

CREATING THE HYBRIDOMA TO PRODUCE MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT ANTIGEN DES-GAMMA-CARBOXY-PROTHROMBIN**Vo Thi Bich Thuy^{1*}, Ho Truong Giang², Nguyen Thi Diem¹, Tran Thi Hop¹, Nghiem Ngoc Minh¹**¹*Institute of Genome Research - Vietnam Academy of Science and Technology*²*Vietnam Military Medical Academy*

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 18/6/2024 Revised: 26/9/2024 Published: 27/9/2024	To create a hybrid cell line producing monoclonal antibodies against recombinant Des gamma carboxy prothrombin (DCP) antigen in purebred BALB/c mice. Recombinant DCP antigen was mixed with FIA adjuvant and injected into mice. Lympho B cells were harvested from the spleen and lymph nodes of the mice and fused in DMEM medium supplemented with PEG. On the 9th day of culture, cells reached approximately >80% confluency, and hybridoma cells capable of producing specific antibodies against the recombinant antigen were screened, resulting in the selection of the two best-performing hybridoma cell lines. The antibody titers were evaluated after scaling up the cell numbers, and successfully harvesting the monoclonal antibody-producing hybridoma lines. The concentration of monoclonal antibodies in the harvested supernatant from the two hybridoma lines, DCP1 and DCP2, reached a concentration of 1.73 (mg/ml) for DCP1 and 2.15 (mg/ml) for DCP2. These are important initial successes, aiming to create early diagnosis kits for hepatocellular carcinoma.
KEYWORDS	
HCC	
Des gamma carboxy prothrombin	
Hybrid cell line	
Monoclonal antibody	
Recombinant antigen	

TẠO DÒNG TẾ BÀO LAI SINH KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP DES-GAMMA-CARBOXY-PROTHOROMBIN**Võ Thị Bích Thủy^{1*}, Hồ Trường Giang², Nguyễn Thị Diễm¹, Trần Thị Hợp¹, NghiêM Ngoc Minh¹**¹*Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam*²*Học viện Quân y*

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 18/6/2024 Ngày hoàn thiện: 26/9/2024 Ngày đăng: 27/9/2024	Nghiên cứu nhằm tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên tái tổ hợp Des-gamma-carboxy-prothrombin (DCP) trên chuột nhắt trắng thuần chủng BALB/c. Kháng nguyên tái tổ hợp DCP được phối trộn với chất bổ trợ FIA, tiêm vào chuột. Dung hợp tế bào lympho B được từ hạch lách và hạch bẹn của chuột vào môi trường DMEM có chất xúc tác PEG. Ngày thứ 9 nuôi cấy, tế bào đạt khoảng > 80% độ phủ bề mặt, tiến hành sàng lọc các tế bào lai có khả năng tiết kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp, chúng tôi chọn được 2 dòng tế bào sinh kháng thể tốt nhất. Dịch báng được đánh giá kháng thể sau khi tăng số lượng tế bào và thu nhận thành công 2 dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng lại kháng nguyên tái tổ hợp. Kết quả hàm lượng kháng thể đơn dòng trong dịch báng thu được từ hai dòng tế bào DCP1 và DCP2 đạt nồng độ lần lượt là 2,15 (mg/ml) và 1,73 (mg/ml). Đây là bước quan trọng, hướng tới tạo kit chẩn đoán sớm ung thư biểu mô tế bào gan.
TỪ KHÓA	
HCC	
Des gamma carboxy prothrombin	
Dòng tế bào lai	
Kháng thể đơn dòng	
Kháng nguyên tái tổ hợp	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10624>* Corresponding author. Email: thuytbvo.igr@gmail.com

1. Giới thiệu

Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là một trong những loại ung thư phổ biến nhất trên toàn cầu và gây ra nhiều vấn đề nghiêm trọng, ảnh hưởng đến sức khỏe và khiến nó trở thành một trong ba loại ung thư hàng đầu gây tử vong theo thống kê của GLOBOCAN năm 2022 [1]. Điều trị HCC thường gặp khó khăn do việc phát hiện muộn, tỷ lệ tái phát tăng cao, kháng lại hóa trị và xạ trị cổ điển,... Mặc dù bệnh ở giai đoạn sớm có tỷ lệ sống sót ≥ 5 năm lên đến 70%, tuy nhiên hầu hết bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn trung bình hoặc muộn, khi đó các phương pháp điều trị khỏi sẽ không còn hiệu quả khiến cho khả năng sống của bệnh nhân không thể kéo dài quá 1,5 năm [2].

Các nỗ lực nghiên cứu hiện nay đang tập trung vào việc xác định những bệnh nhân mắc ung thư biểu mô tế bào gan ở giai đoạn sớm [3], từ đó tăng hiệu quả điều trị, tăng khả năng sống cho bệnh nhân, cũng như bệnh nhân sẽ được áp dụng hiệu quả hơn bởi các phương pháp điều trị mới [4], [5]. Nhiều chỉ số dự đoán hoặc dự phòng đang được sử dụng hoặc nghiên cứu để cải thiện chẩn đoán [6], [7]. Trong số các chỉ số này, Des gamma carboxy prothrombin (DCP) trong huyết thanh là một chỉ số đang được ứng dụng rộng rãi [8], [9]. DCP là một protein bất thường được tạo ra bởi sự thiếu vitamin K của prothrombin, một yếu tố đông máu được sản xuất bởi gan. Khi các tế bào gan đang trong quá trình biến đổi ác tính, hệ thống carboxyl hoá phụ cảm ứng bởi vitamin K gặp trở ngại, dẫn đến sản sinh ra DCP (nên còn có tên là PIVKA-II, protein induced by vitamin K absence/antagonist-II) [10]. Do DCP được sản xuất bởi các khối u gan nên nồng độ thường tăng lên khi bị HCC [11], [12]. Nhiều nghiên cứu trên toàn cầu chỉ ra rằng DCP có độ nhạy cao hơn và mang giá trị chẩn đoán độc lập so với chỉ tiêu AFP trong việc chẩn đoán sớm HCC [13]. Khi kết hợp sử dụng cả hai protein DCP và AFP sẽ gia tăng khả năng phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan [14].

Do tính ứng dụng cao của DCP, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên tái tổ hợp DCP trên chuột nhắt trắng thuần chủng BALB/c trong quy mô phòng thí nghiệm.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Kháng nguyên tái tổ hợp DCP đã được tinh sạch do Phòng Hệ gen học vi sinh thuộc Viện Nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp, được sử dụng để gây kích ứng cho động vật thí nghiệm.

Chuột thuần chủng BALB/c 05 tuần tuổi (nguồn từ Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương), khỏe mạnh được chọn để gây kích ứng miễn dịch và thu nhận tế bào lympho B.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Gây kích ứng cho chuột

Gây miễn dịch lần 1: Chuột được gây miễn dịch lần 1 với kháng nguyên DCP bằng cách tiêm kháng nguyên DCP (pha loãng bằng PBS tới nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) đã được phối trộn với nhũ tương Freund's Complete Adjuvant (FCA) theo tỉ lệ 1:1.

Gây miễn dịch lần 2: Sau 3 ngày gây miễn dịch lần 1, tiến hành gây miễn dịch lần 2 bằng cách tiêm kháng nguyên tái tổ hợp (nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) đã được phối trộn với Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) theo tỉ lệ 1:1 vào 2 gan bàn chân của chuột.

Gây miễn dịch lần 3: Sau 6 ngày gây miễn dịch lần 1, tiến hành gây miễn dịch lần 3, tiêm nhắc lại kháng nguyên DCP đã được phối trộn với FIA vào dưới da hai bàn chân của chuột. Trước khi tiêm cần sát trùng vùng bàn chân chuột bằng bông cồn 70°. Khi tiêm các dịch nhũ tương, cần chú ý tránh các mạch máu lớn của chuột. Cung cấp đủ thức ăn, nước uống cho chuột và theo dõi chuột mỗi ngày ít nhất 2 lần. Nếu vết tiêm có dấu hiệu hoại tử cần loại bỏ chuột và gây miễn dịch thay thế cho con khác.

2.2.2. Phục hồi tế bào myeloma

Tế bào myeloma được rửa đông trong cốc nước ấm 37°C. Sau đó chuyển huyền dịch tế bào sang ống falcon 15 ml có chứa sẵn 10 ml môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS, xoáy chặt nắp ống, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/5 phút. Loại bỏ dung dịch nổi chứa chất bảo quản phía trên, thu cận tế bào. Hòa cận tế bào trong 20 ml môi trường DMEM 10% FBS, dùng pipet đảo đều và chuyển toàn bộ huyền dịch tế bào vào trong chai nuôi cấy T75. Quan sát dưới kính hiển vi soi ngược xem tỉ lệ sống của tế bào. Sau đó nuôi cấy tế bào trong tủ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂. Hàng ngày theo dõi sự phát triển của tế bào.

2.2.3. Cấy chuyển và nhân giống tế bào myeloma

Sau khi phục hồi tế bào khoảng 72 giờ, mật độ tế bào trong chai nuôi cấy đạt tới 80-90% bề mặt chai nuôi. Để đảm bảo sự phát triển của tế bào, cũng như đủ lượng tế bào để tiến hành dung hợp, cần nhân giống tế bào ra các chai nuôi mới. Bỏ môi trường cũ trong chai nuôi cấy, rửa lại với PBS 1X. Bổ sung 1 ml trypsin 0,25% lắng đều mặt đáy, để khoảng 5-10 phút đến khi tế bào bong hết khỏi mặt đáy, lắc mạnh chai nuôi cấy để các tế bào tách khỏi đáy chai, bổ sung 15 ml môi trường DMEM (5% FBS) vào chai nuôi cấy. Chuyển toàn bộ dịch tế bào sang ống falcon 50 ml. Ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/5 phút. Loại bỏ toàn bộ dịch tế bào ở trên. Hòa cận tế bào trong 1 ml môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS. Đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer. Pha loãng tế bào để đạt nồng độ 2×10^5 tế bào/ml môi trường. Sau khi pha loãng đạt tới nồng độ trên, mỗi chai nuôi tế bào T75 bổ sung 20 ml tế bào. Đưa chai nuôi cấy vào trong tủ ấm 37°C, trong điều kiện có CO₂.

2.2.4. Sàng lọc tế bào lai có khả năng tiết kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp

Kháng nguyên tái tổ hợp được pha loãng trong đệm Bicarbonate 0,05 M, pH 9,6 tới nồng độ 4 µg/ml. Bổ sung 100 µl vào mỗi giếng của đĩa ELISA. Ủ đĩa ở 37°C trong 2h. Loại bỏ kháng nguyên thừa trong các giếng. Rửa các giếng bằng 200 µl/giếng dung dịch PBS bổ sung 0,05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Blocking bằng 100 µl dung dịch 0,5% BSA ở 37°C trong 1h. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0,05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 µl dịch nuôi cấy ở các giếng có tế bào lai vào các giếng theo thứ tự và ghi lại vị trí các giếng trong đĩa nuôi cấy tương ứng, ủ đĩa 37°C trong 1h. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0,05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 µl kháng thể cộng hợp (HRP-IgG Goat anti Mouse) vào mỗi giếng. Ủ nhiệt độ phòng trong 1h. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0,05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 µl cơ chất (TMB), 100 µl/giếng. Dừng phản ứng bằng 50 µl dung dịch HCl 1M. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm [15].

2.2.5. Đánh giá và kiểm tra hiệu giá kháng thể

Nuôi tăng sinh các dòng tế bào sinh kháng thể đặc hiệu: Chỉ những dòng tế bào được chứng minh là không có mầm bệnh từ chuột và đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp mới được chọn để tạo báng trên chuột. Các dòng tế bào lai hybridoma được nuôi cấy tăng lượng trong chai nuôi cấy tế bào T75 sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào DMEM có bổ sung 5% FBS (huyết thanh bào thai bò). Một chai nuôi cấy tế bào T75 chứa đủ tế bào để tiêm 4-5 con chuột. Đảm bảo rằng các tế bào khỏe mạnh và chúng không bị nhiễm vi sinh vật. Lắc nhẹ chai nuôi cấy cho các tế bào lai bung ra khỏi bề mặt nuôi cấy, chuyển toàn bộ huyền phù tế bào vào ống fancel 50 ml. Ly tâm các tế bào trong ống ly tâm 50 ml ở 1500 vòng/5 phút. Sử dụng phần dịch nổi phía trên để kiểm tra chất lượng của tế bào lai sinh kháng thể bằng phương pháp ELISA [15]. Các tế bào lai được huyền phù nhẹ nhàng trong đệm PBS vô trùng (nước muối đệm sinh lý) sao cho số lượng tế bào lai nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^7 tế bào. Sử dụng buồng đếm hồng cầu để đếm số lượng tế bào lai phù hợp dùng để tiêm chuột tạo báng. Pha loãng tế bào lai bằng dung dịch đệm PBS sao cho thể tích tiêm vào là 0,5 ml có chứa 2×10^6 tế bào lai. Rút các tế bào lên trong một ống tiêm 1 ml. Các tế bào sẽ nhanh chóng lắng xuống, do đó, ngay trước khi tiêm chuột, hãy “lắc” ống tiêm một thời gian ngắn để trộn đều chúng lên.

2.2.6. Lựa chọn và gây bệnh trên chuột BALB/c

Lựa chọn 5 chuột cái khỏe mạnh 4-6 tuần tuổi, không mang thai để gây bệnh. Tiêm 0,5 ml dung dịch pristane (2, 6, 10, 14 tetramethylpentadecane, Sigma) vào trong khoang phúc mạc ở góc phần tư phía dưới bên phải của bụng mỗi chuột. Chờ 7-10 ngày và không quá 30 ngày, sau đó tiêm 0,5 ml dòng tế bào lai chứa 2×10^6 tế bào vào khoang phúc mạc của những con chuột đã được pristane trước đó. Theo dõi chuột sau tiêm hằng ngày, quan sát và đánh giá tình trạng của mỗi chuột, ghi lại thời điểm xuất hiện bệnh trong xoang phúc mạc của chuột.

2.2.7. Thu nhận dịch bệnh chuột

Sau 3-4 ngày xuất hiện bệnh, khi bụng chuột căng phồng, tiến hành thu dịch bệnh. Gây mê chuột bằng chloroform, sau đó sát trùng bề mặt ổ bụng chuột bằng cồn 70. Tạo một đường cắt vào khoang bụng, không làm đứt cơ, đưa ống tiêm 1 ml (không có kim) dọc theo thành cơ và hút dịch bệnh. Dịch được cho vào ống fancel vô trùng. Để dịch bệnh ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm để tách huyết thanh khỏi các thành phần máu khác. Chuyển dịch màu vàng rom (huyết thanh) vào ống bảo quản vô trùng bằng pipet hoặc ống tiêm vô trùng. Bảo quản ở -80°C cho đến thời điểm tinh sạch. Các kháng thể đơn dòng nhận ra và bắt cặp với duy nhất một quyết định kháng nguyên (epitop) và cho phép định lượng lượng nhỏ kháng nguyên bằng phương pháp ELISA.

2.3. Đạo đức trong nghiên cứu

Các nội dung thí nghiệm liên quan đến mẫu người, động vật sử dụng trong nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (mã số 06-2020/NCHG-HĐĐĐ ngày 12/10/2020).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Gây kích ứng miễn dịch

Gây kích ứng cho động vật thí nghiệm là bước đầu tiên trong quá trình sản xuất kháng thể đơn dòng. Chuột BALB/c được tiêm kháng nguyên đã chọn, sau đó kháng thể được tạo ra qua các mũi tiêm nhắc lại trong khoảng vài tuần để kích thích sự phát triển của tế bào miễn dịch lympho B (Hình 1).

Chuột được gây kích ứng miễn dịch lần đầu với kháng nguyên tái tổ hợp (nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) phối trộn với chất bổ trợ FCA. Sau 24 giờ gây kích ứng miễn dịch lần 1 với kháng nguyên tái tổ hợp DCP cho thấy chuột ăn uống, hoạt động bình thường, cân nặng không thay đổi, không có biểu hiện bệnh lý, lông mượt, phản xạ tốt, khỏe mạnh.



Hình 1. Chuột BALB/c được gây kích ứng miễn dịch với kháng nguyên tái tổ hợp DCP 3 lần, vị trí tiêm ở hai gan bàn chân.

Tiếp tục gây kích ứng miễn dịch lần 2 (sau 3 ngày gây kích ứng miễn dịch lần 1) và lần 3 (sau 6 ngày kích ứng miễn dịch lần 1). Kháng nguyên tái tổ hợp DCP (nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) được phối trộn với chất bổ trợ FIA, tiêm vào chuột với tổng thể tích là 50 μl / con. Sau 24 giờ mỗi lần gây

kích ứng miễn dịch, quan sát thấy chuột ăn uống, hoạt động bình thường, phản xạ tốt, khỏe mạnh. Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài.

Kết quả sau ba lần gây kích ứng miễn dịch của những con chuột BALB/c với kháng nguyên tái tổ hợp cho thấy chuột đều ăn uống, hoạt động bình thường, không thay đổi cân nặng, không có bất thường về bệnh lý. Lách và hạch bẹn hơi sưng chứng tỏ chuột có phản ứng miễn dịch với kháng nguyên tái tổ hợp DCP được tiêm vào. So sánh với 02 chuột đối chứng chỉ được tiêm nước cất vô trùng cho thấy chuột đối chứng ăn uống, hoạt động bình thường, phát triển bình thường, không có biểu hiện bất thường về bệnh lý. Như vậy, cho thấy nồng độ kháng nguyên tái tổ hợp cũng như chất bổ trợ FCA, FIA đưa vào chuột là phù hợp, không gây độc cho chuột.

3.2. Dung hợp tế bào myeloma và tế bào lympho B

Tách tế bào lympho B từ lách và hạch bẹn của chuột. Chuột sau khi được tiêm kháng nguyên tái tổ hợp sẽ được tiến hành mổ thu lách và hạch bẹn để tách tế bào lympho B như Hình 2.



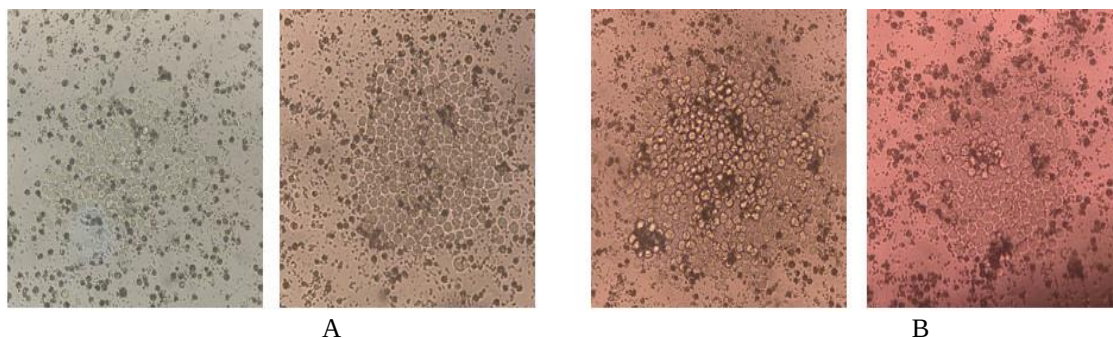
Hình 2. Mổ chuột thu lách và hạch bẹn

Tế bào lympho B được giữ trong môi trường DMEM để dung hợp với tế bào myeloma, sau đó được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng như Hình 3.



Hình 3. Tế bào lympho B được dung hợp với tế bào myeloma và nuôi cấy trong môi trường HAT ở đĩa 96 giếng

Kết quả thu được sau 6 và 9 ngày nuôi cấy được thể hiện như Hình 4. Sau 6 ngày nuôi cấy nhận thấy đã có các tế bào lai mọc trên đĩa nuôi cấy. Quan sát thấy các tế bào lai tập trung lại thành đám, tròn và phát triển nhanh và mạnh mẽ. Các tế bào thường sẽ mọc đơn lẻ, các tế bào lympho B và myeloma không được dung hợp sẽ teo dần và chết. Ngày thứ 9 nuôi cấy, khi tế bào đạt khoảng > 80% độ phủ bề mặt thì tiến hành sàng lọc các tế bào lai có khả năng tiết kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp bằng phương pháp ELISA.



Hình 4. Cụm tế bào lai được quan sát trên kính hiển vi quang học sau 6 ngày nuôi cấy (A) và 9 ngày nuôi cấy (B)

3.3. Gây bệnh trên chuột BALB/c

Trong quá trình sàng lọc, chúng tôi chọn được 2 dòng sinh kháng thể tốt nhất. Các tế bào lai này được kiểm tra đồng thời với kháng nguyên *E.coli* chủng BL21. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy các dòng tế bào lai đều sinh kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp DCP với giá trị OD của dòng DCP1 và dòng DCP2 tương ứng là 1,4869 và 1,3895. Ngược lại với kháng nguyên là *E.coli* chủng BL21 cho kết quả không đặc hiệu với kháng nguyên này. Từ đó cho thấy rằng các dòng tế bào lai đều đạt chất lượng, sinh kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp. Chúng tôi tiến hành tăng số lượng tế bào và sử dụng để gây bệnh trên chuột BALB/c.

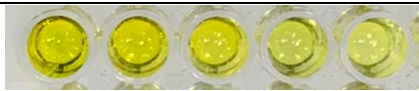
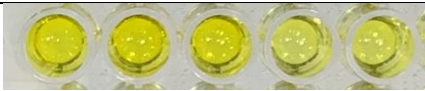
Bảng 1. Kiểm tra tính đặc hiệu của các dòng tế bào lai sử dụng kháng nguyên gắn bản tương ứng và kháng nguyên *E.coli* chủng BL21 trước khi tiêm chuột tạo bệnh bằng đọc ELISA

Dòng tế bào lai	Kháng nguyên gắn bản	
	Kháng nguyên tái tổ hợp	Kháng nguyên <i>E.coli</i> chủng BL21
Dòng DCP1	1,4869	0,3498
Dòng DCP2	1,3895	0,3818

3.4. Đánh giá hiệu giá kháng thể

Dung dịch bệnh chuột sau khi thu nhận sẽ được pha loãng thành các độ pha loãng tăng dần lần lượt là 100, 200, 400, 800 và 1600 lần, mỗi độ pha loãng được lặp lại 3 lần. Kết quả hiệu giá kháng thể đơn dòng được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra hiệu giá kháng trong dịch bệnh chuột từ dòng tế bào DCP1 (A) và dòng tế bào DCP2 (B) tại các độ pha loãng khác nhau

Độ pha loãng	100	200	400	800	1600	100	200	400	800	1600
Phản ứng ELISA										
	A					B				
Giá trị OD trung bình tại bước sóng 450 nm	2,843	2,887	1,978	0,923	0,563	2,203	2,210	1,463	0,801	0,501

Đối với dịch bệnh chuột thu nhận được từ DCP1 cho kết quả hiệu giá kháng thể tốt. Tại độ pha loãng 200 lần cho giá trị OD tương ứng là 2,887, giá trị OD chỉ bắt đầu giảm tại độ pha loãng 400 lần tương ứng với giá trị OD đạt 1,978 và giá trị OD đạt giá trị thấp nhất tại độ pha loãng 1600 là 0,563. Từ đó cho ta thấy rằng hiệu giá kháng thể dòng DCP1 cao cho tới độ pha loãng 800 lần. Đo nồng độ kháng thể bằng Bradford cho kết quả là 2,15 mg/ml.

Còn đối với dịch bệnh chuột được thu nhận từ dòng tế bào lai DCP2, đo Bradford cho thấy nồng độ protein là 1,73 mg/ml, tiếp tục đánh giá hiệu giá kháng thể cũng thu được kết quả khả

quan. Giá trị OD đo được vẫn ở mức cao tại độ pha loãng 200 lần là 2,210. Giá trị này cũng bắt đầu giảm tại độ pha loãng 400 là 1,465 và thấp nhất ở độ pha loãng 1600 lần là 0,501.

Từ đó cho ta thấy rằng kháng thể đơn dòng trong dịch báng thu được từ hai dòng tế bào lai DCP1 và DCP2 là đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp DCP, nồng độ kháng thể cao (từ 1,73 - 2,15 mg/ml). Các kháng thể đơn dòng này được lưu trữ trong điều kiện -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

4. Kết luận

Từ những kết quả nêu trên cho thấy, nghiên cứu đã tạo thành công 2 dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với protein DCP. Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo về chế tạo bộ kit kháng thể đơn dòng gắn nano DNA huỳnh quang đặc hiệu phục vụ chẩn đoán sớm ung thư biểu mô tế bào gan.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Nhiệm vụ khoa học và công nghệ theo Nghị định thư của Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam (mã số: NĐT.102-GER/21) và Chương trình hỗ trợ nghiên cứu cấp cao của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (mã số: NVCC40.01/23-24).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] International Agency for Research on Cancer and WHO, "Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2022," 2022. [Online]. Available: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/704-viet-nam-fact-sheet.pdf> or <https://nci.vn/tin-tuc/tinh-hinh-benh-ung-thu-tai-viet-nam-theo-globocan-2022-58>. [Accessed Mar. 27, 2024].
- [2] A. M. Johnson *et al.*, "Analytical validation of a novel multi-target blood-based test to detect hepatocellular carcinoma," *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 21, no. 11, pp. 1245-1252, 2021.
- [3] J. M. Llovet and J. Bruix, "Early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma," *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, vol. 14, no. 6, pp. 991-1008, 2000.
- [4] S. Sengupta and N. D. Parikh, "Biomarker development for hepatocellular carcinoma early detection: current and future perspectives," *Hepatic Oncology* vol. 4, no. 4, pp. 111-122, 2017.
- [5] P. Song *et al.*, "Biomarkers: evaluation of screening for and early diagnosis of hepatocellular carcinoma in Japan and china," *Liver Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 31-39, 2013.
- [6] M. Polanski and N. L. Anderson, "A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics," *Biomark Insights*, vol. 1, pp. 1-48, 2007.
- [7] L. X. Qin and Z. Y. Tang, "The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma," *World J Gastroenterol*, vol. 8, no. 3, pp. 385-392, 2002.
- [8] H. A. Liebman *et al.*, "Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma," *N Engl J Med*, vol. 310, no. 22, pp. 1427-1431, 1984.
- [9] Y. Mita *et al.*, "The usefulness of determining des-gamma-carboxy prothrombin by sensitive enzyme immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma," *Cancer*, vol. 82, no. 9, pp. 1643-1648, 1998.
- [10] M. Ishii *et al.*, "Simultaneous measurements of serum alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence for detecting hepatocellular carcinoma. South Tohoku District Study Group," *Am J Gastroenterol*, vol. 95, no. 4, pp. 1036-1040, 2000.
- [11] A. Nakao *et al.*, "Abnormal prothrombin (DES-gamma-carboxy prothrombin) in hepatocellular carcinoma," *Hepatogastroenterology*, vol. 38, no. 5, pp. 450-453, 1991.
- [12] N. I. Zakhary, S. M. Khodeer, H. E. Shafik, and C. A. Abdel Malak, "Impact of PIVKA-II in diagnosis of hepatocellular carcinoma," *J Adv Res*, vol. 4, no. 6, pp. 539-546, 2013.
- [13] Y. Shimauchi *et al.*, "A simultaneous monitoring of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin as an early diagnosis of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients," *Oncol Rep*, vol. 7, no. 2, pp. 249-256, 2000.
- [14] F. Xu *et al.*, "The Diagnostic Value of Serum PIVKA-II Alone or in Combination with AFP in Chinese Hepatocellular Carcinoma Patients," *Dis Markers*, vol. 2021, p. 8868370, 2021.
- [15] J. R. Crowther, "ELISA. Theory and practice," *Methods Mol Biol*, vol. 42, no. pp. 1-218, 1995.