

# NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHẾ TẠO CỘNG HỢP IGG-FITC DÙNG TRONG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG TRỰC TIẾP ĐỊNH DANH FLAVIVIRUS

NGUYỄN HOÀNG QUÂN, ĐÀO HUY MANH, VŨ ĐÌNH LUÂN,  
HUỖNH THỊ KIM LOAN, VŨ THIÊN THU NGŨ, HUỖNH PHƯƠNG THẢO,  
BÙI CHÍ TÂM, CAO MINH THẮNG, VŨ THỊ QUẾ HƯƠNG.

## TÓM TẮT

Phân lập và định danh virus Dengue là tiêu chuẩn vàng trong công tác giám sát cũng như chẩn đoán bệnh sốt xuất huyết Dengue (SXHD). Cộng hợp IgG-FITC là thành phần quan trọng trong việc định danh flavivirus chủ yếu được cung cấp từ Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật (CDC) Hoa Kỳ. Nghiên cứu quy trình chế tạo cộng hợp IgG-FITC đã được triển khai nhằm từng bước chủ động về mặt sinh phẩm cho xét nghiệm và duy trì công tác giám sát virus học bệnh SXHD ở nước ta. Tế bào u lai (hybridoma) SLE-6B6C được nuôi cấy, tinh chế và thu nhận kháng thể IgG qua hệ thống máy sắc ký ái lực AKTA explorer sử dụng cột Hi trap Protein A. Nghiên cứu đã chế tạo thành công cộng hợp IgG SLE-6B6C-FITC ở hiệu giá chấp nhận được (độ pha loãng 1:320) và độ tương đồng có thể so sánh với cộng hợp do CDC Hoa Kỳ cung cấp (với giá trị  $\kappa = 95\%$ , và Mc Nemar's test).

STUDY OF IgG-FITC CONJUGATE PRODUCTION PROCEDURE FOR FLAVIVIRUS IDENTIFICATION BY DIRECT IMMUNOFLOURESCENT ASSAY (DFA)

## SUMMARY

Virus isolation and identification is the gold standard test in the virus surveillance as well as diagnosis of Dengue hemorrhagic fever (DHF). IgG-FITC conjugate is an important component in flavivirus identification mainly provided from U.S. Centers for Disease Control (USCDC). Study of IgG-FITC conjugate production procedure has been developed for gradually taking the initiative in test biological reagents and maintaining the DHF virus surveillance in country. SLE-6B6C hybridoma cells were cultured then IgG antibody was collected and purified by AKTA explorer column affinity chromatography system using Hi Trap Protein A column. The study has successful producing SLE 6B6C IgG antibody conjugated FITC with acceptable titre (in 1:320 dilution) and comparable agreement with U.S. CDC's conjugate (by Kappa value of 95% and Mc Nemar's test).

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Dengue (DENV) thuộc nhóm *Flavivirus*, họ *Flaviviridae*. Họ *Flavivirus* bao gồm hơn 70 loài hầu hết gây bệnh cho người và động vật. Nhóm *Flavivirus* phân bố ở mọi nơi trên thế giới và gây dịch lớn nhỏ khác nhau ở những vùng khác nhau như virus viêm não Nhật Bản (JEV) gây bệnh ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Sri Lanka; virus miền Tây sông Nil gây bệnh ở châu Phi, Trung Đông, châu Âu; DENV

xuất hiện ở khắp nơi trên thế giới.

Sốt xuất huyết Dengue (SXHD) là bệnh truyền nhiễm cấp tính, gây dịch do DENV gây ra, lan truyền chủ yếu do muỗi *Aedes aegypti*. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), bệnh SXHD hiện diện ở nhiều nước trên thế giới với khoảng 50 triệu người bị nhiễm DENV hàng năm và khoảng 500.000 ca SXHD phải nhập viện. Sốt Dengue (SD) và SXHD xuất hiện đầu tiên ở Việt Nam từ cuối những năm 1950, đến nay đã trở thành bệnh dịch lưu hành quanh năm. SXHD có thể gây bệnh cảnh nguy kịch, hội chứng sốc Dengue (HCSĐ) nhanh chóng dẫn tới tử vong nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời. Với tình hình du lịch, di dân ngày càng gia tăng thì bệnh do các virus này gây ra cũng ngày càng lan rộng và đe dọa nghiêm trọng vấn đề sức khỏe cộng đồng cũng như kinh tế của các quốc gia, trong đó có nước ta.

Ở Việt Nam, hai virus trong nhóm *Flavivirus* gây bệnh chủ yếu hàng năm là DENV và JEV. Trong đó, DENV lưu hành chủ yếu ở miền Nam Việt Nam và gây ra bệnh SD, SXHD có thể dẫn đến sốc Dengue với tỷ lệ tử vong cao và gây thiệt hại lớn về nhiều mặt. Hiện nay, chưa có vaccine đặc hiệu cũng như thuốc điều trị bệnh Dengue. Vì vậy, việc kiểm soát, phòng chống cũng như chẩn đoán sớm SD/SXHD là vô cùng quan trọng để giảm thiệt hại do virus này gây ra.

Có nhiều phương pháp chẩn đoán bệnh Dengue như phân lập virus, PCR xác định bộ gene virus, phát hiện kháng nguyên virus, chẩn đoán huyết thanh học (bao gồm ức chế ngưng kết hồng cầu, phản ứng hấp phụ miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM-IgG, trung hòa, v.v...), trong đó phân lập virus là tiêu chuẩn vàng trong việc chẩn đoán bệnh Dengue. Trong chương trình Mục tiêu Quốc gia phòng chống SXHD của nước ta, công tác giám sát virus học bệnh SD/SXHD chủ yếu dựa vào kỹ thuật phân lập virus trên nuôi cấy tế bào muỗi *Aedes aegypti*. Quá trình định danh DENV được tiến hành qua hai bước: 1) – Sàng lọc nhóm *Flavivirus* bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (DFA) và 2) – Định type DENV bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA) với các kháng thể đơn dòng đặc hiệu, nhằm tiết kiệm thời gian, công sức và sinh phẩm chẩn đoán chủ yếu được cung cấp từ nước ngoài như các cộng hợp và kháng thể đơn dòng sử dụng trong xét nghiệm.

Vì thế, nhằm duy trì và mở rộng hoạt động giám sát virus học bệnh SXHD, đồng thời từng bước chủ động về mặt sinh phẩm cho xét nghiệm, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu quy trình chế tạo cộng hợp IgG-FITC.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Dòng tế bào u lai SLE-6B6C tạo kháng thể đơn dòng IgG kháng nhóm *Flavivirus* được nuôi cấy trên chai nuôi cấy thông thường 75 cm<sup>2</sup>. Dịch nổi tế bào thu nhận từ việc nuôi cấy được bảo quản ở -700C cho đến khi tinh chế.

Dịch nổi tế bào được tinh chế qua hệ thống sắc kí ái lực AKTA explorer 100 sử dụng cột Hi trap Protein A (GE Healthcare) [1],[5]. Sản phẩm tinh chế được kiểm tra bằng các phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA), điện di SDS-PAGE và định lượng bằng phương pháp đo OD và phương pháp Bradford. Sau khi tinh chế, kháng thể IgG được gắn với FITC (Merck, Cat.No 0099032) [2],[7],[8].

Cộng hợp tạo thành được chuẩn độ hiệu giá và đánh giá so sánh hiệu suất với cộng hợp đối chứng của Trung tâm Kiểm soát bệnh tật (CDC) Hoa Kỳ cung cấp bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (DFA).

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

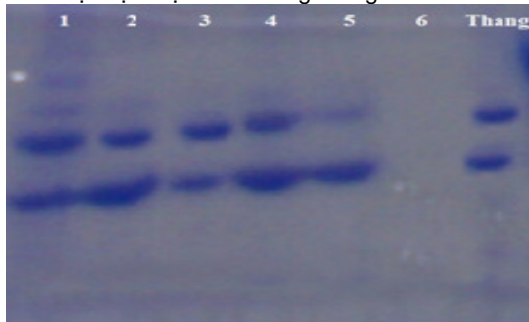
### 1. Kết quả nuôi tế bào u lai

Tế bào u lai SLE-6B6C được nuôi cấy trên chai nuôi cấy 75 cm<sup>2</sup> bổ sung môi trường Hybridoma-SMF. Sau 3 ngày thu lấy dịch nổi tế bào và bổ sung 20 mL môi trường/chai để tiếp tục nuôi cấy.

### 2. Kết quả tinh chế kháng thể đơn dòng

Dịch nổi thu nhận từ chai nuôi cấy tế bào được tinh chế qua hệ thống sắc kí ái lực AKTA explorer 100 với tốc độ 1mL/phút. Sau khi tinh chế thu nhận được 10 phân đoạn, rồi định lượng bằng phương pháp đo OD và phương pháp Bradford. Kết quả cho thấy nồng độ kháng thể thu nhận được từ dịch nổi tế bào là 3,06 mg/mL.

Kháng thể sau khi tinh chế được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và IFA. Mẫu chạy điện di bao gồm mẫu dịch nổi tế bào trước khi tinh chế, các phân đoạn thu được, và mẫu sau khi qua cột. Mẫu được xử lý bằng Mercaptoethanol trước khi chạy điện di. Chất này cắt IgG thành 2 chuỗi (chuỗi nặng và chuỗi nhẹ), cho thấy đồng thời hai vạch 25kDa và 50kDa khi chạy điện di SDS-PAGE chứng tỏ có sự hiện diện của kháng thể IgG.



**Hình 1:** Kết quả điện di SDS-PAGE

Giếng 1: Dung dịch trước qua cột

Giếng 2,3,4,5: Các phân đoạn thu được

Giếng 6: Dung dịch sau khi qua cột

Phản ứng IFA được thực hiện trên lame kính 12 lỗ với các độ pha loãng khác nhau của kháng thể thu

nhận được qua quá trình tinh chế. Kết quả cho thấy kháng thể thu nhận được cho kết quả dương tính với virus Dengue ở độ pha loãng 1:400.

Kết quả IFA cùng kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy rằng quá trình tinh chế thu nhận được kháng thể khá tinh sạch và kháng thể thu nhận được vẫn còn tính kháng thể với kháng nguyên Dengue trên lame kính. Kháng thể IgG sau khi thu nhận được tiến hành gắn FITC tạo cộng hợp.

Hệ thống sắc kí ái lực AKTA explorer 100 sử dụng trong việc tinh chế thu nhận kháng thể cho chất lượng kháng thể tốt và tránh thất thoát kháng thể.

### 3. Kết quả chế tạo và chuẩn độ cộng hợp IgG gắn FITC

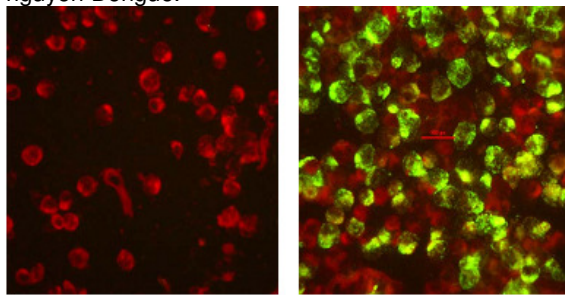
Lấy 2 mL kháng thể đơn dòng thu được sau khi tinh chế (3,06 mg/mL) tiến hành gắn FITC. Sau khi gắn FITC, ta thu được 2 mL sản phẩm cộng hợp. Sản phẩm cộng hợp được đánh giá hiệu suất cộng hợp qua việc đo OD ở 280nm, 495nm và chuẩn độ hiệu giá cộng hợp.

Bảng 1: Kết quả đo OD cộng hợp 6B6C-FITC

Bước sóng	OD		
	6B6C-FITC	6B6C-FITC (Pha loãng 5 lần)	6B6C-FITC (Pha loãng 10 lần)
280 nm	2,847	1,2855	0,6876
495 nm	2,69	1,6685	0,8656

Từ đó ta tính được nồng độ của cộng hợp là 2,5 mg/mL và tỉ lệ F/P là 6.

Cộng hợp được chuẩn độ hiệu giá bằng phản ứng DFA với các độ pha loãng từ 1:10 đến 1:500 lần. Các độ pha loãng được đánh giá trên mẫu tế bào dương với kháng nguyên Dengue và tế bào âm với kháng nguyên Dengue.



(a) là mẫu âm

(b) là mẫu dương

Hình 2: Kết quả âm, dương của IFA khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang

Bảng 2: Kết quả chuẩn độ lô cộng hợp 6B6C-FITC

Độ pha loãng	Tế bào dương DENV-1	Tế bào dương DENV-2	Tế bào dương DENV-3	Tế bào dương DENV-4	Tế bào âm
1/10	+	+	+	+	-
1/20	+	+	+	+	-
1/40	+	+	+	+	-

1/80	+	+	+	+	-
1/160	+	+	+	+	-
1/320	+	+	+	+	-
1/500	-	+/-	-	+/-	-

Cộng hợp ở độ pha loãng 1:320 thì tế bào dương cho kết quả dương tính, tế bào âm cho kết quả âm tính nên chúng tôi chọn độ pha loãng này để sử dụng.

#### 4. Kết quả so sánh hiệu suất cộng hợp chế tạo với cộng hợp do CDC Hoa Kỳ cung cấp

Cộng hợp chế tạo được đánh giá so sánh với cộng hợp do CDC Hoa Kỳ cung cấp bằng xét nghiệm DFA trên 84 mẫu bệnh nhân xác định rõ (gồm 49 mẫu âm và 35 mẫu dương). Kết quả cho thấy cộng hợp chế tạo được tương đồng cao với cộng hợp CDC Hoa Kỳ (Mc Nemar's test và hệ số  $\kappa=95\%$ ) với độ nhạy 94,3% và độ đặc hiệu 100% trong phản ứng DFA định danh *Flavivirus*.

#### KẾT LUẬN

Quy trình chế tạo cộng hợp IgG-FITC sử dụng trong kỹ thuật DFA đã được nghiên cứu thành công. Sản phẩm cộng hợp IgG SLE-6B6C-FITC đạt được có hiệu giá khá cao (1:320); độ nhạy 94,3%, độ đặc hiệu 100% và hoàn toàn có thể so sánh với cộng hợp CDC Hoa Kỳ cung cấp (hệ số  $\kappa=95\%$ ). Đây là thành công đáng kể trong việc chủ động về mặt sinh phẩm trong nước, góp phần duy trì và mở rộng công tác giám sát virus học bệnh sốt xuất huyết Dengue ở nước ta hiện nay.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amersham Biosciences, *AKTA system*

*Training Guide Explorer 100/10.*

2. Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service and Laboratory of Immunopathology (1969), *Conjugation of Fluorescein Isothiocyanate to Antibodies*, University of Amsterdam, Amsterdam.

3. Đào Huy Mạnh (2011), *Hoàn thiện quy trình tinh chế kháng thể đơn dòng và sản xuất cộng hợp 6B6C gắn enzyme HRP dùng trong bộ kit MAC-ELISA xét nghiệm sốt xuất huyết Dengue*, Luận văn thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh.

4. Đỗ Quang Hà, Vũ Thị Quế Hương, Huỳnh Thị Kim Loan, Cao Minh Thắng (1997), *Giám sát virus học dịch dengue xuất huyết tại các tỉnh phía Nam*, 1996, Vệ sinh phòng dịch, tr. 6-8.

5. GE Healthcare, *Antibody Purification Handbook*.

6. Thermo Scientific (2009), *Thermo Scientific Pierce High – Performance Dialysis, Desalting and Detergent Removal Technical Handbook*.

7. Walker John M. (2002), *The protein protocols handbook*, Second Edition, Humana Press Inc., United States of America.

8. Wood DJ, CorbittG (1981), *Use of FITC protein A in place fluorescein-conjugated anti-gammaglobulins for rapid virus diagnosis by immunofluorescence*, pp. 472-475.

9. WHO (2011), *Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*.