TẠO CỘNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG KHÁNG THỂ CHUỘT KHÁNG IgG NGƯỜI GẮN ENZYME HORSERADISH PEROXIDASE ỨNG DỤNG TRONG CÁC PHƯƠNG PHÁP ELISA SỬ DỤNG KHÁNG THỂ NGƯỜI

ThS Lại Đình Biên[(1)] , NCS Quan Quốc Đăng [(2)], NCS Lê Trầm Nghĩa Thư[(3)], CN Lưu Phương Nam [(4)]

[1] Phòng Công nghệ Sinh học Thực vật, Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp HCM

[2] Phòng thí nghiệm Nghiên cứu và Ứng dụng Tế bào gốc, ĐH Khoa học Tự nhiên, Tp. HCM

[3]Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, ĐH Công nghiệp Tp.HCM

[4] Phòng Nông nghiệp Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành

Ngày gửi bài: 15/11/2014 Ngày chấp nhận đăng: 08/11/2014

Tóm tắt

HRP (Horseradish peroxidase) là một enzyme được chiết ra từ rễ cây Cải ngựa (Amoracia rusticana), HRP với vai trò chất đánh dấu được sử dụng nhiều nhất phương pháp gắn cộng hợp vì nó tương đối rẻ, tinh sạch, phát tín hiệu nhanh và có hoạt tính enzyme chuyên biệt rất cao. Ngoài ra do HRP có kích thước và trọng lượng phân tử nhỏ nên ít gây cản trở không gian khi liên kết với kháng nguyên hay kháng thể. Trong các thử nghiệm miễn dịch chẳng hạn như các phương pháp ELISA, để gia tăng độ đặc hiệu cho phản ứng, người ta thường sử dụng kháng thể (KT) thứ cấp gắn enzyme là những KT kháng loài như kháng IgM, kháng IgG,... Vai trò của cộng hợp KT chuột gắn enzyme peroxidase cũng được ứng dụng như một KT kháng loài liên kết đặc hiệu với KT sơ cấp ứng dụng cho bất kỳ mẫu huyết thanh nào kháng với một KN nào đó. Do đó, chúng tôi tiến hành gây đáp ứng miễn dịch trên chuột bằng kháng thể IgG người đã được tinh chế từ huyết thanh của máu cuống rốn với các liều tiêm khác nhau 20 µg, 40 µg và 60 µg/ liều tiêm. Sau khi tinh chế nồng độ kháng thể chuột thu được cao nhất là 0,495 mg/ml. Sau đó, cộng hợp kháng thể chuột kháng kháng thể người đã được gắn với enzyme HRP. Cuối cùng, cộng hợp được thử nghiệm bằng phương pháp ELISA trực tiếp và gián tiếp cho kết quả nồng độ cộng hợp còn giữ hoạt tính là 0,125 mg/ml.

Từ khoá: *HRP, cây cải ngựa, đáp ứng miễn dịch, IgG, IgM, ELISA, huyết thanh.*

DEVELOPENZYMET AND QUALITY ASSESSMENT MOUSE OF ANTI-HUMAN IgG ANTIBODY-HORSERADISH PEROXIDASE CONJUGATES USING FOR ELISA TECHNIQUE TO DETECT HUMAN ANTIBOBY

Abstract

HRP (Horseradish peroxidase) has been known as an enzyme extracted from horseradish roots (Amoracia Rusticana). HRP plays an important role as a marker which most used as a common method of conjugations due to the relatively cheap, purified, fast signaling and highly specific enzyme. Furthermore, HRP involves small sizes and molecular weights having less obstructive space in associated with antigen or antibody. In immunological tests, such as ELISA, secondary antibody – horseradish peroxidase conjugates has been applied to increase specificity of enzyme in ELISA test such as anti-IgG, anti-IgM. Primary mice antibody-conjugated enzymes which also practiced for any serum sample performing any anti-antigen functions were observed. This project objects to conduct an immune response in mice with IgG antibodies which were purified from the serum of umbilical cord blood injected in different doses of 20 µg, 40 µg and 60 µg per dose of vaccine. After purified mouse antibody concentrations obtained the highest 0.495 mg per ml. The antibody anti-mouse antibody has been added in associated with the HRP enzymes. In conclusion, the antibody-antigen interaction was examined by direct and indirect ELISA and the level of community was in concentration of 0.125 mg/ml.

Key words: *HRP, horseradish root, immune response, IgG, IgM, ELISA, serum.*

1. Đặt vấn đề

Phương pháp ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) được xem như là một công cụ hiệu quả trong công nghiệp dược phẩm và chẩn đoán lâm sàng hiện nay nhờ vào độ nhạy và sự tiện lợi của phương pháp này cao hơn các phương pháp thử nghiệm miễn dịch khác. Trong phương pháp ELISA, một thành phần không thể thiếu chính là kháng thể cộng hợp với enzyme.

Nhờ đó, có thể định lượng được kháng nguyên thông qua sự tạo màu của phản ứng giữa cơ chất với enzyme. Tạo kháng thể cộng hợp với enzyme cần phải sử dụng một phương pháp cộng hợp sinh học phù hợp để có thể duy trì chức năng gắn đặc hiệu với kháng nguyên của kháng thể và hoạt tính của enzyme. Như vậy, việc lựa chọn một enzyme đáp ứng được yêu cầu này thật sự quan trọng [4,6].

Enzyme Horseradish peroxidase là một glycoprotein được chiết ra từ rễ cây cải ngựa (*Amoracia rusticana*), phản ứng đặc hiệu với chất oxi hóa như H_2O_2 và các peroxide có chứa gốc methyl và ethyl. So với các enzyme khác, HRP có đặc tính nổi trội hơn vì kích thước nhỏ gọn sẽ không gây cản trở kháng thể tiếp cận kháng nguyên và hoạt tính của HRP ổn định trong quá trình cộng hợp với kháng thể. Do đó, HRP được sử dụng phổ biến hơn 80% trong tất cả quá trình sản xuất kháng thể cộng hợp với enzyme và phần lớn cộng hợp kháng thể với HRP được sử dụng để chẩn đoán bệnh [5].

Với những lí do trên, chúng tôi tiến hành tạo cộng hợp và đánh giá chất lượng kháng thể chuột kháng IgG người gắn enzyme Horseradish peroxidase và ứng dụng trong các phương pháp ELISA sử dụng kháng thể người. Đề tài hướng tới việc hoàn thiện hóa quy trình gây miễn dịch và đa dạng các KIT ELISA trên nhiều loại kháng thể đặc hiệu kháng nhau.

2. Đối tượng – Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, hóa chất

Máu cuống rốn từ thai phụ không mắc các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm từ bệnh viện Hùng Vương.

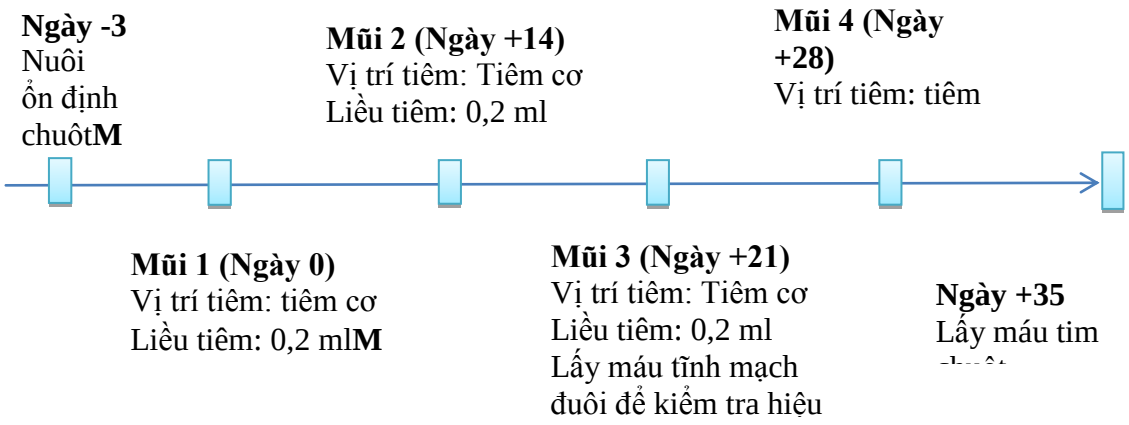
Chuột nhắt trắng *(Mus musculus* Var. *Albino)* trưởng thành, khỏe mạnh, sạch bệnh, có trọng lượng khoảng từ 20-22 g/con, do Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

Cột tinh chế Hi Trap Mab Select 1mL (GE healthcare), Bộ kit cộng hợp sinh học (Pierce), Receptor của TNF tái tổ hợp (Prospec), Anti-TNF-receptor (Prospec), Albumin huyết thanh bò (BSA) (Merck) được pha tùy theo mục đích sử dụng và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Miễn dịch chuột thu huyết thanh kháng IgG người

Quá trình gây đáp ứng miễn dịch chuột thu kháng thể kháng IgG người gồm 4 mũi tiêm KN sử dụng là IgG tinh chế sẽ được dùng trong thí nghiệm này nhằm tạo TNF-R như sau: tiêm cơ bản, tiêm nhắc lần 1, tiêm nhắc lần 2 và tiêm nhắc lần 3. Lịch tiêm được tóm tắt qua sơ đồ miễn dịch như sau:



Chuột sau tiêm nhắc lần 2 sẽ được lấy máu tĩnh mạch đuôi để xác định hiệu giá kháng thể. Nếu hiệu giá kháng thể đạt yêu cầu, một nửa số lượng chuột trong mỗi lô sẽ được thu máu toàn bộ bằng cách lấy máu tim. Một nửa số lượng chuột còn lại sẽ được tiêm nhắc lần 3 và sau đó 7 ngày sẽ thu toàn bộ máu.

2.2.2 Tinh chế huyết thanh kháng IgG người

Cột Hi Trap Mabselect 1 mL được cấu tạo bởi protein A đóng vai trò là cơ chất, gắn với chất nền Sepharose. Quá trình tinh chế dựa trên nguyên tắc là protein A có ái lực đối với vùng Fc của kháng thể IgG. Dưới pH trung tính của dung dịch đệm gắn kết, ái lực này trở nên rất mạnh làm cho IgG gắn chặt vào cơ chất protein G, trong khi những chất khác bị rửa sạch. Sau đó, pH acid của dung dịch đệm ly giải khiến ái lực này trở nên yếu, làm tách các phân tử IgG ra khỏi cơ chất protein G. Dung dịch đệm trung hòa có tác dụng trung hòa dung dịch mẫu sau ly giải, giúp làm bền IgG. Nồng độ protein có trong mẫu huyết thanh đã tinh chế được xác định bằng phương pháp Bradford và kiểm tra độ tinh sạch của kháng thể bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE [1].

2.2.3 Gắn cộng hợp phân tử IgG với enzyme HRP

Enzyme peroxidase cho phản ứng và gắn kết với phân tử IgG ở pH thích hợp. Khi dung dịch chứa IgG được thêm vào, enzyme sẽ tương tác với gốc amin của phân tử IgG để hình thành liên kết Schiff base (liên kết imin). Sau thời gian ủ 1-2 giờ, liên kết cộng hợp IgG-HRP giảm đi và các vị trí aldehyde không phản ứng của enzyme HRP bất hoạt với ethanolamine. Sau đó cộng hợp được cho qua cột tinh chế nhằm phân tách các enzyme tự do ra khỏi cộng hợp; khử muối cộng hợp bằng cột khử muối gel polyacrylamide trong 0,1% NaN_2. Cộng hợp HRP này được hiệu giá bằng phương pháp ELISA trực tiếp và gián tiếp [2,3,7,8,9].

2.2.4 Chuẩn độ hiệu giá kháng thể và cộng hợp bằng phương pháp ELISA

Để tiến hành hiệu giá cộng hợp KT-HRP sau khi tinh chế, phương pháp ELISA trực tiếp và gián tiếp đã được thực hiện nhằm so sánh và đánh giá hiệu quả cộng hợp được sản xuất ra.

Phương pháp ELISA trực tiếp

Dung dịch KT người kháng TNF-R_Anti TNF-R nồng độ 1mg/ml pha loãng thành 1 µg/ml được phủ phiến. Sau khi ủ qua đêm ở 4^{o}C, phiến được rửa 3 lần bằng dung dịch rửa phiến. Tiếp đến, phiến được khóa và rửa phiến 3 lần sau khi đã ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, cộng hợp IgG chuột-HRP mới được sản xuất được pha loãng thành 2 µg/ml rồi tiếp tục được pha loãng theo bậc 2 và bổ sung vào phiến, gắn đặc hiệu với anti TNF-R. Đồng thời, dung dịch cộng

hợp IgG chuột-HRP chuẩn với nồng độ phủ phiến bắt đầu là 1 µg/ml; sau đó được pha loãng bậc 2 cũng được tiến hành phủ phiến. Ủ phiến 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục rửa phiến 7 lần, thêm cơ chất TMB. Sau 10 phút, ngừng phản ứng bằng dung dịch H_2SO_4 1M. Đo màu bằng máy quang phổ trắc quang ở bước sóng 450 nm.

Phương pháp ELISA gián tiếp

KN TNF-R nồng độ 100 µg/ml pha loãng thành 0,1 µg/ml được phủ phiến. Sau khi ủ qua đêm ở 4^{o}C, phiến được rửa 3 lần bằng dung dịch rửa phiến. Tiếp đến, phiến được khóa và rửa phiến 3 lần sau khi đã ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó phủ phiến bằng dung dịch KT người kháng TNF-R_Anti TNF-R nồng độ 1mg/ml pha loãng thành 1 µg/ml gắn đặc hiệu với TNF-R. Rửa phiến 3 lần sau khi ủ ở nhiệt độ phòng. Kế đến, cộng hợp IgG chuột-HRP mới được sản xuất ở nồng độ 0,8 mg/ml được pha loãng thành 2 µg/ml; sau đó tiếp tục được pha loãng theo bậc 2 và bổ sung vào phiến, gắn đặc hiệu với anti TNF-R. Đồng thời, dung dịch cộng hợp IgG chuột-HRP chuẩn với nồng độ phủ phiến bắt đầu là 1 µg/ml; sau đó được pha loãng bậc 2 và được tiến hành phủ phiến. Ủ phiến 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục rửa phiến 7 lần, thêm cơ chất TMB. Sau 10 phút, ngừng phản ứng bằng dung dịch H_2SO_4 1M. Đo màu bằng máy quang phổ trắc quang ở bước sóng 450 nm.

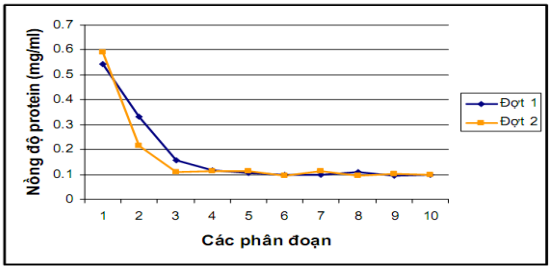
3. Diễn giải và phân tích kết quả

3.1 Tinh chế KT IgG trong mẫu huyết thanh người

Huyết thanh người thu từ máu cuống rốn sẽ được đem tinh chế thu nhận KT bằng cột Mab Select HiTrap 1 ml. Mẫu được dẫn qua cột, với pH trung tính các phân tử IgG trong huyết thanh sẽ được bắt giữ bởi các phân tử protein A có ái lực rất lớn với IgG. Sau đó, bằng dung dịch đệm pH thấp (3,0 đến 3,5), các phân tử IgG sẽ được ly giải ra khỏi cột, 10 phân đoạn protein được thu lại (1 ml/phân đoạn). Nồng độ KT tổng số của từng phân đoạn sau quá trình tinh chế được xác định bằng phương pháp Bradford.

3.1.1 Kết quả xác định nồng độ KT của các phân đoạn sau tinh chế

Nồng độ KT của các sản phẩm tinh chế được xác định bằng phương pháp Bradford với đường chuẩn là nồng độ của BSA. Qua 2 đợt tinh chế từ cùng một mẫu huyết thanh thu được với thể tích mẫu mỗi đợt khoảng 20 ml. Kết quả tinh chế được thể hiện ở hình 3.1



Hình 3.1 Đồ thị biểu diễn nồng độ KT của các phân đoạn sau tinh chế huyếtthanh người đợt 1 và đợt 2

Hình 3.1 cho thấy kết quả của cả hai đợt tinh chế gần như nhau, nồng độ KT cao ở phân đoạn đầu, sau đó giảm dần và hầu như không đổi ở các phân đoạn sau. Nồng độ KT thu được cao nhất ở phân đoạn 1/đợt 1 (0,544 mg/ml), sau đó giảm dần theo các phân đoạn. Từ phân đoạn 3 trở đi, nồng độ KT không chênh lệch nhiều và hầu như ngang bằng nhau. Như vậy, phân đoạn

1 có nồng độ KT cao sẽ được thu thập để sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo. Tương tự, nồng độ KT cao nhất ở phân đoạn 1/đợt 2 (0,589 mg/ml) rồi giảm dần qua các phân đoạn sau. Phân đoạn 1 này cũng được thu để thực hiện các bước kế tiếp. Như vậy, việc tinh chế KT từ huyết thanh người sau 2 đợt đạt kết quả tốt, cả hai phân đoạn 1 của hai đợt tinh chế có nồng độ KT cao được thu thập và sẽ được điện di SDS-PAGE để xác định protein thu được hoàn toàn là IgG người hay lẫn protein khác.

3.1.2 Kiểm tra độ tinh sạch của IgG người trong huyết thanh

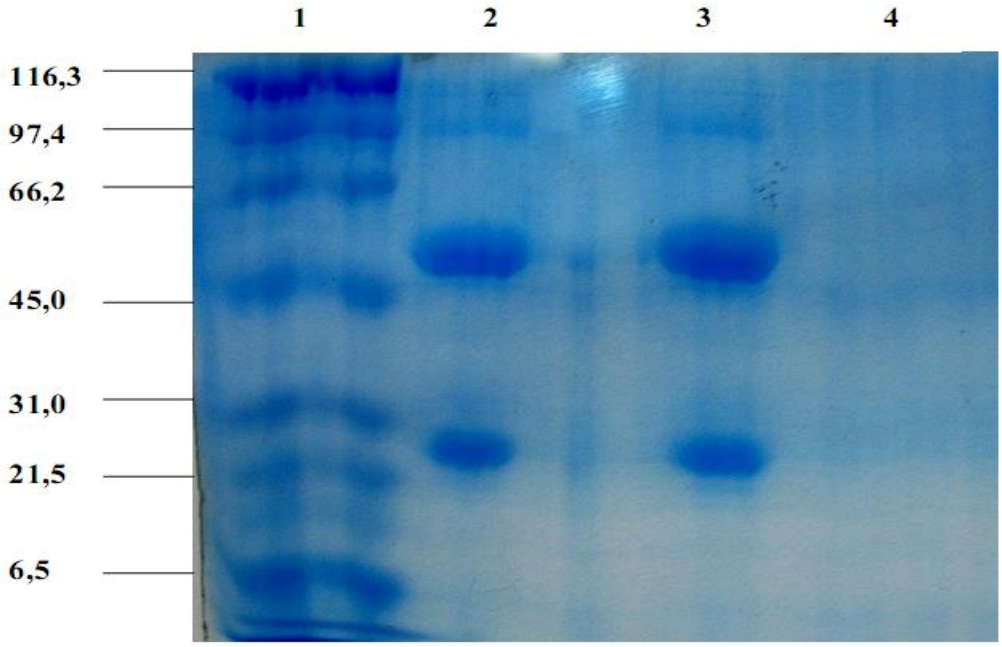
Để kiểm tra độ tinh sạch của các sản phẩm tinh chế qua cột, phương pháp điện di SDS-PAGE đã được thực hiện. Các phân đoạn protein cao được tiến hành điện di đồng thời với thang chuẩn. Kết quả điện di trên gel polyacrylamide được thể hiện qua hình 3.2.

Kết quả điện di trên cho thấy việc tinh chế protein đạt kết quả tốt, lượng KT nhiều và không bị tạp nhiễm. Kết quả điện di phù hợp với nồng độ KT được xác định bằng phương pháp Bradford. Giếng 2 (phân đoạn 1/đợt 1) có sự hiện diện của các vạch đậm màu ở vị trí 50 kDa (chuỗi nặng) và 25 kDa (chuỗi nhẹ) do phân tử IgG bị cắt đứt các cầu nối disulfur. Phân đoạn 1 này không bị tạp nhiễm. Giếng 3 (phân đoạn 1/đợt 2) xuất hiện các vạch đậm màu 50 kDa và 25 kDa. Phân đoạn 1 này không bị tạp nhiễm. Giếng 4 (đối chứng âm) không xuất hiện vạch nào trên bảng điện di do dung dịch đệm không chứa protein.

3.2 Quá trình gây đáp ứng miễn dịch trên chuột

Chuột nhắt trắng được tiêm theo lịch và được chăm sóc đầy đủ trong phòng dành riêng cho nuôi chuột. Với mũi tiêm đầu tiên, mục đích là để khởi động hệ miễn dịch hoạt động chống lại KN lạ. Sau khi tiêm mũi đầu tiên thì hệ miễn dịch chuột sẽ bắt đầu nhận diện và phản ứng lại với những chất lạ trong cơ thể. Đây là thời gian cần thiết để cho các lympho bào B và T đặc hiệu KN được tiếp xúc và kích thích bởi KN, sau đó chúng sẽ tăng sinh và biệt hoá thành các tế bào hành sự như tương bào sản xuất ra KT đặc hiệu với KN đưa vào và tế bào nhớ gọi là đáp ứng thì đầu.

Sau 14 ngày tiêm mũi cơ bản, tiến hành tiêm nhắc lần 1, 2 và 3. Sau khi tiêm mũi cơ bản, nếu có xảy ra đáp ứng miễn dịch (ĐƯMD) thì lượng KT sinh ra chống lại IgG người – đóng vai trò là KN đối với hệ miễn dịch của chuột – rất ít và tồn tại trong huyết thanh chỉ vài ba tuần nên chúng tôi tiến hành tiêm nhắc lại nhiều lần để cơ thể chuột đáp ứng mạnh hơn, nhanh hơn và sản sinh lượng KT nhiều hơn. Điều này có được là do trong cơ thể chuột đã tồn tại các tế bào lympho có trí nhớ miễn dịch đặc hiệu được hình thành trong thì đầu. Sau mũi tiêm nhắc thứ 2, chúng tôi tiến hành thu máu tĩnh mạch chuột để kiểm tra, sau đó tiếp tục tiêm nhắc mũi thứ 3 và thu máu toàn bộ số chuột đã gây ĐƯMD.



Hình 3.2 Kết quả điện di SDS-PAGE dung dịch mẫu và thang chuẩn

Giếng 1: Thang protein chuẩn với các kích thước 116,3 kDa, 97,4 kDa, 66,2 kDa, 45,0 kDa, 31,0 kDa, 21,5 kDa và 6,5 kDa.

Giếng 2, 3: Phân đoạn 1 của mẫu huyết thanh người đã qua tinh chế đợt 1 và 2.

Giếng 4: Đối chứng (–) là dung dịch đệm trung hòa.

Mẫu máu chuột thu được sau lần tiêm thứ 3 và thứ 4 chúng tôi đem xử lý bằng cách ly tâm thu huyết thanh và bất hoạt bổ thể. Sau đó bảo quản mẫu trong tủ lạnh 4^{o}C (không quá 6 tháng). Để kiểm tra quá trình gây ĐƯMD thì sau mũi tiêm nhắc lần 2, 3 chúng tôi thực hiện phương pháp ELISA gián tiếp. Sau khi hiệu giá KT bằng phương pháp ELISA thành công thì tiến hành thu máu tim chuột (1/2 số chuột mỗi lô).

3.3. Kết quả chuẩn độ hiệu giá KT sau tiêm nhắc lần 2 và 3 bằng phương pháp ELISA gián tiếp

KT IgG người pha loãng 1/100 được phủ phiến và ủ qua đêm ở 4^{o}C. Tiếp theo, huyết thanh chuột của các lô sau lần tiêm nhắc thứ 2 được pha loãng theo bậc hai thành 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 và 1/3200 và xác định hiệu giá KT bằng phương pháp ELISA. Cuối cùng, bổ sung kháng KT chuột có gắn enzyme peroxidase có nồng độ 1 µg/ml sẽ gắn đặc hiệu với phức hợp IgG người-IgG chuột. Màu của phản ứng được đo ở bước sóng 450 nm.

Huyết thanh sau mũi tiêm nhắc lần 3 được pha loãng theo bậc 2 thành 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 và 1/3200 và xác định hiệu giá KT bằng phương pháp ELISA. Kết quả chuẩn độ hiệu giá KT bằng phương pháp ELISA các mẫu huyết thanh chuột sau lần tiêm nhắc thứ 2 và 3 được tóm tắt qua bảng 3.1.

Bảng 3.1 Kết quả hiệu giá KT bằng phương pháp ELISA các mẫu huyết thanh chuột sau lần tiêm nhắc thứ 2 và thứ 3

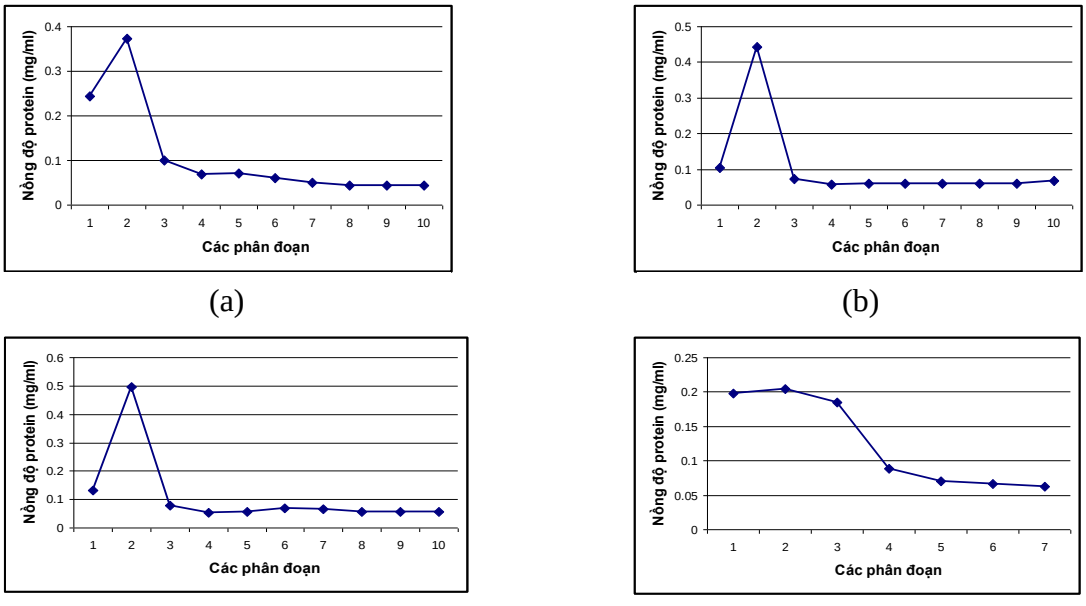
Mẫu huyết thanh	Lô 1 (20 µg/liều tiêm)	Lô 2 (40 µg/liều tiêm)	Lô 3 (60 µg/liều tiêm)	Lô 4 (tiêm PBS)
Sau tiêm nhắc lần 2	1/400	1/800	1/1600	0
Sau tiêm nhắc lần 3	1/800	1/1600	1/3200	0

Nồng độ dung dịch IgG người càng cao thì khả năng gây ĐƯMD càng mạnh. Trong nghiên cứu này, dung dịch IgG người ở nồng độ cao nhất 60 µg/liều tiêm cho hiệu quả ĐƯMD tốt nhất trong 3 giá trị nồng độ khảo sát. Hiệu giá KT trong huyết thanh tăng sau mỗi lần tiêm nhắc. Hiệu giá KT trong huyết thanh thu được sau lần tiêm nhắc thứ 3 có giá trị cao hơn so với lần tiêm nhắc thứ 2. Như vậy, việc bổ sung thêm liều tiêm nhắc trong phác đồ gây ĐƯMD giúp cho hiệu quả gây đáp ứng tốt hơn.

3.4 Tinh chế kháng thể kháng IgG người trong các mẫu huyết thanh chuột

Các thao tác tương tự như tinh chế IgG trong mẫu huyết thanh người. Ở đây, các mẫu huyết thanh chuột của lô 20 µg/liều tiêm (lô 1), 40 µg/liều tiêm (lô 2), 60 µg/liều tiêm (lô 3) và lô đối chứng tiêm PBS (lô 4) sẽ được tinh chế bằng cột Mab Select HiTrap 1 ml. Mỗi lô thu 10 phân đoạn. Nồng độ KT của từng phân đoạn sau quá trình tinh chế được xác định bằng phương pháp Bradford.

3.4.1 Kết quả xác định nồng độ KT của sản phẩm tinh chế qua cột



Hình 3.3 Đồ thị biểu diễn nồng độ KT của các phân đoạn ở các lô

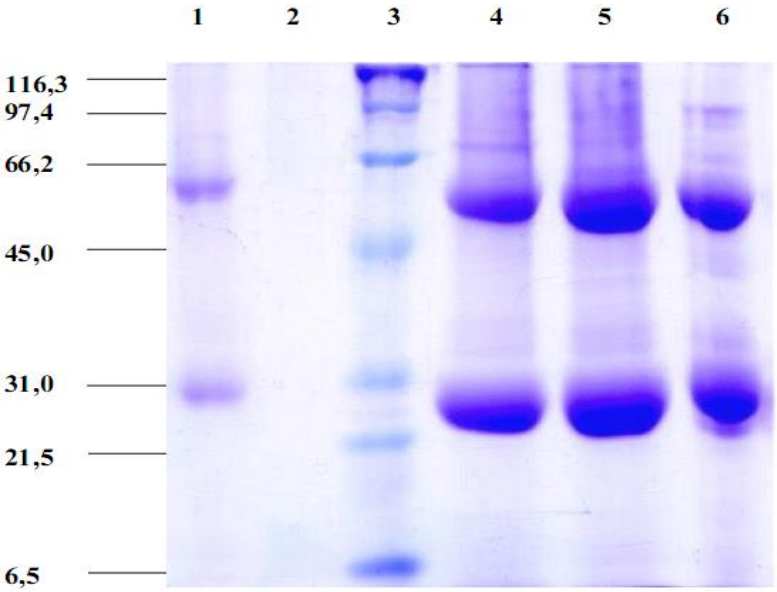
(a) 20 µg/liều tiêm (b) 40 µg/liều tiêm (c) 60 µg/liều tiêm (d) Lô đối chứng (PBS)

Kết quả tinh chế huyết thanh chuột của 4 lô cho thấy các phân đoạn đầu ở các lô đều cho nồng độ KT sau khi tinh chế cao (0,495 mg/ml ở lô 60 µg/liều tiêm; 0,433 mg/ml ở lô 40 µg/liều tiêm; 0,372 mg/ml ở lô 20 µg/liều tiêm và 0,204 mg/ml ở lô đối chứng). Như vậy, việc tinh chế

KT từ huyết thanh chuột ở 4 lô đạt kết quả tốt, các phân đoạn đầu có nồng độ KT cao. Các phân đoạn có nồng độ KT cao này được tiến hành thu thập để sử dụng cho các bước tiếp theo.

3.4.2 Kiểm tra độ tinh sạch của IgG người trong huyết thanh

Bằng phương pháp điện di SDS-PAGE, chúng tôi tiến hành kiểm tra độ tinh sạch của KT IgG chuột thu được trong các phân đoạn. Các phân đoạn protein cao của mỗi lô được tiến hành điện di đồng thời với thang chuẩn. Kết quả điện di trên gel polyacrylamide được thể hiện qua hình 3.9.



Hình 3.4 Kết quả điện di SDS-PAGE dung dịch mẫu và thang chuẩn

Giếng 1: Đối chứng (+) là lô tiêm PBS

Giếng 2: Đối chứng (–) là dung dịch đệm trung hòa

Giếng 3: Thang protein chuẩn với các kích thước 116,3 kDa, 97,4 kDa, 66,2 kDa, 45,0 kDa, 31,0 kDa, 21,5 kDa và 6,5 kDa

Giếng 4: Phân đoạn KT sau tinh chế của lô 60 µg/liều tiêm

Giếng 5: Phân đoạn KT sau tinh chế của lô 40 µg/liều tiêm

Giếng 6: Phân đoạn KT sau tinh chế của lô 20 µg/liều tiêm

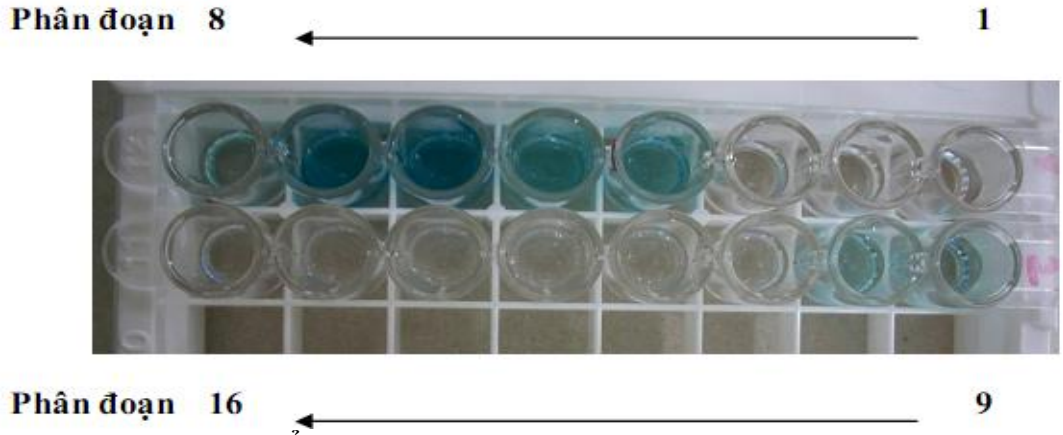
Từ kết quả đo Bradford và điện di SDS-PAGE để kiểm tra chất lượng tinh chế KT, chúng tôi có thể khẳng định nồng độ KT thu được cao và rất ít tạp nhiễm; việc tinh chế có hiệu quả. Qua đó loại bỏ phần lớn các thành phần tạp nhiễm trong huyết thanh thô, tạo điều kiện cho bước gắn cộng hợp với enzyme HRP.

3.5 Gắn cộng hợp kháng thể chuột kháng kháng thể người gắn enzyme HRP

3.5.1 Kết quả gắn cộng hợp IgG chuột-HRP

Sau khi tinh chế huyết thanh chuột và tiến hành các bước kiểm tra chất lượng tinh chế bằng phương pháp đo Bradford và điện di SDS-PAGE, chúng tôi thực hiện việc gắn cộng hợp.

Nhằm tăng hiệu quả gắn cộng hợp, chúng tôi thu nhận chung các phân đoạn có nồng độ KT cao của 3 lô thí nghiệm lại để nồng độ KT trong dung dịch đạt từ 1 mg/ml trở lên; sau đó bổ sung dung dịch chứa HRP (1 mg/ml) vào dung dịch chứa KT này. Sau đó cho hỗn hợp dung dịch chứa KT chuột và enzyme HRP qua cột tinh chế để loại bỏ enzyme tự do; các phân tử IDA trong cột chỉ gắn chuyên biệt với vùng Fc của cộng hợp KT-Enzyme và các phân tử KT tự do. Sau đó thu 16 phân đoạn cộng hợp và kiểm tra sơ bộ hoạt tính enzyme của các phân đoạn này



Hình 3.5 Kiểm tra hoạt tính cộng hợp của 16 phân đoạn

Hình 3.5 cho thấy ở độ pha loãng 1/500, màu xanh xuất hiện từ phân đoạn 3 đến phân đoạn 10; đậm nhất là ở phân đoạn 6 và 7; màu xanh nhạt từ phân đoạn 8 đến 10. Từ phân đoạn 11 đến 16 đều không xuất hiện màu. Do đó có thể thấy rằng hoạt tính enzyme cao ở các phân đoạn từ 4 đến 7 cao.

Các phân đoạn không hiện màu hay hiện màu nhạt do nồng độ cộng hợp thấp. Ở độ pha loãng 1/500 không thể hiện hoạt tính enzyme vì phản ứng ít với cơ chất TMB. Từ phân đoạn 4 đến 7 dung dịch chứa cộng hợp ly giải nhiều khỏi cột, thể hiện hoạt tính enzyme ở độ pha loãng 1/500.

Như vậy ở bước đánh giá sơ bộ cộng hợp cho thấy việc tinh chế cộng hợp thu được kết quả tốt khi có 7 phân đoạn sau tinh chế thể hiện hoạt tính enzyme ở độ pha loãng 1/500.

3.5.2 Kết quả kiểm tra chất lượng cộng hợp IgG chuột-HRP

Các phân đoạn cộng hợp từ 4 đến 10 được đo OD và xác định nồng độ cộng hợp sau tinh chế được xác định là 0,8 mg/ml. Cộng hợp HRP được đánh giá bằng phương pháp ELISA trực tiếp và gián tiếp.

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy sản phẩm cộng hợp có mức hiệu giá là 0,125 µg/ml, so với mẫu chuẩn có mức hiệu giá là 0,03125 µg/ml. Hoạt tính enzyme bằng ¼ so với mẫu chuẩn.

Như vậy, kết quả ELISA cho thấy mẫu sản phẩm cộng hợp đã tinh chế còn giữ hoạt tính ở nồng độ 0,125 µg/ml trong ELISA trực tiếp và gián tiếp, bằng ¼ so với mẫu chuẩn(bảng 3.3).. Như vậy quy trình tạo cộng hợp KT chuột kháng IgG người gắn enzyme peroxidase đã được xây dựng thành công.

4. Kết luận

Đề tài đã xây dựng thành công phác đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột qua các liều tiêm KN khác nhau. Trong đó, liều tiêm nồng độ KN IgG người 60 µg cho hiệu giá huyết thanh

chuột bằng phương pháp ELISA là 1/3200. Nồng độ KT chuột cao nhất thu được sau khi tinh chế được xác định là 0,495 mg/ml. Thử nghiệm cộng hợp bằng phương pháp ELISA trực tiếp và gián tiếp cho nồng độ cộng hợp còn giữ hoạt tính là 0,125 mg/ml.

Bảng 3.2 Kết quả nồng độ cộng hợp IgG chuột bằng phương pháp ELISA trực tiếp và ELISA gián tiếp:

Mẫu chuẩn		**Sản phẩm cộng hợp**	
Nồng độ (µg/ml)	**OD_{450}**	**OD_{450}**	**Nồng độ (µg/ml)**
1	1,985	0,972	2
0,5	1,450	0,558	1
0,25	0,703	0,482	0,5
0,125	0,348	0,107	0,25
0,0625	0,190	0,096	**0,125**
0,03125	0,095	0,074	0,0625
0,015625	0,086	0,070	0,03125
0	0,080	0,071	0

Mẫu chuẩn		**Sản phẩm cộng hợp**	
Nồng độ (µg/ml)	**OD_{450}**	**OD_{450}**	**Nồng độ (µg/ml)**
1	1,253	0,629	2
0,5	0,883	0,396	1
0,25	0,378	0,231	0,5
0,125	0,238	0,117	0,25
0,0625	0,119	0,102	**0,125**
0,03125	0,122	0,080	0,0625
0,015625	0,095	0,080	0,03125
0	0,090	0,083	0

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Duncan Lowa, et al (2007). Future of antibody purification, *Journal of Chromatography B*, 848, 48–63.

[2]. Greg T. H. (2008), *Bioconjugate Techniques*, 2nd Edition, Academic Press, p.787-807, 961-968.

[3]. Imagawa, M., et al. (1982). Characteristics and evaluation of antibody- horseradish peroxidase conjugates prepared by using a maleimide compound, glutaraldehyde and periodate. *J. Appl. Biochem.***4**, 41-57.

[4]. John R. Crowther (2002), *The ELISA guidebook*, Humana Press, p. 21-35.

[5]. P. David Josephyg, Thomas Eling, and Ronald P. Mason (1982), T*he Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5' Tetramethylbenzidine*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 257, No.7, Issue of April 10, pp. 36694675.

[6]. Richard A. Goldsby, Thmoas J. Kindt, Barbara A. Osborne, *Kuby Immunology*, 6th Edition, W.H.Freeman.

[7]. Rosaria P.H. (1995), Coupling of Monoclonal Antibodies with Enzymes, In: Davis W.C (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 45, Monoclonal Antibody Protocols, Humana Press, 235-243.

[8]. Wilson M.B. and Nakane P.K. (1978), *Recent Developenzymets in the Periodate Method of Conlugating Horseradish Peroxidase (HRP) to Antibodies*, Elsevier/North Holland Biomedical, Amsterdam.

[9]. Wisdom G.B. (1988), Antibody-Enzyme Conjugate Formation,In: Davis W.C (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 373-383.