

# Tạo kháng thể IgG thô kháng IgG người

Thái Thị Tuyết Trinh, Trần Thị Cẩm Tú, Lê Thị Phương Thảo, Nguyễn Hữu Hùng\*

Khoa Công nghệ Sinh học và Môi trường, Đại học Nguyễn Tất Thành

\*nhhung@ntt.edu.vn

## Tóm tắt

Bài báo này trình bày kết quả tạo và tinh chế IgG thô kháng kháng nguyên IgG người bằng các phương pháp như gây đáp ứng miễn dịch cho động vật bằng cách tiêm trong da, tinh sạch kháng thể IgG bằng phương pháp tủa với ammonium sulphate 45% và phương pháp sắc kí ái lực qua cột protein G. Ngoài ra, bài báo còn đề cập đến các phương pháp kiểm tra hiệu quả của quá trình gây đáp ứng miễn dịch như phương pháp khuếch tán kép trên thạch (Ouchterlony) và Western blot. Mục đích của việc nghiên cứu là tạo và tinh sạch kháng thể IgG thô kháng kháng nguyên IgG người đạt độ tinh sạch cao, làm tiền đề cho việc phát triển qui trình sản xuất kháng thể tinh sạch trong nước cũng như ứng dụng trong các kit chẩn đoán nhằm phục vụ cho nghiên cứu khoa học và xét nghiệm phát hiện bệnh. Kết quả nghiên cứu thu nhận được khoảng 80mg kháng thể IgG thô kháng IgG người tinh sạch, với độ sạch cao (ước tính > 95% khi phân tích bằng SDS-PAGE).

Nhận 20.09.2018  
Được duyệt 01.12.2018  
Công bố 25.12.2018

## Từ khóa

IgG thô kháng IgG người, protein G, tinh chế kháng thể, sắc kí ái lực.

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Giới thiệu

Kháng thể động vật đặc hiệu với kháng thể người là một trong những nguyên liệu dùng trong kỹ thuật Western Blot và các kỹ thuật xét nghiệm khác nhằm hỗ trợ chẩn đoán bệnh cũng như trong nghiên cứu. Không chỉ các phòng thí nghiệm nghiên cứu miễn dịch, kí sinh trùng,... mà các phòng xét nghiệm của các bệnh viện cũng có nhu cầu sử dụng kháng thể động vật đặc hiệu với kháng thể người. Tuy nhiên, kháng thể động vật thường sử dụng được mua từ nước ngoài nên có giá thành cao, khó chủ động về nguồn cung cấp, gây ảnh hưởng nhiều đến chi phí xét nghiệm và gây nhiều hạn chế trong quá trình nghiên cứu. Từ đó, việc nghiên cứu phương pháp tạo kháng thể động vật đặc hiệu với kháng thể người tại Việt Nam là vô cùng cấp thiết. Việc tạo và tinh sạch kháng thể động vật đặc hiệu với kháng thể người tại Việt Nam không chỉ mang lại lợi ích về kinh tế nói chung mà còn giúp phát hiện và chữa trị bệnh sớm hơn. Với những lí do trên, chúng tôi tiến hành tạo kháng thể IgG thô kháng IgG người nhằm tạo được nguồn nguyên liệu kháng thể tinh sạch kháng IgG người, từ đó tạo tiền đề để tiếp tục phát triển các sản phẩm ứng dụng chẩn đoán huyết thanh học.

## 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Ung thư và Tế bào gốc – Bộ môn Công nghệ Sinh học Y dược - Khoa Nông nghiệp Công nghệ cao và Công nghệ Sinh học Trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

Huyết thanh người, điều kiện thu nhận: có màu vàng trong, không đục, không tủa và được xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV...

Thỏ đực, khoảng 6 tháng tuổi, trọng lượng 2.2kg mua từ viện Pasteur, Tp. Hồ Chí Minh và được nuôi trong nhà động vật của Khoa Nông nghiệp Công nghệ cao và Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành.

### 2.1 Tủa huyết thanh với ammonium sulphate 45%

Kháng thể IgG trong huyết thanh người hoặc IgG thô trong huyết thanh ở lần tiêm cuối cùng được thu nhận bằng phương pháp tủa với ammonium sulfate 45% bão hoà (AS 45%) [1]. Cặn tủa chứa IgG được rửa và được bảo quản AS 45% ở 4°C cho đến khi sử dụng.

### 2.2 Sắc kí ái lực qua cột protein G

Để tinh chế IgG, cặn tủa chứa IgG hoà tan bằng thẩm tích trong đệm 20mM sodium phosphate [2] và được nạp qua cột protein G có ái lực mạnh với phần Fc của IgG [3]. Mẫu được nạp vào cột với tốc độ 1ml/phút (nạp 30mg protein/ml thể tích cột). Sử dụng dung dịch đệm gắn 20mM sodium



phosphate; đệm rửa giải 0.1M Glycine-HCl; đệm trung hòa 1M Tris-HCl. Các phân đoạn bám cột và không bám cột sau sắc kí được dồn mẫu và được đậm đặc bằng phương pháp li tâm sử dụng AMICON filter unit 10 kDa cut-off. Mẫu được trữ ở  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

### 2.3 Gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ

IgG của người được dùng để gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ được tinh chế từ huyết thanh người với độ tinh sạch > 95%. Phác đồ tiêm gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ được mô tả tóm tắt trong Bảng 1. Mỗi lần tiêm 1ml hỗn hợp huyền phù chứa IgG, chia thành 40 mũi tiêm trong da, chia đều hai bên sống lưng ( $25\mu\text{l}/\text{mũi}$ ). Riêng lần tiêm gây miễn cảm dành lại khoảng  $200\mu\text{l}$  hỗn hợp huyền phù để tiêm bắp, vị trí phía trong đùi chân sau. Các mũi tiêm cách nhau 30 ngày. Máu thỏ sau khi thu nhận được để qua đêm ở  $4^{\circ}\text{C}$ , sau đó li tâm ở  $3000 \times g$  trong 15 phút, thu huyết thanh (HT). Bảo quản huyết thanh ở  $-20^{\circ}\text{C}$ , có bổ sung 0.05% sodium azide. Kháng thể IgG thỏ kháng IgG người được kiểm tra bằng kĩ thuật lai phân tử western blot.

**Bảng 1** Phác đồ tiêm thỏ gây đáp ứng miễn dịch

Mũi tiêm	Liều ( $\mu\text{g}$ )	Tá chất	Thể tích máu (ml)
Mẫn cảm	100	FCA	5*
Tăng cường lần 1	100	FIA	5**
Tăng cường lần 2	50	FIA	5**
Tăng cường lần 3	25	FIA	7,5**
Tăng cường lần 4	20	FIA	50**

\* trước khi tiêm \*\* sau khi tiêm 12 – 14 ngày

### 2.4 Khuếch tán kép trên thạch (Ouchterlony)

Khuếch tán kép trên thạch là phương pháp hiệu quả và thường được áp dụng để kiểm tra hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch vì độ nhạy của phương pháp thấp [2]. Trong nghiên cứu này, kĩ thuật khuếch tán kép được dùng để kiểm tra đáp ứng miễn cảm của động vật thí nghiệm (thỏ) với kháng nguyên IgG người. Nếu động vật thí nghiệm không miễn cảm hoặc đáp ứng yếu thì sẽ được loại bỏ. Kĩ thuật khuếch tán kép có độ nhạy khá thấp (từ vài chục  $\mu\text{g}/\text{ml}$  đến vài  $\text{mg}/\text{ml}$ ) nên cho phép phân biệt đáp ứng mạnh hay yếu giữa các con vật. Đối với kiểm tra đáp ứng miễn cảm, cho lần lượt  $10\mu\text{l}$  huyết thanh trước miễn cảm xen kẽ với huyết thanh sau khi tiêm nhắc lần 1 vào 6 giếng xung quanh, giếng ở giữa cho  $20\mu\text{l}$  IgG người với nồng độ  $0.35\text{mg}/\text{ml}$ . Đối với thử hiệu giá kháng thể, tiến hành pha loãng huyết thanh thỏ theo các tỉ lệ  $1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64$ . Cho  $10\mu\text{l}$  huyết thanh pha loãng lần lượt vào 6 giếng xung quanh và  $10\mu\text{l}$  IgG người vào giếng ở giữa với nồng độ  $0.35\text{mg}/\text{ml}$ . Sau khi cho huyết thanh và kháng thể vào các giếng, đặt miếng gel vào hộp ẩm và để trong tủ mát khoảng 12 – 48 giờ rồi quan sát hiện tượng kết tủa trong thạch. Để ráo gel rồi tiến hành nhuộm gel bằng dung dịch Coomassie Brilliant Blue trong 1 giờ và giải nhuộm bằng dung dịch giải nhuộm (Ethanol 7%, Acetic acid 7%,  $\text{dH}_2\text{O}$ ) đến khi

miếng gel trong. Hình ảnh kết tủa trên gel được ghi nhận bằng máy quét hình ảnh HP4050.

### 2.5 Điện di biến tính (SDS-PAGE)

SDS-PAGE được dùng để phân tích huyết thanh thỏ và IgG thỏ. Gel poly-acrylamide 12.5% được sử dụng. Protein sau điện di được phát hiện bằng phương pháp nhuộm với Coomassie blue. Hình ảnh điện di được ghi nhận bằng máy quét hình ảnh HP4050.

### 2.6 Kĩ thuật Western Blot

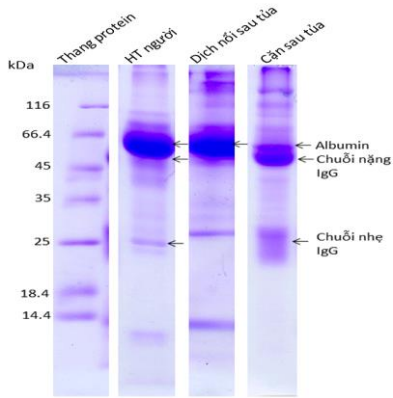
Gel chứa protein sau điện di được chuyển lên màng lai nitrocellulose có kích thước lỗ là  $0.45\mu\text{m}$  trong 1 giờ bằng hệ thống chuyển màng bán khô (Hoefler). Màng được khoá bằng 1% casein trong đệm TBST (20mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) trong 1 giờ và được rửa sau đó 3 lần trong đệm TBST trong 10 phút. Màng được ủ trong 1 giờ với huyết thanh của thỏ (pha loãng 1000 lần trong đệm TBST) sau khi gây đáp ứng miễn dịch với IgG người và được rửa lại với đệm TBST. Màng sau đó được ủ với kháng thể IgG thứ cấp của dê (goat anti-rabbit IgG) được cộng hợp HRP (Santa Cruz Biotechnology) trong 1 giờ và sau đó được rửa với đệm TBST [4]. Để phát hiện phức hợp lai kháng nguyên - kháng thể, màng được ủ với dung dịch hoá quang luminol và được quét bằng thiết bị C-Digit Blot Scanner. Hình ảnh kết quả western blot được xử lí bằng phần mềm ImageStudioLite.

## 3 Kết quả và thảo luận

### 3.1 Kết quả tinh chế IgG người

#### 3.1.1 Tủa với ammonium sulphate 45%

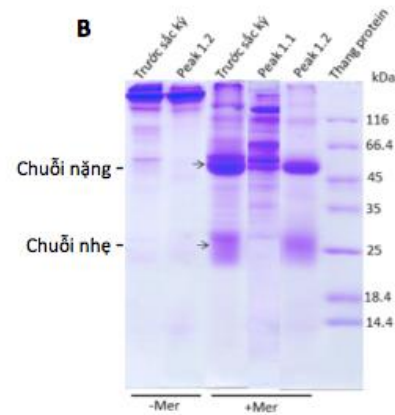
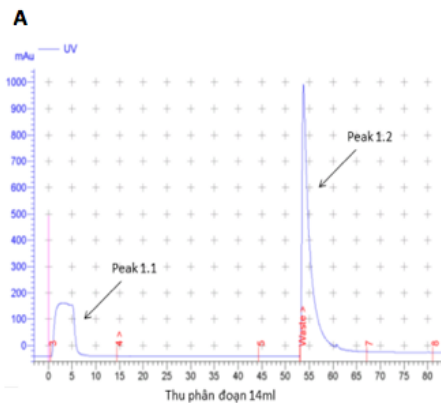
Huyết thanh người sau khi thu nhận được tủa trong dung dịch muối ammonium sulphate bão hòa 45% nhằm tách kháng thể tổng số khỏi hỗn hợp protein huyết thanh. Kết quả tủa được kiểm tra bằng điện di SDS – PAGE trên gel poly-acrylamide 12.5% (Hình 1) mẫu cặn tủa cho thấy sự xuất hiện của chuỗi nặng (50kDa) và chuỗi nhẹ (25kDa) của phân tử kháng thể. Khi so sánh các giếng điện di mẫu cặn tủa với mẫu dịch nổi sau tủa và huyết thanh ban đầu, dễ nhận thấy albumin (khoảng 66kDa) là protein chiếm tỉ lệ lớn nhất trong huyết thanh người đã được loại khỏi phân đoạn cặn tủa chứa IgG. Tuy nhiên, phân đoạn cặn tủa vẫn chứa một số protein tạp ngoài IgG, vì vậy cần tiến hành tinh chế thêm để thu được IgG người có độ tinh sạch cao hơn.



**Hình 1** Kết quả điện di biến tính SDS – PAGE 12.5% kiểm tra huyết thanh (HT) người tủa trong ammonium sulphate 45%. Protein trên gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie Blue.

### 3.1.2 Sắc kí ái lực qua cột protein G

Sau quá trình sắc kí ái lực qua cột protein G, thu được hai phân đoạn. Quan sát sắc kí đồ (Hình 2A), phân đoạn 1 chứa các protein không bám cột, phân đoạn 2 chiếm tỉ lệ lớn hơn



**Hình 2** Kết quả sắc kí ái lực qua cột protein G tinh chế IgG người. A – Sắc kí đồ thể hiện sự phân tách của protein sau khi qua cột.

B – Điện di SDS-PAGE các mẫu trước và sau sắc kí khi xử lí (+Mer) và không xử lí (-Mer) với Mercaptoethanol.

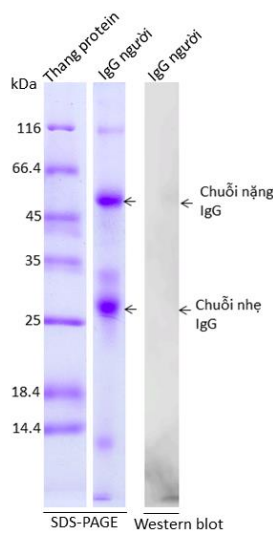
Protein trên gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie Blue.

## 3.2 Kết quả gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ với IgG người

### 3.2.1 Thỏ trước khi tiêm mẫn cảm không có đáp ứng với kháng nguyên IgG người

Phương pháp Western Blot lai IgG người với huyết thanh thỏ trước khi tiêm được áp dụng để kiểm tra sự có mặt của kháng thể thỏ kháng kháng nguyên trong mẫu huyết thanh trước khi gây mẫn cảm nhằm xác định hiệu suất và khả

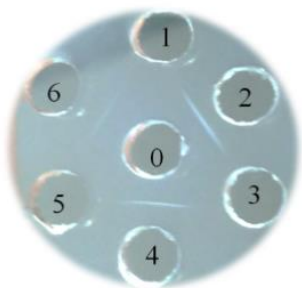
năng tạo kháng thể của thỏ khi gây đáp ứng miễn dịch. Quan sát kết quả lai mẫu huyết thanh thỏ trước khi gây mẫn cảm với kháng nguyên IgG người (Hình 3), trên màng lai không xuất hiện vạch IgG người, chứng tỏ trong huyết thanh thỏ không có kháng thể kháng IgG người và có thể sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch.



**Hình 3** Kết quả kiểm tra đáp ứng của thỏ với kháng nguyên trước khi gây mẫn cảm. Protein trên gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie Blue.

3.2.2 Kết quả đánh giá chất lượng kháng thể thỏ

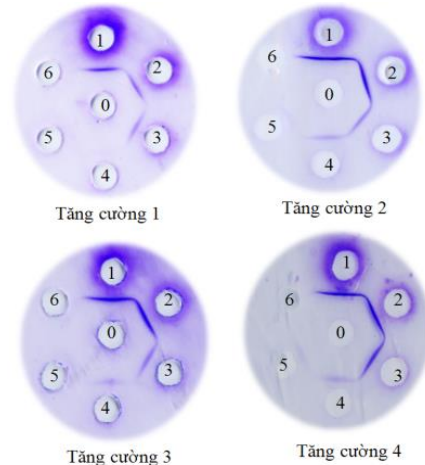
Hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ với IgG người được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán kép trên thạch (Ouchterlony). Mục đích của thử nghiệm kiểm tra đáp ứng mẫn cảm là để loại bỏ các con vật không mẫn cảm hoặc đáp ứng yếu với kháng nguyên (KN) khi được gây đáp ứng miễn dịch. Kết quả Hình 4 thể hiện sự kết tủa của phản ứng kháng nguyên – kháng thể. Các giếng 1, 3, 5 không xuất hiện đường tủa, hay nói cách khác là không có kháng thể (KT) phản ứng với IgG người khuếch tán ra từ giếng 0. Ngược lại ở các giếng 2, 4, 6 chứa huyết thanh thỏ sau TC1 có xuất hiện đường tủa với giếng 0, chứng tỏ trong huyết thanh (HT) thỏ sau khi tiếp xúc với kháng nguyên đã xuất hiện KT đặc hiệu và có thể được tiếp tục thực hiện kỹ thuật trường thành ái lực.



**Hình 4** Kết quả thử kháng huyết thanh sau lần tiêm tăng cường 1. Giếng 0: kháng nguyên (IgG người). Các giếng 1, 3, 5: huyết thanh thỏ trước mẫn cảm. Các giếng 2, 4, 6: huyết thanh thỏ sau tiêm tăng cường lần 1.

Hình 5 trình bày sự đánh giá nồng độ KT đặc hiệu trong HT của thỏ sau các lần tiêm tăng cường. Ở lần tiêm tăng cường 1 chỉ xuất hiện 3 vạch kết tủa giữa KN và KT ở các nồng độ từ 1/2 đến 1/8. Ở lần TC 2 và TC3 xuất hiện thêm 1 vạch kết

tủa tại nồng độ huyết thanh 1/16 và đến lần TC4 thì xuất hiện thêm vạch kết tủa ở nồng độ 1/32. Điều này cho thấy kháng thể trong huyết thanh thỏ sau các lần tiêm tăng cường đã tăng dần cả về lượng lẫn độ đặc hiệu đối với KN IgG người. Kết quả này đúng với lý thuyết về sự đáp ứng miễn dịch và giúp xác định được thời điểm có thể thu nhận kháng thể có chất lượng.



**Hình 5** Kết quả hiệu giá kháng thể thể hiện qua các lần tiêm tăng cường: Các giếng từ 1 đến 6 tương ứng với độ pha loãng của huyết thanh 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

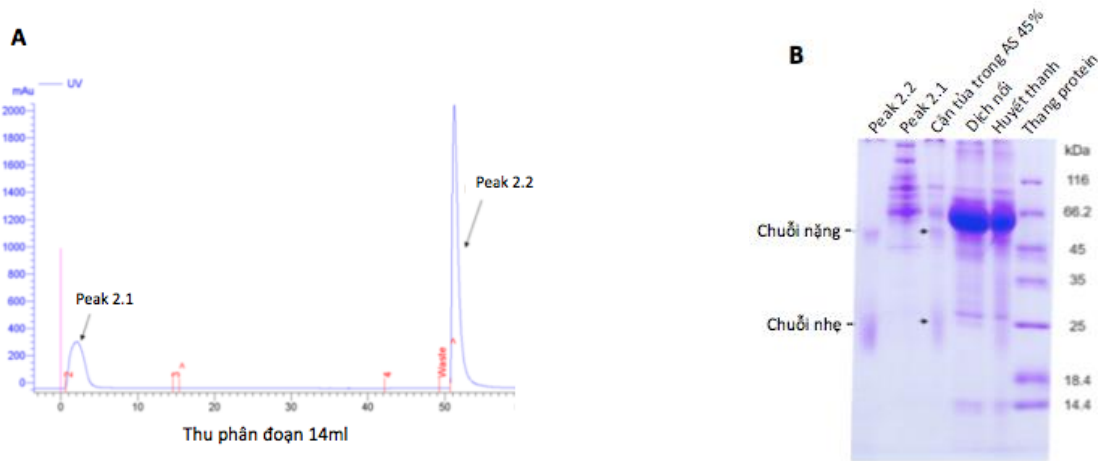
3.3 Kết quả tinh chế IgG thỏ kháng IgG người

3.3.1 Tủa huyết thanh với ammonium sulphate 45%

Theo kết quả hiệu giá kháng thể, chúng tôi sử dụng huyết thanh sau lần tiêm TC4 để tinh chế IgG thỏ kháng IgG người. Kết quả điện di biến tính SDS – PAGE trên gel poly-acrylamide 12.5% (Hình 6B) cho thấy sau quá trình tủa đã loại được hầu hết các protein không mong muốn, thu được kháng thể IgG ở phân đoạn cận tủa. Quan sát giếng cận tủa trong AS 45%, dễ dàng nhận diện được phân tử IgG với chuỗi nặng 50kDa và chuỗi nhẹ 25kDa trên gel điện di. Ngoài ra, khi quan sát giếng dịch nổi sau tủa vẫn thấy sự có mặt của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử IgG, tuy với một lượng rất nhỏ. Điều này chứng tỏ quá trình tủa HT thỏ bằng muối AS 45% chưa thu được toàn bộ KT trong HT. Phân đoạn cận tủa chứa IgG nhưng đồng thời cũng lẫn một số protein khác, do đó cần tiếp tục bước tinh chế tiếp theo để thu được IgG thỏ tinh sạch hơn.

3.3.2 Sắc kí ái lực qua cột protein G

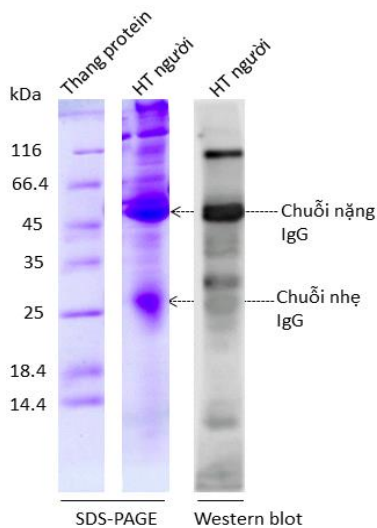
Sắc kí đồ (Hình 6A) cho thấy sau sắc kí thu được hai phân đoạn: Phân đoạn 1 có chứa protein không bám cột; phân đoạn 2 chứa các protein bám cột, kì vọng chỉ chứa IgG tinh sạch. Peak 2.1 và peak 2.2 sau sắc kí được kiểm tra bằng phương pháp điện di biến tính SDS – PAGE trên gel poly-acrylamide 12.5% (Hình 6B), kết quả điện di cho thấy phương pháp sắc kí qua cột protein G đã loại sạch các protein tạp. Quan sát giếng Peak 2.1 không thấy chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của IgG, chứng tỏ quá trình sắc kí diễn ra tốt và IgG không bị thất thoát.



**Hình 6** Kết quả sắc kí ái lực qua cột protein G tinh chế IgG người. A – Sắc kí đồ thể hiện sự phân tách của protein sau khi qua cột. B – Điện di SDS-PAGE các mẫu trước và sau sắc kí khi xử lí với Mercaptoethanol. Protein trên gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie Blue.

### 3.3.3 Kiểm tra hoạt tính bắt kháng nguyên của IgG thô sau tinh chế

Khả năng bắt kháng nguyên của IgG thô sau tinh chế được kiểm tra bằng phương pháp lai Western blot với huyết thanh người. Kết quả lai cho thấy, IgG thô sau tinh chế vẫn giữ được hoạt tính bắt kháng nguyên IgG người, thể hiện ở 2 vạch chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của IgG người trên màng lai (Hình 7). Tuy nhiên, sau 2 bước tinh chế, IgG thô thu được chưa phải là kháng thể kháng đặc hiệu IgG người, cần tiếp tục tinh chế để thu được IgG đặc hiệu hơn với IgG người.



**Hình 7** Kết quả kiểm tra hoạt tính của IgG thô sau tinh chế. Lai western blot IgG thô sau tinh chế với huyết thanh (HT) người

Như vậy, sau sắc kí qua cột protein G, chúng tôi đã thu được IgG thô với độ tinh sạch khá cao, ước tính khoảng > 95% theo kết quả điện di (quan sát trực quan). Từ 1ml huyết thanh thô ban đầu, sau 2 bước tinh chế gồm tủa bằng muối AS 45% và sắc kí ái lực qua cột protein G, thu được 10.97mg IgG tinh sạch. Tổng thể tích huyết thanh thô thu được sau 6 tháng gây đáp ứng miễn dịch là 70ml, tức là có khoảng 80mg IgG thô tinh sạch thu nhận được sau khi kết thúc đề tài.

## 4 Kết luận

Với mục tiêu sản xuất kháng thể IgG thô kháng kháng nguyên IgG người với độ tinh sạch cao nhằm thay thế cho các nguồn nhập ngoại cũng như giảm thiểu tối đa các chi phí phát sinh khi mua từ nước ngoài, chúng tôi đã thu được những kết quả sau: (1) Tinh sạch kháng thể IgG người thành công với độ tinh sạch khoảng 95%, lượng kháng thể IgG thu được là 5.33mg/ml huyết thanh người. (2) Tạo thành công kháng thể IgG thô kháng kháng nguyên IgG người. (3) Thu nhận được 70ml huyết thanh thô chứa KT kháng IgG người. (4) Tinh sạch thành công kháng thể IgG thô kháng kháng nguyên IgG người với độ tinh sạch cao, lượng kháng thể IgG thu được là 10.97mg/ml huyết thanh thô.

## Tài liệu tham khảo

1. Purification of Antibodies IgG with Ammonium Sulphate. Retrieved 10 August 2017, from vlab.amrita.edu
2. Paul Haney, et al. Molecular weight cut-off (MWCO) specifications and rates of buffer exchange with Slide-A-Lyzer Dialysis Devices and Snakeskin Dialysis Tubing
3. Protocol of Antibody Purification. Vol. 3. GE Healthcare Life Sciences
4. Mahmood Tahrin and Ping-Chang Yang. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. North American Journal of Medical Sciences, 4(9), 429-434
5. Ouchterlony Double diffusion – Pattern. Retrieved 10 August 2017, from vlab.amrita.edu

## Production of rabbit IgG antibodies against human IgG

Thai Thị Tuyet Trinh, Tran Thi Cam Tu, Le Thi Phuong Thao, Nguyen Huu Hung\*

Faculty of Biotechnology and , Nguyen Tat Thanh University

\*nhhung@ntt.edu.vn

**Abstract** This paper presented the results on producing rabbit IgG antibodies anti human IgG antigens by intradermal injected immunization and purifying IgG by ammonium sulphate precipitation and protein G affinity chromatography. Furthermore, this paper also presented Ouchterlony Double Immunodiffusion Assay and Western Blotting on detecting and quantification of antibodies. In this study, we successfully produced anti-human IgG antibodies in the rabbits. After purification by protein G affinity chromatography, the antibodies were shown recognise human IgG in the human serum and can be further considered as important reagent for development of serodiagnosis applications.

**Keywords** Affinity chromatography, purify IgG, protein G, rabbit IgG anti human IgG.