trên kết quả huỳnh quang**

Nhận xét:

- Độ lệch chuẩn (SD) nói lên mức độ chênh lệch giữa các số liệu; số liệu càng rời rạc thì SD càng lớn, ngược lại số liệu càng tập trung thì SD càng nhỏ [8]. Bảng 4.1, SD biến thiên từ 0 – 1,4 và có thể thấy với lượng OTA càng lớn thì SD càng tăng tương ứng với mức độ sai số xảy ra càng cao. Các sai số có thể là thao tác hút bằng micropipet không chuẩn xác, sự thất thoát OTA trong quá trình thực hiện...
- Hệ số biến động (CV) là một chỉ số khá tốt để đánh giá độ chính xác và tính khách quan của các số liệu thu thập được. Phạm vi chấp nhận được của hệ số biến động là nhỏ hơn 20% [8]. Bảng 4.1, CV nhỏ hơn 20% (0 – 14,3%) nên đạt mức chấp nhận trong phân tích.
- Biểu đồ 4.1 đã thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA đo bằng huỳnh quang kể trong dịch đẩy chuẩn và dịch đẩy thay thế qua phương trình:  

$$y = 0,6285x - 0,9817 \text{ với } R^2 = 0,9992$$
- Dựa trên mối tương quan tuyến tính, tiến hành đẩy OTA bằng dịch đẩy thay thế (methanol) trong các thí nghiệm sau, từ đó suy ra lượng OTA chính xác

### 4.3 Dựng đường chuẩn OTA

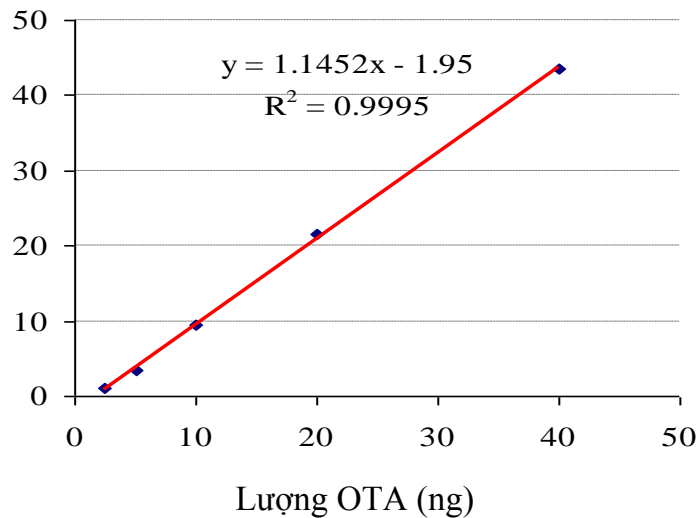
Pha dung dịch OTA nồng độ 0,25 ppm từ dung dịch OTA chuẩn 10 ppm. Định lượng bằng huỳnh quang kế lượng đã biết trước (2,5; 5; 10; 20 và 40 ng), mỗi nồng độ thực hiện 2 lần, dựng đường chuẩn bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2003.

Kết quả dựng đường chuẩn được trình bày ở Bảng 4.2 và Biểu đồ 4.2

**Bảng 4.2: Kết quả dựng đường chuẩn OTA**

Lượng OTA (ng)	(n)	Kết quả huỳnh quang		
		Lượng OTA (ng)	SD	Cv
2,5	2	1	0	0
5	2	3,4	0,6	17,6
10	2	9,4	0,44	4,7
20	2	21,6	0,79	3,6
40	2	43,6	0,79	1,8

Lượng OAT theo huỳnh quang (ng)



Biểu đồ 4.2: Đường chuẩn OTA

Nhận xét:

- Bảng 4.2, SD biến thiên từ 0 – 0,79 và có thể thấy với lượng OTA càng lớn thì SD càng tăng tương ứng với mức độ sai số xảy ra càng cao.
- Bảng 4.2, CV nhỏ hơn 20% (0 – 14,3%) nên đạt mức chấp nhận trong phân tích.
- Biểu đồ 4.2 thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa lượng OTA đo bằng huỳnh quang kế với lượng OTA trong mẫu chuẩn qua phương trình:

$$y = 1,1452x - 1,95 \text{ với } R^2 = 0,9995$$

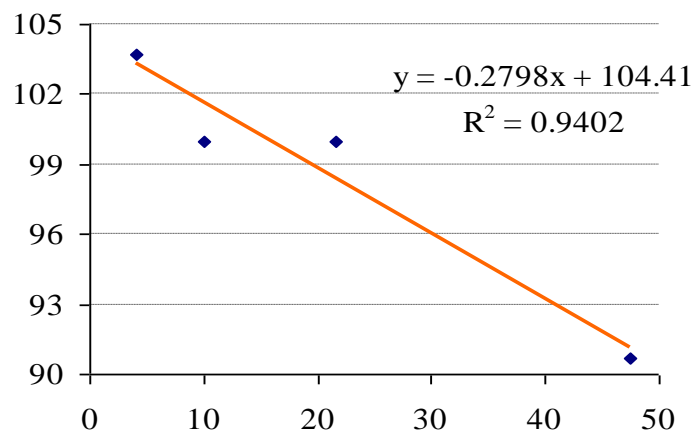
#### 4.4 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng

Cho OTA đã biết trước ở các hàm lượng qua cột IAC theo quy trình (3.3.4), mỗi lượng thực hiện 2 lần. Tiến hành định lượng bằng huỳnh quang kế lượng OTA trước khi qua cột và sau khi thu hồi. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.3 và Biểu đồ 4.3

Bảng 4.3: Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng

Lượng OTA trước qua cột (ng)	N	Lượng OTA thu hồi trung bình (ng)	Hiệu suất thu hồi trung bình (%)	SD	CV
4,02	2	4,17	103,73	0,1	2,44
10,02	2	10,02	100	0	0
21,65	2	21,64	99,95	0	0
47,42	2	43,02	90,72	3,1	6,86

Hiệu suất thu hồi (%)



Lượng OTA qua IAC (ng)

**Biểu đồ 4.3: Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu trắng**

Nhận xét:

- Hiệu suất thu hồi đánh giá khả năng bắt giữ OTA của cột IAC, hiệu suất có thể chấp nhận ở mức 80%. Theo Biểu đồ 4.3 và Bảng 4.3 thì hiệu suất thu hồi càng giảm khi lượng OTA cho qua cột tăng, và hiệu suất thu hồi trong điều kiện mẫu trắng là đạt yêu cầu (90,72 – 103,73%).

- Bảng 4.3, CV nhỏ hơn 20% (2,44 – 6,86%), SD thấp (0,1 – 3,1) nên đạt mức chấp nhận trong phân tích.
- Biểu đồ 4.3 thể hiện được mối liên hệ tuyến tính giữa lượng OTA cho qua cột và hiệu suất thu hồi của cột qua phương trình:

$$y = - 0,2798 x + 104,41 \text{ với } R^2 = 0,9833$$

#### 4.5 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu bia

Gây nhiễm mẫu bia bằng cách thêm OTA vào 5 ml bia lượng đã biết trước các hàm lượng, cho qua cột IAC theo quy trình (phụ lục 2), mỗi lượng thực hiện 2 lần. Tiến hành định lượng bằng huỳnh quang kế lượng OTA trước khi qua cột và sau khi thu hồi.

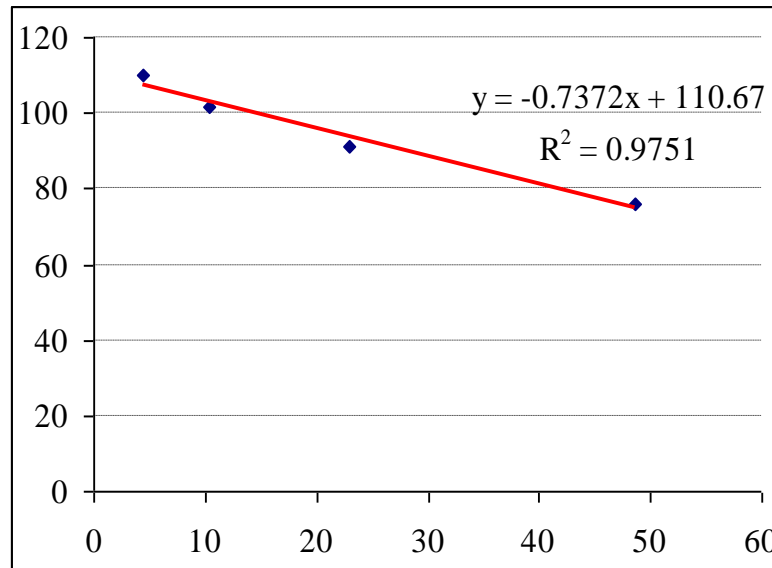
Kết quả được trình bày ở Bảng 4.4 và Biểu đồ 4.4

**Bảng 4.4 Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu bia**

Lượng OTA nhiễm vào 5ml bia (ng)	n	Lượng OTA thu hồi trung bình (ng)	Hiệu suất thu hồi trung bình (%)	SD	CV
4,42	2	4,86	109,95	0,3	6,47
10,33	2	10,52	101,84	0,13	1,25
22,9	2	20,89	91,22	1,42	6,49
48,67	2	37	76,02	8,2	19,14

Hiệu suất thu hồi (%)





Lượng OTA qua IAC (ng)

**Biểu đồ 4.4: Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu bia**

Nhận xét:

- Theo Biểu đồ 4.4 và Bảng 4.4 thì hiệu suất thu hồi càng giảm khi lượng OTA cho qua cột càng tăng, hiệu suất thu hồi khi mẫu nền là bia đạt yêu cầu khi lượng mẫu nhiễm nhỏ hơn 22,9 ng (91,22 – 109%), ở lượng cao hơn (> 48 ng) thì hiệu suất thu hồi giảm (76,02%).
- Sự chênh lệch về hiệu suất thu hồi ở mẫu nền là bia và không có mẫu nền có thể là do lượng OTA bị thất thoát trong quá trình chiết mẫu và thao tác pipet không chuẩn xác.
- Ở Bảng 4.4, CV < 20% (6,47 – 19,14%), SD thấp (0,1 – 8,2) nên đạt mức chấp nhận trong phân tích.
- Biểu đồ 4.4 thể hiện được mối liên hệ tuyến tính giữa lượng OTA cho qua cột và hiệu suất thu hồi của cột qua phương trình:

$$y = - 0,7372 x + 110,67 \text{ với } R^2 = 0,9751$$

#### 4.6 Tình hình nhiễm OTA của một số mẫu thực phẩm trên thị trường

Thu thập mẫu, thực hiện theo quy trình chiết và tinh chế IAC, sau đó định lượng bằng huỳnh quang kế.

Kết quả kiểm tra được trình bày ở Bảng 4.5

**Bảng 4.5: Tình hình nhiễm OTA của một số mẫu thực phẩm trên thị trường**

STT	Mẫu	Lượng OTA (ng /1 ml mẫu)
1	Cà phê Hiệp Nga	14,88
2	Vinacafe	4,05
3	Millo	2,12
4	Bột ngũ cốc	2,43
5	Nescafe	0,99
6	Bắp (mua ngoài chợ)	9,9
7	Bắp (Viện Pasteur)	1,43
8	Đậu nành (Viện Pasteur)	1,99
9	Tắm (Viện Pasteur)	2,3
10	Bia Sài Gòn (333)	0

Qua kết quả Bảng 4.5, nhận thấy tình hình nhiễm OTA trên thị trường rất nhiều. Vì vậy công tác định lượng OTA bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch là rất cần thiết.

## **Chương 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

### **5.1 Kết luận**

Tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch (IAC) có kích thước 0,4 cm x 10 cm với nồng độ kháng thể kháng OTA là 5 mg/ml gel Sepharose 4B, có khả năng bắt giữ OTA đạt yêu cầu.

Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với OTA chuẩn tốt (trên 90%).

Hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với mẫu tự tạo (bia) đạt yêu cầu khi lượng OTA qua cột trong khoảng từ 0 – 20 ng.

### **5.2 Đề nghị**

Nếu có điều kiện chúng tôi đề nghị tiến hành thử nghiệm xác định các thông số kĩ thuật của cột như: dung tích cột, độ nhậy và độ lặp lại của cột để có thể kết luận thuyết phục về khả năng bắt OTA của cột IAC.

## TÀI LIỆU KHAM KHẢO

### TIẾNG VIỆT

1. Âu Thị Ngọc Ánh, 2005. *Dùng cột sắc ký ái lực miễn dịch và huỳnh quang kế định lượng Aflatoxin G1*. Khóa luận tốt nghiệp, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
2. Dương Ngọc Diễm, 2003. *Tạo kháng thể kháng ochratoxin và giá ái lực bắt ochratoxin*. Khóa luận tốt nghiệp, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
3. Nguyễn Lâm Dũng – Nguyễn Đình Quyến – Phạm Văn Ty, 2000. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo Dục.
4. Bùi Xuân Đồng, 2003. *Nguyên lý phòng chống nấm mốc và mycotoxin*. Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật Hà Nội.
5. Đậu Ngọc Hào và Lê Thị Ngọc Diệp, 2003. *Nấm mốc và độc tố aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội. 210 trang.
6. Từ Thị Hường và cộng sự. *Nghiên cứu hệ nấm mốc và định lượng OTA trong cà phê nhân ROBUSTA*. Viện vệ sinh y tế công cộng.
7. Nguyễn Ngọc Kiêng, 2000. *Toán – Thống kê sinh vật, lý thuyết xác suất*. Trường Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
8. Đỗ Ngọc Liên, 2004. *Thực hành hóa sinh miễn dịch*. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia Hà Nội.
9. Lương Đức Phẩm, 2002. *Vi sinh học và vệ sinh an toàn thực phẩm*. Nhà xuất bản Hà Nội.
10. Nguyễn Xuân Thành – Nguyễn Như Thành – Dương Đức Tiến, 2004. *Vi sinh vật học nông nghiệp*. Nhà xuất bản Đại Học Sư Phạm. Dự án đào tạo giáo viên trung học cơ sở.

**TIẾNG ANH**

11. E. Pardo, S. Marín, A.J. Ramos and V. Sanchis, *Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins*. Food Technology Department, Universitat de Lleida, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain, 2004.
12. Hana Valenta, 1998. *Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids*. *Journal of chromatography A*, 815, 75 – 92.
13. Paul Bayman et al, 2001. *Ochratoxin production by the Aspergillus ochraceus Group and Aspergillus alliaceus*. *Applied and environmental microbiology*, May 2002, Vol. 68, No. 5, p. 2326 – 2329.
14. Rita Serra, Ana Braga, Armando Venancio, 2005. *Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A*. *Research in Microbiology* 156 (2005) 515 – 521.

**TRANG WEB**

15. [www.univ-brest.fr/.../fiches/fusagramin.html](http://www.univ-brest.fr/.../fiches/fusagramin.html).
16. [www.dehs.umn.edu/.../verrucosum/meath.jpg](http://www.dehs.umn.edu/.../verrucosum/meath.jpg).

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1. Quy trình tinh chế kháng thể kháng OTA

#### 1. Quy trình gây miễn dịch thỏ

Thỏ dùng gây miễn dịch phải hoàn toàn khỏe mạnh, 2 – 3 tháng tuổi, trọng lượng trên 2 kg. Tiến hành gây miễn dịch trên 2 thỏ để sản xuất kháng huyết thanh kháng độc tố nấm (ochratoxin A ).

Lấy 1 ml máu tại trước khi tiêm mũi miễn cảm để làm đối chứng. Các mũi tiêm 1, 2, 3, 4 và 5 lần lượt cách nhau 28 ngày và sau 14 ngày của các mũi tiêm tiến hành lấy máu, ly tâm, tách huyết thanh, bảo quản ở (- 20°C).

#### Mũi miễn cảm

Cho NaCl 0,9% và cộng hợp OTA – BSA 2500 µg/ml vào ống, thêm tá chất hoàn toàn vào với cùng thể tích, vortex 30 phút. Thu được huyền dịch OTA – BSA, lấy 2 ml cho vào ống tiêm (tương ứng 300 µg OTA – BSA).

Tiêm nhiều mũi trên lưng, còn lại 100 µl huyền dịch tiêm vào đùi. Ở đùi còn lại tiêm 100 µl vaccin ho gà.

#### Mũi nhắc lại 1, 2, 3, 4, 5

Quy trình tiêm tương tự nhưng lượng kháng nguyên OTA-BSA giảm dần (lần 1:150 µg OTA – BSA, lần 2 – 5: 125 µg OTA – BSA ). Sử dụng tá chất không hoàn toàn và không có vaccine ho gà.

Sau mũi nhắc lại thứ 3, tiến hành lấy máu thỏ tinh chế kháng thể và tạo cột IAC.

Theo dõi đáp ứng miễn dịch và kiểm tra chất lượng kháng thể

Theo dõi đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp khuếch tán kép trên thạch

Huyết thanh sau mũi nhắc lại thứ 3 được làm phản ứng khuếch tán kép.

1g agarose được hòa tan trong 100 ml đệm phosphat, pH = 7,2. Đun đến khi agarose tan hoàn toàn. Đổ thạch 6,5 cm x 6 cm, dày 3 mm trên tấm film trong, tạo các giếng trên thạch.

Sau đó cho kháng nguyên và kháng thể vào giếng tương ứng, ủ buồng ẩm 4°C. Khoảng 24 – 48 giờ quan sát đường tua, ép khô thạch và nhuộm với đỏ Ponceau S 0,2%. Sau đó rửa với nước và để khô tự nhiên.

Kiểm tra chất lượng kháng thể

Dùng phương pháp Bradford định lượng protein và điện di trên thạch SDS – polyacrylamide để kiểm tra chất lượng kháng thể.

## 2. Tinh chế kháng thể kháng OTA

Tinh chế kháng thể kháng OTA bằng cách tủa huyết thanh với amoniumsulfate 45%<sub>S</sub>, sau đó loại bỏ kháng thể kháng BSA bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch với cộng hợp gel CNBr – activated Sepharose 4B – BSA.

Khi đó, chỉ có các kháng thể kháng OTA đi qua cột còn các loại kháng thể còn lại bị giữ lại do tương tác kháng nguyên – kháng thể của BSA.

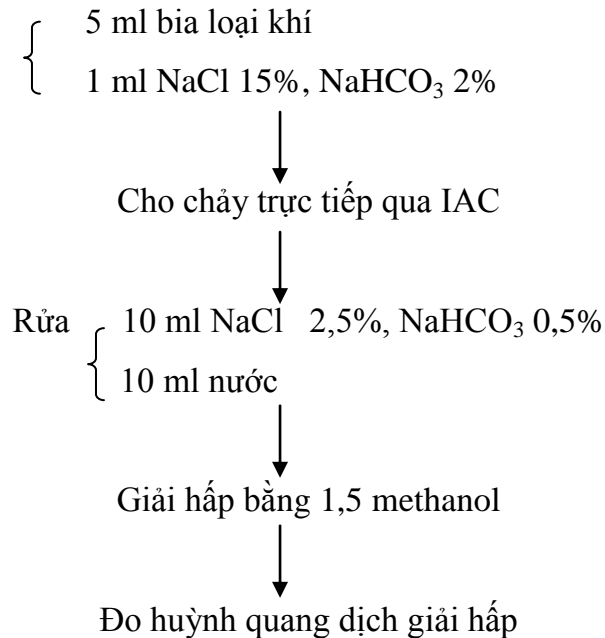
## 3. Cộng hợp IgG<sub>OTA</sub> lên polymer Sepharose 4B và tạo cột IAC

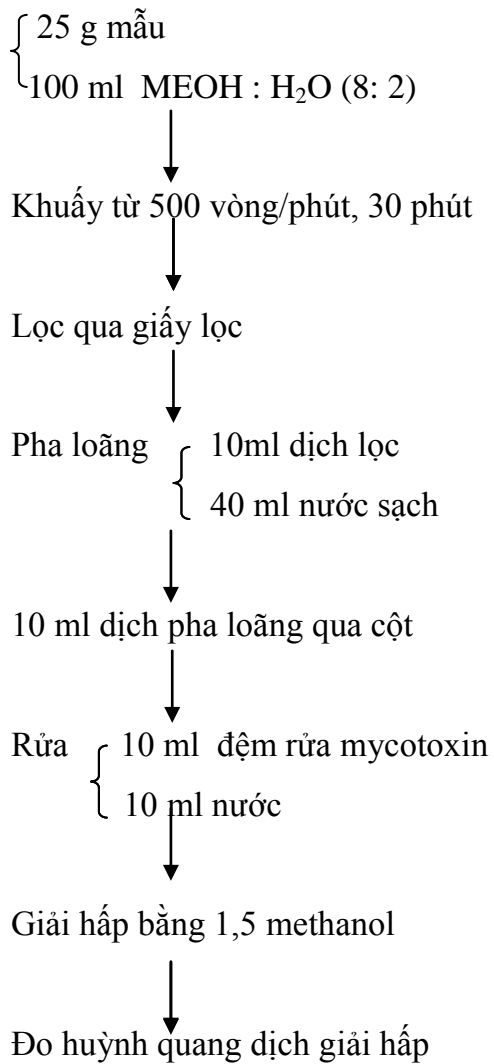
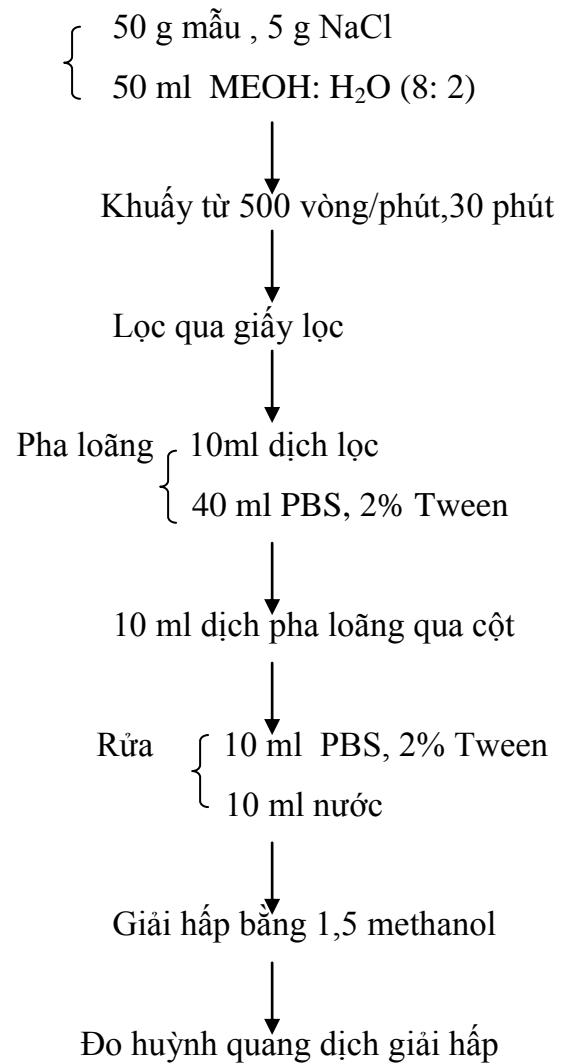
Tiến hành cộng hợp IgG<sub>OTA</sub> lên polymer Sepharose 4B và tạo cột IAC

Cột được bảo quản ở nhiệt độ 4<sup>0</sup>C – 8<sup>0</sup>C. Giá ái lực miễn dịch giữ hoạt tính ổn định ít nhất 1 năm

Phụ lục 2. Quy trình chiết OTA đối với một số mẫu thực phẩm

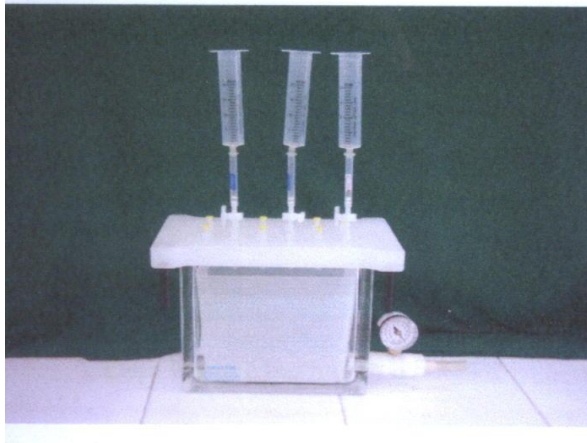
### 1. Mẫu bia:



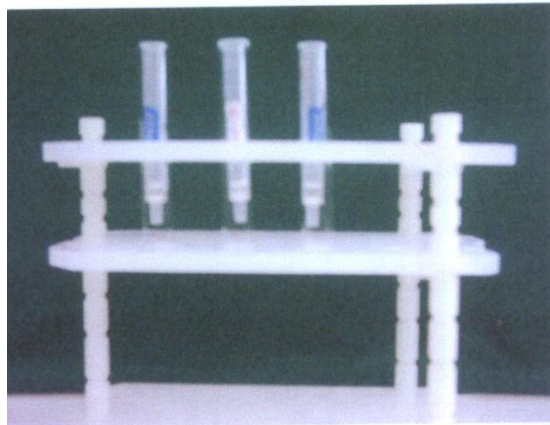
**2. Mẫu cà phê :****3. Mẫu bắp:****Phụ lục 3. Các giai đoạn phân tích OTA bằng cột IAC và huỳnh quang kế**



### 1. Chiết mẫu và lọc dịch chiết



### 2. Cho dịch chiết chảy qua cột IAC



Giải hấp

### 3. Giải hấp



### 4. Định lượng bằng huỳnh quang kế

