



Original Article

# Factors Affecting the Output Signal of the Electrochemical Immunosensor Based on Chicken Egg Yolk Antibody for Detecting Newcastle Disease Virus

Tran Thi Luyen<sup>1,\*</sup>, Huynh Dang Chinh<sup>1</sup>, Tran Quang Think<sup>2</sup>, Mai Anh Tuan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>National Centre for Technological Progress, 25 Le Thanh Tong, Hanoi, Vietnam

Received 26 February 2020

Revised 03 November 2020; Accepted 09 November 2020

**Abstract:** In this study, the electrochemical immunosensor for detecting Newcastle disease virus using the chicken egg yolk antibodies (IgY) was developed. The developed immunosensor was built into a three-electrode system consisting of two gold electrodes (a working electrode and a counter electrode) and a quasi-reference Ag/AgCl electrode. The IgY antibodies against Newcastle disease virus were immobilized on the working electrode (immunosensor) and the effect of the antibody concentration and virus incubation time on the output signal of the immunosensors was investigated. The investigation results show that when the antibody concentration was 60  $\mu\text{g/mL}$  and the virus incubation time was 1 hour, the output signal of the immunosensors reached its maximum value ( $\Delta I_{\text{peak}} = 0.1602$ ). The detection limit of the sensors was  $10^2$  EID50/mL (EID50: 50% Empryo Infective Dose) at 25 °C. There was a good linear relationship between the  $\Delta I_{\text{peak}}$  and the logarithm of the virus Newcastle concentration in the range from  $10^2$  to  $10^6$  EID50/mL. The linear equation is  $\Delta I_{\text{peak}} = 0.0280 \log N - 0.00368$  with the correlation coefficient of  $R^2 = 0.9972$ .

**Keywords:** Electrochemical immunosensor, IgY antibody, Newcastle Disease virus (NDV), microchamber

\* Corresponding author.

Email address: [luyen.tranthi@hust.edu.vn](mailto:luyen.tranthi@hust.edu.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5005>

# Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến tín hiệu ra của cảm biến miễn dịch điện hóa phát hiện virus Newcastle trên cơ sở kháng thể IgY chiết xuất trực tiếp từ trứng gà

Trần Thị Luyen<sup>1,\*</sup>, Huỳnh Đăng Chính<sup>1</sup>, Trần Quang Thịnh<sup>2</sup>, Mai Anh Tuấn<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Ứng dụng Công nghệ, 25 Lê Thánh Tông, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 26 tháng 02 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 03 tháng 11 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 09 tháng 11 năm 2020

**Tóm tắt:** Cảm biến miễn dịch điện hóa phát hiện virus Newcastle được phát triển trên cơ sở kháng thể IgY chiết xuất trực tiếp từ trứng gà thay vì sử dụng kháng thể IgG tinh chế với qui trình tách chiết phức tạp đòi hỏi chi phí cao và thời gian dài. Hệ ba điện cực bao gồm hai điện cực vàng (điện cực làm việc, điện cực đối) và điện cực so sánh thay thế Ag/AgCl được thiết kế, chế tạo và tích hợp với một bình phản ứng mini. Kháng thể IgY kháng virus Newcastle được cố định lên trên bề mặt điện cực làm việc (cảm biến miễn dịch). Các yếu tố ảnh hưởng đến tín hiệu ra của cảm biến miễn dịch điện hóa tích hợp bình phản ứng mini đã chế tạo được tập trung nghiên cứu sử dụng phương pháp CV (Cyclic Voltammetry). Kết quả cho thấy, khi nồng độ kháng thể được cố định là 60 µg/mL, thời gian bắt cặp kháng thể - virus là 1 giờ, tín hiệu đầu ra của cảm biến đạt giá trị cực đại ( $\Delta I_{\text{peak}} = 0,1602$ ). Giới hạn phát hiện của cảm biến là  $10^2$  EID50/mL (EID50: 50% Empryo Infective Dose - Liều nhiễm trùng trên phôi) tại 25 °C. Cảm biến đạt tuyến tính tốt trong khoảng hàm lượng virus Newcastle từ  $10^2$  đến  $10^6$  EID50/mL với phương trình liên hệ:  $\Delta I_{\text{peak}} = 0,0280 \log N - 0,00368$  và  $R^2 = 0,9972$ .

**Từ khóa:** cảm biến miễn dịch điện hóa, kháng thể IgY, virus Newcastle, bình phản ứng mini.

## 1. Mở đầu

Cảm biến sinh học đã và đang chứng minh được khả năng ứng dụng phong phú trong rất nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong phát hiện virus gây bệnh, chẩn đoán lâm sàng, giám sát môi trường, kiểm soát an toàn thực phẩm, ... [1]. Cảm biến sinh học là thiết bị tích hợp có khả năng cung cấp thông tin phân tích định lượng hoặc bán định lượng đặc trưng, bao gồm một phần tử nhận biết sinh học (bioreceptor) kết hợp trực tiếp với một phần tử chuyển đổi (transducer). Chất được gắn trên bộ phận chuyển đổi được gọi là “phần

tử dò/phần tử nhận biết sinh học”, chất cần phân tích trong mẫu được gọi là “phần tử đích”.

Nguyên lý hoạt động của cảm biến sinh học là dựa trên các phản ứng đặc hiệu: kháng nguyên - kháng thể (cảm biến miễn dịch), lai hóa DNA (cảm biến DNA) hoặc enzym - cơ chất (cảm biến enzyme). Trên cơ sở các phản ứng đặc hiệu này, phần tử nhận biết sinh học giữ vai trò dò tìm đối tượng đích trong mẫu phân tích và phần tử chuyển đổi giữ vai trò chuyển đổi tương tác sinh học thành tín hiệu điện hóa, quang, nhiệt, ... sau đó đưa qua bộ phận xử lý tín hiệu và hiển thị kết quả đo.

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: luyen.tranthi@hust.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5005>

Cảm biến miễn dịch, một loại cảm biến sinh học, hoạt động trên cơ sở phản ứng đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể, là một trong những thiết bị có khả năng ứng dụng hiệu quả trong phát hiện các bệnh truyền nhiễm do virus nói chung với những ưu điểm: thời gian phát hiện nhanh, độ nhạy và độ chọn lọc cao, thao tác mẫu dễ dàng [2,3]. Trong nghiên cứu trước của chúng tôi, cảm biến miễn dịch điện hóa tích hợp bình phản ứng mini đã được chế tạo và thử nghiệm trong phát hiện virus Newcastle. Kháng thể IgY kháng virus Newcastle chiết xuất trực tiếp từ trứng gà đã được cố định thành công lên trên bề mặt điện cực vàng (cảm biến miễn dịch) thay vì sử dụng kháng thể IgG tinh chế với quy trình tách chiết phức tạp đòi hỏi chi phí cao và thời gian dài. Kết quả thử nghiệm bước đầu cho thấy cảm biến có phản ứng tương đối tốt và đặc hiệu với virus Newcastle [4]. Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến tín hiệu đầu ra của cảm biến phát hiện virus Newcastle trên cơ sở kháng thể IgY chiết xuất trực tiếp từ trứng gà tiếp tục được khảo sát nhằm tìm ra những điều kiện tối ưu giúp nâng cao độ nhạy của cảm biến. Đồng thời, giới hạn phát hiện và khoảng tuyến tính của cảm biến miễn dịch điện hóa đã chế tạo cũng là những thông số được tập trung nghiên cứu.

## 2. Thực nghiệm

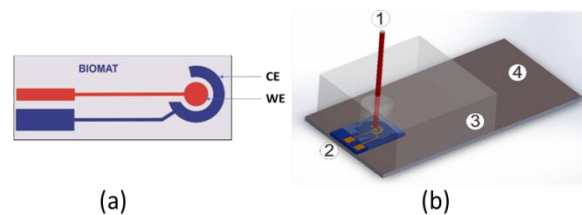
### 2.1. Hóa chất

Protein A, BSA (Bovine Serum Albumin) và đệm phốt phát PBS (pH = 7,4) được cung cấp bởi Sigma (Hoa Kỳ). GA (Glutaraldehyde) do Prolabo (Pháp) sản xuất. Các hóa chất phụ trợ như KCl, N<sub>2</sub>: 99,9 %, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> và K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> đều đạt chuẩn phân tích.

Kháng thể IgY kháng kháng nguyên virus Newcastle chủng M được cung cấp bởi công ty cổ phần công nghệ sinh học thú y BTV (Biotech-Vet), nhà máy sản xuất thuốc thú y tại Biên Giang, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam. Vacxin Newcastle (virus vô hoạt) hệ 1, chủng M được cung cấp bởi công ty cổ phần dược và vật tư thú y Hanviet, Việt Nam, lưu giữ ở -15 °C trước khi sử dụng.

### 2.2. Thiết kế và chế tạo hệ điện cực tích hợp bình phản ứng mini

Hệ điện cực được thiết kế và chế tạo bao gồm ba điện cực: điện cực làm việc (WE)/cảm biến miễn dịch (cố định kháng nguyên, kháng thể); điện cực đối (CE); và điện cực tham chiếu (so sánh) (RE). Hai điện cực vàng WE và CE được tích hợp lên trên cùng một chip, Hình 1a. Kích thước của chip là 12 x 3,6 mm, đường kính của WE là 1 mm, diện tích của WE là:  $\pi R^2 = \pi 0,5^2 = 0,785 \text{ mm}^2$ . Trong thiết kế này, diện tích CE lớn hơn của WE khoảng 5 lần.



Hình 1. (a): Hai điện cực vàng tích hợp (WE và CE); (b): Bình phản ứng mini: (1)- Điện cực so sánh Ag/AgCl, (2)-Điện cực vàng, (3)-PDMS (Polydimethylsiloxane), (4)-đế thủy tinh.

Điện cực so sánh thay thế Ag/AgCl được chế tạo bằng cách nhúng dây Ag vào dung dịch FeCl<sub>3</sub> 0,1 M trong 3 phút nhằm tạo ra một lớp muối AgCl phủ trên dây Ag. Sau đó, điện cực được rửa sạch nhiều lần bằng nước khử ion và được làm khô bằng dòng khí N<sub>2</sub>. Điện cực so sánh thay thế Ag/AgCl được chế tạo với kích thước rất nhỏ gọn (đường kính 1 mm, chiều dài 10 mm). Thiết kế này cho phép ghép nối với một bình phản ứng mini có thể tích nhỏ dao động từ 100 µL tới 1 mL, cho phép thực hiện các phép đo với lượng mẫu rất nhỏ, đồng thời đảm bảo độ chính xác cao, Hình 1b.

### 2.3. Cố định kháng thể trên bề mặt cảm biến

Bề mặt điện cực vàng trước tiên được làm sạch bằng dung dịch K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (bão hòa), được hoạt hóa điện hóa trong dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M bằng kỹ thuật điện hóa quét thể tuần hoàn với điện áp từ -0,5 V đến 1 V, tốc độ quét 50 mV/s cho đến khi CV đặc trưng ổn định. Sau đó, điện cực vàng được ủ với 20 µL dung dịch PrA (1 mg/mL) ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, tiếp tục được ủ với 20µL dung dịch GA 5% (30 phút,

nhệt độ phòng), cuối cùng, điện cực được ủ với 20  $\mu\text{L}$  kháng thể (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ở 4  $^{\circ}\text{C}$  trong 3 giờ. Sau khi kháng thể được cố định lên bề mặt điện cực, 20  $\mu\text{L}$  BSA 1% được sử dụng để khóa phủ các vị trí không đặc hiệu (30 phút, nhiệt độ phòng). Sau mỗi bước cố định, điện cực đều được rửa sạch bằng nước khử ion và được sấy khô bằng khí  $\text{N}_2$  nhằm loại bỏ những phần tử không tương tác hoặc tương tác yếu.

#### 2.4. Phát hiện virus (bất hoạt) sử dụng cảm biến miễn dịch điện hóa

Mẫu virus chuẩn được sử dụng và pha loãng trong dung dịch đệm PBS (nồng độ 0,01 M và giá trị pH = 7,4). 20  $\mu\text{L}$  virus bất hoạt Newcastle được nhỏ lên trên điện cực ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, điện cực được rửa với nước khử ion để loại bỏ những phần tử đích không tương tác hoặc tương tác yếu. Quá trình đo CV (Cyclic Voltammetry) được thực hiện trên hệ điện hóa EC301 từ Stanford Research Systems.

Bình điện hóa sử dụng ba điện cực: điện cực làm việc (WE) là điện cực cảm biến miễn dịch/virus, điện cực đối (CE) là điện cực Au tích hợp và điện cực so sánh (RE) là điện cực so sánh thay thế Ag/AgCl, Hình 1b. Dung dịch điện li gồm  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,03, KCl 0,1 M, khoảng quét thế từ -0,2 đến 0,5 V và tốc độ quét 25 mV/s. Từ các đường CV thực nghiệm có thể xác định được giá trị dòng cực đại  $I_{\text{peak}}$  và  $\Delta I_{\text{peak}}$  theo các công thức sau [5]:

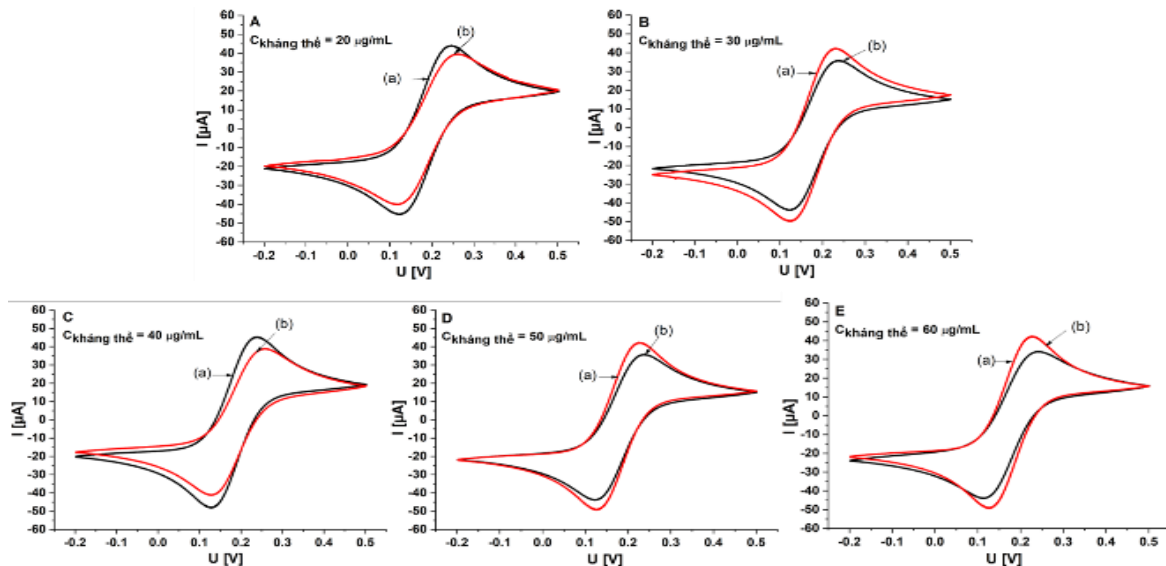
$$I_{\text{peak}} = I_{p,a} - I_{p,c} \quad (1)$$

$$\Delta I_{\text{peak}} = \frac{I_{\text{peak}}(0) - I_{\text{peak}}(i)}{I_{\text{peak}}(0)} \quad (2)$$

Trong đó:  $I_{\text{peak}}(0)$  là dòng cực đại của điện cực Au/PrA/GA/Ab/BSA (cảm biến miễn dịch);  $I_{\text{peak}}(i)$  là dòng cực đại của điện cực Au/PrA/GA/Ab/BSA/Ag (cảm biến miễn dịch/virus Newcastle).

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ kháng thể



Hình 2. Đường CV của điện cực: (a): cảm biến miễn dịch và (b): cảm biến miễn dịch/virus Newcastle trong dung dịch  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,03 M, KCl 0,1 M khi thay đổi nồng độ kháng thể được cố định trên bề mặt cảm biến: (A): 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (B): 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (C): 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (D): 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và (E): 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

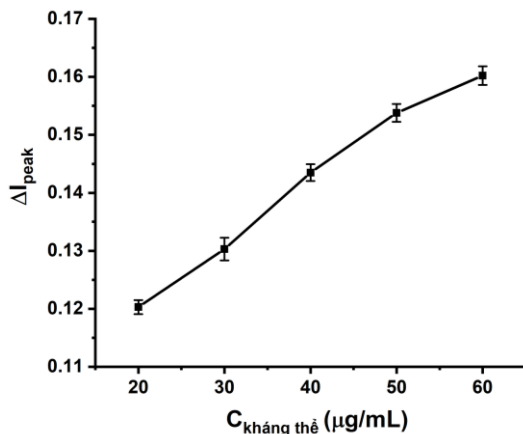
Ảnh hưởng của nồng độ kháng thể đến tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch được khảo sát bằng cách thay đổi nồng độ kháng thể được cố định trên bề mặt cảm biến. Sau đó, thực hiện các phép đo CV trong dung dịch điện li  $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$  0,03 M, KCl 0,1 M, tốc độ quét 25 mV/s, khoảng thế quét từ -0,2 V đến 0,5 V đối với các cảm biến trước và sau khi cảm biến được ngâm trong dung dịch virus  $10^6$  EID50/mL (PBS, pH = 7,4), thời gian 1 giờ. Hình 2 biểu diễn các đường CV của điện cực:

(a): cảm biến miễn dịch và (b): cảm biến miễn dịch/virus Newcastle trong dung dịch  $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$  0,03 M, KCl 0,1 M khi thay đổi nồng độ kháng thể được cố định trên bề mặt cảm biến: (A): 20  $\mu\text{g/mL}$ , (B): 30  $\mu\text{g/mL}$ , (C): 40  $\mu\text{g/mL}$ , (D): 50  $\mu\text{g/mL}$  và (E): 60  $\mu\text{g/mL}$ .

Từ các đường CV thực nghiệm, có thể tính toán để thu được các giá trị  $I_{p,a}$  và  $\Delta I_{p,peak}$  theo các công thức (1) và (2), Bảng 1.

Bảng 1. Các giá trị  $I_{p,a}$ ,  $I_{p,c}$ ,  $I_{p,peak}$  và  $\Delta I_{p,peak}$  thu được từ kết quả đo CV đối với các điện cực cảm biến miễn dịch và cảm biến miễn dịch/virus Newcastle khi thay đổi nồng độ kháng thể được cố định trên bề mặt cảm biến

Điện cực	$C_{\text{kháng thể}} (\mu\text{g/mL})$	$I_{p,a} (\mu\text{A})$	$I_{p,c} (\mu\text{A})$	$I_{p,peak} (\mu\text{A})$	$\Delta I_{p,peak}$
Cảm biến	20	58,58	-53,63	112,21	
Cảm biến/Virus	20	50,68	-48,03	98,71	0,1203
Cảm biến	30	56,60	-56,92	113,52	
Cảm biến/Virus	30	50,02	-48,71	98,73	0,1303
Cảm biến	40	55,96	-56,60	112,56	
Cảm biến/Virus	40	47,71	-48,70	96,41	0,1435
Cảm biến	50	57,28	-56,60	113,88	
Cảm biến/Virus	50	49,69	-46,68	96,37	0,1538
Cảm biến	60	56,91	-55,96	112,87	
Cảm biến/Virus	60	47,39	-47,39	94,78	0,1602



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ kháng thể (được cố định trên bề mặt cảm biến) đến giá trị  $\Delta I_{p,peak}$  của cảm biến miễn dịch

Hình 3 biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ kháng thể đến tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch ( $\Delta I_{p,peak}$ ). Nhận thấy, khi nồng độ kháng thể tăng từ 20  $\mu\text{g/mL}$  đến 60  $\mu\text{g/mL}$ , tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch ( $\Delta I_{p,peak}$ ) tăng lên. Kết quả

này được giải thích là do khi nồng độ kháng thể tăng, số lượng kháng thể được cố định hiệu quả trên bề mặt cảm biến sẽ tăng lên, nhờ đó, làm tăng xác suất bắt cặp với virus đặc hiệu trong dung dịch.

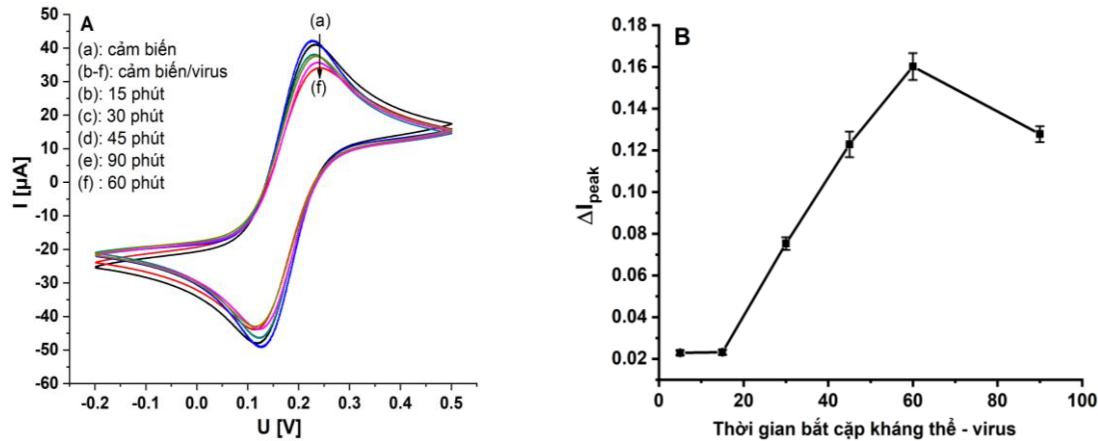
Trong nghiên cứu này, kháng thể được sử dụng làm phân tử dò cho cảm biến miễn dịch là kháng thể kháng virus Newcastle được chiết xuất trực tiếp từ trứng gà và nồng độ 60  $\mu\text{g/mL}$  là giá trị nồng độ kháng thể cao nhất (dung dịch kháng thể được cung cấp bởi nhà sản xuất, khi chưa pha loãng). Do đó, giá trị nồng độ kháng thể 60  $\mu\text{g/mL}$  sẽ được lựa chọn cho những thí nghiệm tiếp sau.

### 3.2. Ảnh hưởng của thời gian bắt cặp kháng thể - virus

Ảnh hưởng của thời gian bắt cặp kháng thể - virus đến tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch được khảo sát sử dụng các cảm biến đã được cố định kháng thể nồng độ 60  $\mu\text{g/mL}$  và thay đổi thời gian ngâm cảm biến trong dung dịch virus

10<sup>6</sup> EID50/mL (PBS, pH = 7,4). Sau đó, thực hiện các phép đo CV trong dung dịch điện li K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0,03 M, KCl 0,1 M, tốc độ quét 25 mV/s, khoảng thế quét từ -0,2 V đến 0,5 V đối với các cảm biến trước và sau khi cảm biến được ngâm trong dung dịch virus. Hình 4A biểu diễn các đường CV của điện cực: (a): cảm

biến miễn dịch và (b-f): cảm biến miễn dịch/virus Newcastle trong dung dịch K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0,03 M, KCl 0,1 M khi thay đổi thời gian bắt cặp kháng thể - virus: (b): 15 phút, (c): 30 phút, (d): 45 phút, (e): 90 phút và (f): 60 phút.



Hình 4. (A): Đường CV của điện cực: (a): cảm biến miễn dịch và (b-f): cảm biến miễn dịch/virus Newcastle trong dung dịch K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0,03 M, KCl 0,1 M khi thay đổi thời gian bắt cặp kháng thể - virus: (b): 15 phút, (c): 30 phút, (d): 45 phút, (e): 90 phút và (f): 60 phút; (B): Ảnh hưởng của thời gian bắt cặp kháng thể - virus đến giá trị ΔI<sub>peak</sub> của cảm biến miễn dịch

Từ các đường CV thực nghiệm, có thể tính toán để thu được các giá trị I<sub>p,a</sub> và ΔI<sub>peak</sub> theo các công thức (1) và (2), Bảng 2. Hình 4B biểu diễn ảnh hưởng của thời gian bắt cặp kháng thể - virus đến giá trị ΔI<sub>peak</sub> của cảm biến miễn dịch. Nhận thấy, khi thời gian bắt cặp kháng thể - virus là từ 5 đến 15 phút, tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch (ΔI<sub>peak</sub>) thấp và gần như không thay đổi. Khi tăng thời gian bắt cặp kháng thể - virus từ 15 đến 60 phút, tín hiệu đầu ra của cảm biến tăng lên và

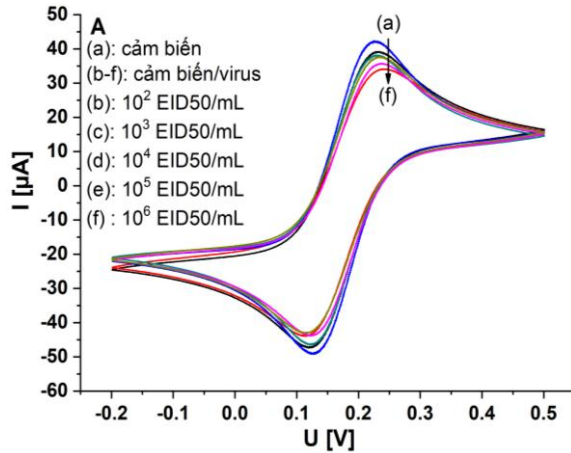
đạt giá trị cực đại (ΔI<sub>peak</sub> = 0,1602) tương ứng với thời gian bắt cặp kháng thể - virus là 60 phút. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng thời gian bắt cặp kháng thể - virus lên 90 phút thì tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch cũng không tăng lên nữa. Như vậy, khoảng thời gian 60 phút là đủ để các liên kết đặc hiệu giữa virus và kháng thể được thiết lập. Do đó, thời gian bắt cặp kháng thể - virus là 60 phút sẽ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp sau.

Bảng 2. Các giá trị I<sub>p,a</sub>, I<sub>p,c</sub>, I<sub>peak</sub> và ΔI<sub>peak</sub> thu được từ kết quả đo CV đối với các điện cực cảm biến miễn dịch và cảm biến miễn dịch/virus Newcastle khi thay đổi thời gian bắt cặp kháng thể - virus

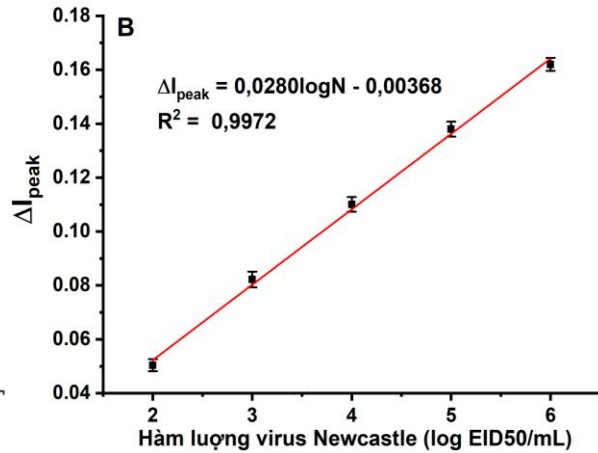
Điện cực	I <sub>p,a</sub> (µA)	I <sub>p,c</sub> (µA)	I <sub>peak</sub> (µA)	ΔI <sub>peak</sub>
Cảm biến	56,71	-55,51	112,22	
Cảm biến/virus Newcastle				
15 phút	55,52	-54,10	109,62	0,0232
30 phút	51,27	-52,50	103,77	0,0753
45 phút	50,18	-48,25	98,43	0,1229
60 phút	46,45	-47,79	94,24	0,1602
90 phút	49,69	-48,19	97,88	0,1278

### 3.3. Đặc trưng tín hiệu tương tác virus-kháng thể

Hình 5A biểu diễn các đường CV của điện cực: (a): cảm biến miễn dịch và (b-f): cảm biến miễn dịch/virus Newcastle trong dung dịch



$K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$  0,03 M, KCl 0,1 M, tốc độ quét 25 mV/s khi thay đổi hàm lượng virus Newcastle: (b):  $10^2$  EID50/mL, (c):  $10^3$  EID50/mL, (d):  $10^4$  EID50/mL, (e):  $10^5$  EID50/mL và (f):  $10^6$  EID50/mL.



Hình 5. (A): Đường CV của điện cực: (a): cảm biến miễn dịch và (b-f): cảm biến miễn dịch/virus Newcastle trong dung dịch  $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$  0,03 M, KCl 0,1 M khi thay đổi hàm lượng virus Newcastle; (B): Sự thay đổi tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch ( $\Delta I_{peak}$ ) phụ thuộc vào hàm lượng virus Newcastle ( $\log EID50/mL$ )

Bảng 3. Các giá trị  $I_{p,a}$ ,  $I_{p,c}$ ,  $I_{peak}$  và  $\Delta I_{peak}$  thu được từ kết quả đo CV đối với các điện cực cảm biến miễn dịch và cảm biến miễn dịch/virus Newcastle khi thay đổi hàm lượng virus Newcastle

Điện cực	$I_{p,a}$ ( $\mu A$ )	$I_{p,c}$ ( $\mu A$ )	$I_{peak}$ ( $\mu A$ )	$\Delta I_{peak}$
Cảm biến	56,39	-57,01	113,40	
Cảm biến/virus Newcastle				
$10^2$ EID50/mL	55,20	-52,49	107,69	0,0504
$10^3$ EID50/mL	51,88	-52,20	104,08	0,0822
$10^4$ EID50/mL	51,56	-49,35	100,91	0,1101
$10^5$ EID50/mL	49,77	-47,98	97,75	0,1380
$10^6$ EID50/mL	46,75	-48,28	95,03	0,1620

Từ các đường CV thực nghiệm có thể tính được các giá trị  $I_{peak}$  và  $\Delta I_{peak}$  theo các công thức (1) và (2) tương ứng với các hàm lượng virus Newcastle khác nhau, Bảng 3. Hình 5B là đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa tín hiệu đầu ra của cảm biến miễn dịch ( $\Delta I_{peak}$ ) và hàm lượng virus Newcastle ( $\log EID50/mL$ ). Hình 5B cho thấy giới hạn phát hiện của cảm biến miễn dịch là  $10^2 EID50/mL$  virus Newcastle. Cảm biến

miễn dịch điện hóa đạt tuyến tính tốt trong khoảng hàm lượng virus Newcastle từ  $10^2$  đến  $10^6$  EID50/mL với phương trình liên hệ là:  $\Delta I_{peak} = 0,0280 \log N - 0,00368$  và bình phương hệ số tương quan ( $R^2$ ) đạt 0,9972.

## 4. Kết luận

Hệ ba điện cực sử dụng PRE Ag/AgCl đã được thiết kế, chế tạo và ghép nối với một bình phản ứng mini, giúp thu nhỏ hệ thống phân tích và giảm lượng mẫu tiêu thụ. Kháng thể IgY kháng virus Newcastle chiết xuất trực tiếp từ trứng gà (do Biotech-Vet cung cấp) được cố định làm phần tử dò cho cảm biến miễn dịch thay vì sử dụng kháng thể IgG tinh chế với quy trình tách chiết phức tạp đòi hỏi chi phí cao và thời gian dài. Cảm biến miễn dịch tích hợp bình phản ứng mini được ứng dụng trong phát hiện virus Newcastle sử dụng phương pháp CV. Khi nồng độ kháng thể được cố định là  $60 \mu g/mL$ , thời gian

bắt cặp kháng thể - virus là 1 giờ, tín hiệu đầu ra của cảm biến đạt giá trị cực đại ( $\Delta I_{\text{peak}} = 0,1602$ ). Giới hạn phát hiện của cảm biến là  $10^2$  EID50/mL tại 25 °C. Cảm biến đạt tuyến tính tốt trong khoảng hàm lượng virus Newcastle từ  $10^2$  đến  $10^6$  EID50/mL với phương trình liên hệ:  $\Delta I_{\text{peak}} = 0,0280 \log N - 0,00368$  và  $R^2 = 0,9972$ . Nghiên cứu có tính mới và mở ra khả năng ứng dụng nhằm đáp ứng một nhu cầu cấp thiết hiện nay là nhu cầu phát hiện nhanh gia cầm bị bệnh để nhanh chóng ngăn ngừa bùng phát dịch, giảm thiểu thiệt hại trong chăn nuôi.

### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 104.03-2019.19.

### Tài liệu tham khảo

- [1] S. Chen, Y.F. Cheng, G. Voordouw, Three-dimensional graphene nanosheet doped with gold nanoparticles as electrochemical DNA biosensor for bacterial detection, *Sensors Actuators B* 262 (2018) 860-868. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.093>.
- [2] J.R. North, Immunosenors: Antibody-based biosensors, *Trends in Biotechnology* 3 (1985) 180-186. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90119-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90119-2).
- [3] B. C. Heinze, Lab-on-a-Chip Optical Immunosensor for Pathogen Detection, The University of Arizona, United States, 2010.
- [4] T.T. Luyen, T.Q. Thinh, T.V. Hoang, N.T.T. Mai, M.A. Tuan, The Development of an Electrochemical Immunosensor Using Chicken Egg Yolk Antibody as a Biological Recognition Element for Detecting Newcastle Disease Virus (in Vietnamese), *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology* 34(2) (2018) 62-68. <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4742>.
- [5] J. Zhou, L. Du, L. Zou, Y. Zou, N. Hu, P. Wang, An ultrasensitive electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on staphylococcal protein A-Au nanoparticle modified gold electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical* 197 (2014) 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.009>.