

## NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG TẾ BÀO LAI SINH KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG PROGESTERONE

Nguyễn Thị Hải<sup>1</sup>, Lê Văn Phan<sup>2</sup>, Nguyễn Bá Mùi<sup>3</sup>, Nguyễn Hoàng Thịnh<sup>3</sup>,  
Nguyễn Thị Phương Giang<sup>3</sup>, Trần Hiệp<sup>3</sup>, Cù Thị Thiên Thu<sup>3</sup>, Phạm Kim Đăng<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>*Viện Sinh thái và Bảo vệ công trình*

<sup>2</sup>*Phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

<sup>3</sup>*Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

\*Tác giả liên hệ: [pkdang@vnua.edu.vn](mailto:pkdang@vnua.edu.vn)

Ngày gửi bài: 03.08.2019

Ngày chấp nhận đăng: 30.09.2019

### TÓM TẮT

Progesterone là hormone có liên quan chặt chẽ đến quá trình sinh lý sinh sản ở động vật. Nồng độ hormone này có ở trong máu, nước tiểu, sữa được sử dụng làm căn cứ để xác định có thai sớm ở bò. Để xác định được sự có mặt của progesterone bằng các phương pháp thử đặc hiệu như que thử nhanh thì một trong những bước quan trọng nhất là tạo được dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng progesteron. Phương pháp gây miễn dịch, thu tế bào lách ở chuột BALB/c, tạo dòng tế bào lai và ELISA đã được áp dụng trên cơ sở sử dụng ba loại kháng nguyên khác nhau, chuột đáp ứng miễn dịch tốt nhất khi tiêm kháng nguyên ở nồng độ 200 µg/mL/con, tỷ lệ giống có tế bào lai cao nhất ở mỗi loại kháng nguyên đạt từ 91,67% trở lên. Nghiên cứu đã tạo được 5 dòng tế bào lai (E4, E3, C6, H3, F10) có khả năng tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên progesterone antigen; 3 dòng tế bào lai (C12, D7, F11) có khả năng tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên progesterone BSA antigen; 3 dòng tế bào lai (G5, H3, A7) có khả năng tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen.

Từ khóa: Chuột BALB/c, ELISA, kháng thể đơn dòng, progesterone, tế bào lai.

### Study on Establishment of Hybrid Cell Lines Secreting Monoclonal Antibody for Progesterone

### ABSTRACT

Progesterone is a hormone that relates closely to the reproductive physiology of animals. The progesterone levels in blood, urine and milk have been used to determine pregnancy in cows. In order to detect the appearance of progesterone using specific tests, one must create hybrid cells that secrete monoclonal antibody for this hormone, as one of the most important factors. The methods of immunization, collection of spleen cells of BALB/c mice, production of hybrid cell lines and ELISA had been applied. Based on the use of different types of antigens, mice differently responded to selective progesterone antigens with the concentration of 200 µg/mL per mouse. The highest successful hybridization rate was 91.67%. The study created 5 hybrid cell lines (E4, E3, C6, H3, F10) secreting monoclonal antibodies for progesterone antigen, 3 hybrid cell lines (C12, D7, F11) secreting monoclonal antibodies for progesterone BSA antigen and 3 hybrid cell lines (G5, H3, A7) secreting monoclonal antibodies for progesterone-3-CMO: BSA antigen.

Keywords: BALB/c mice, ELISA, monoclonal antibody, progesterone, hybrid cell.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Progesterone và các dẫn xuất của nó thuộc nhóm steroid, chủ yếu do thể vàng tiết ra trong chu kỳ tính (sau khi trứng rụng, thể vàng hình thành) và trong giai đoạn mang thai (Gomes & Erb, 1965). Trong lĩnh vực chăn nuôi và thú y,

hormone progesterone được ứng dụng rộng rãi trong các chương trình quản lý nâng cao khả năng sinh sản như điều trị rối loạn sinh sản, điều khiển sinh sản theo kế hoạch, gây động dục đồng pha, cấy truyền phôi, chẩn đoán có thai cho bò (EMEA, 2004). Ở bò, nồng độ progesterone đạt giá trị cao nhất vào ngày 21 và 22 tính từ thời

điểm thụ thai (Burger, 1970; Bernard, 1996). Sự hiện diện của progesterone trong sữa và huyết thanh đã được ứng dụng để chẩn đoán mang thai sớm ở bò từ những năm 70 (Pope & cs., 1976; Thirapatsukun & Entwistle, 1978).

Hiện nay, có nhiều phương pháp để định lượng chính xác như sắc ký lỏng - khối phổ (LC/MS), hoặc các phương pháp bán định lượng đặc hiệu như kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA), kỹ thuật miễn dịch enzyme (ELISA) hay phương pháp định tính đặc hiệu như que thử nhanh dựa trên receptor hoặc kháng thể đặc hiệu... Trong đó, các phương pháp định lượng chính xác bằng sắc ký, phương pháp bán định lượng bằng miễn dịch đặc hiệu là các phương pháp có độ chính xác cao nhưng cần các thiết bị rất đắt tiền, vận hành phức tạp, cán bộ phân tích phải được đào tạo và có tay nghề cao mới có thể thực hiện được. Vì vậy, các phương pháp này chỉ được sử dụng trong nghiên cứu. Do đó, để đưa vào thực tế sản xuất, các nhà khoa học thường nghiên cứu, tìm kiếm các phương pháp đơn giản, dễ sử dụng để định tính progesterone.

Que thử nhanh (quick-stick) được chế tạo dựa trên cơ sở phản ứng kháng nguyên - kháng thể để xác định sự có mặt của các hormone sinh sản nói chung và của hormone progesterone nói riêng là giải pháp đã được phát triển và ứng dụng trong thực tế, không đòi hỏi các thiết bị công nghệ cao với kỹ thuật phức tạp.

Để chế tạo được que thử thai nhanh dựa vào xác định sự có mặt của hormone progesterone cần phải có các kháng thể đơn dòng có ái lực cao với hormone này. Do đó, việc chọn ra dòng tế bào có khả năng tổng hợp ra kháng thể kháng kháng nguyên có tính đặc hiệu và ái lực kháng nguyên - kháng thể cao là rất cần thiết, chúng sẽ là nguồn cung cấp kháng thể đặc hiệu progesterone rất tiềm năng và không giới hạn. Nghiên cứu này nhằm tạo dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng progesterone ứng dụng cho sản xuất que thử thai nhanh cho bò.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

- Kháng nguyên: 3 loại kháng nguyên bao gồm progesterone antigen (Mã code MBS238011, hãng Mybiosource, Mỹ), progesterone-3-BSA antigen (Mã code LA330, hãng East Coast Bio, Mỹ) và progesterone-3-CMO: BSA antigen (Mã code ND-R0752, hãng Novateinbio, Mỹ).

- Chuột BALB/c thuần chủng và dòng tế bào ung thư tủy xương Myeloma Sp2/0-Ag14 (Sigma, Mỹ).

- Hóa chất: dung dịch DMEM Gibco, Freund's adjuvants complete (FAC), Freund's adjuvants incomplete (FAI), PEG, PBS, FBS, Tween, HAT (Sigma, Mỹ)...

**Bảng 1. Bố trí thí nghiệm xác định nồng độ kháng nguyên thích hợp gây miễn dịch cho chuột**

Kháng nguyên	Lần thí nghiệm	Nồng độ kháng nguyên (µg/mL)				
		0	50	100	200	300
Progesterone antigen	1	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	3
Progesterone -3-BSA antigen	1	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	3
Progesterone-3-CMO: BSA antigen	1	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	3

## 2.2. Phương pháp

### 2.2.1. Gây miễn dịch cho chuột thuần chủng BALB/c bằng các kháng nguyên khác nhau

Một trăm ba mươi lăm chuột BALB/c được sử dụng để thử khả năng gây miễn dịch của các kháng nguyên, mỗi kháng nguyên thử trên 15 chuột với 5 liều khác nhau, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số lượng chuột thí nghiệm được bố trí theo bảng 1.

Chuột được gây miễn dịch theo phương pháp của Köhler & Milstein (1975), có cải tiến (Liddell & Cryer, 1991) như sau:

- Phối trộn kháng nguyên với các chất bổ trợ FAC hoặc FAI theo tỷ lệ 1:1

- Gây miễn dịch cho chuột theo các nồng độ khác nhau ở bảng 1 (mỗi chuột được tiêm lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 3 ngày)

- Lấy máu ở tim và thu huyết thanh sau 10 ngày gây miễn dịch để đánh giá khả năng đáp ứng bằng phương pháp ELISA.

### 2.2.2. Thu tế bào lympho B ở lách của chuột

Lách của 5 chuột có đáp ứng miễn dịch tốt nhất được thu theo phương pháp của Leger & Wsaldanha (2000). Tế bào sau khi tách ra được bảo quản trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS.

#### a. Tạo dòng tế bào lai (hybridoma) tiết kháng thể đơn dòng kháng progesterone

+ Đánh thức và nuôi tế bào: Chuyển ống tế bào Myeloma Sp2/0-Ag14 từ nitơ lỏng sang bể ủ ấm 37°C cho rã đông. Chuyển dung dịch chứa tế bào sang ống ly tâm, tiến hành ly tâm với tốc độ 1.000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn bỏ lớp dịch nổi, hòa tan cặn tế bào với môi trường nuôi DMEM có bổ sung HAT, rồi chuyển dung dịch tế bào sang chai nuôi cấy. Tế bào được nuôi trong tủ ấm với điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau 2-3 ngày thay môi trường 1 lần.

+ Dung hợp tế bào: Tiến hành dung hợp tế bào theo phương pháp của Köhler & Milstein (1975), tế bào Myeloma Sp2/0-Ag14 và tế bào Lympho B được trộn với 5 tỷ lệ khác nhau, sau đó

ly tâm ở tốc độ 1.000 vòng/phút, trong 5 phút và thu cặn tế bào. Nhỏ 0,3 mL dung dịch PEG 50% vào cặn tế bào, ủ trong 1 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó bổ sung tiếp 10mL dung dịch DMEM, ly tâm hỗn hợp ở 1.000 vòng/phút trong 5 phút và thu cặn tế bào. Hòa tan cặn tế bào trong môi trường DMEM có bổ sung HAT, 150 µL dung dịch tế bào được chia vào mỗi giếng trên đĩa loại 96 giếng và ủ trong tủ ấm 37°C. Sau 5-10 ngày loại bỏ dịch nuôi và thêm vào mỗi giếng 150 µL dung dịch DMEM có bổ sung HAT. Sau 10 ngày dung hợp, lấy dịch nổi và dùng phản ứng ELISA để sàng lọc tế bào dương tính.

+ Tạo dòng tế bào lai (hybridoma) tiết kháng thể đơn dòng kháng progesterone: Đã nuôi cấy tế bào có chứa tế bào lai cho kết quả ELISA dương tính cao nhất được lựa chọn để tạo dòng tế bào lai. Hút hỗn dịch tế bào sang ống ly tâm có chứa môi trường DMEM để pha loãng tế bào sao cho nồng độ đạt 1 tế bào/100 µL. Sau đó chuyển tế bào đã pha loãng sang các giếng nuôi cấy mới với thể tích 100 µL /1 giếng, nuôi ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sử dụng phản ứng ELISA để đánh giá lại khả năng sinh kháng thể của dòng tế bào lai. Từ đó, dòng tế bào lai có hiệu giá cao nhất sẽ được chọn và nhân lên.

+ Kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu giữa kháng thể đơn dòng với kháng nguyên tương ứng: Phương pháp ELISA được sử dụng để xác định khả năng bắt cặp chéo giữa các kháng thể đơn dòng với các kháng nguyên khác nhau như sau:

Phủ bản bằng 100 µL kháng nguyên progesteron trong dung dịch gắn ở 4°C qua đêm (nồng độ 125 ng kháng nguyên/giếng). Sau đó rửa bản 5 lần bằng Washing buffer để loại bỏ những kháng nguyên không gắn vào bề mặt bản. Phủ bản bằng 300 µL Washing buffer + 1% Skim milk trong 1 h ở 37°C. Rửa bản 5 lần bằng Washing buffer.

Bổ sung kháng thể 1 (dịch nổi của môi trường nuôi cấy) đã pha loãng 5.000 lần bằng Washing buffer + 1% Skim milk. Ủ ở 37°C trong 1 h. Rửa bản 5 lần bằng Washing buffer loại bỏ những kháng thể không liên kết đặc hiệu với kháng nguyên.

Đưa vào mỗi giếng 100 µL kháng thể 2 gắn enzyme peroxidase được pha loãng 10.000 lần

trong đệm Washing buffer + 1% sữa. Dem ủ bản ở 37°C trong 1 h. Rửa bản 10 lần bằng Washing buffer.

Đưa vào mỗi giếng 100 µL dung dịch cơ chất TMB. Ủ bản ở 37°C trong 10 phút.

Dừng phản ứng bằng cách bổ sung 50 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.

Đo giá trị OD<sub>450</sub> (mật độ quang học) bằng ELISA reader, những giếng có giá trị OD ≥ 0,5 được coi là dương tính, tức là có mặt của kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên progesterone.

### b. Xác định số lượng tế bào bằng buồng đếm Neubauer

Đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer:

Trộn 100 µL huyền dịch tế bào và 900 µL thuốc nhuộm trypan blue 0,22% (tỷ lệ pha 1/10)

Đưa hỗn hợp thuốc nhuộm và tế bào này lên buồng đếm.

Số tế bào trong 1 mL:

$$C = \frac{n \times d \times 10^4}{4}$$

Trong đó:

C: số tế bào trong 1 mL

n: số tế bào trong 4 ô vuông

d: nồng độ pha loãng

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khả năng đáp ứng miễn dịch của chuột với các kháng nguyên

Kết quả nghiên cứu cho thấy chuột được tiêm với 5 nồng độ khác nhau đều cho phản ứng miễn dịch. Ở cùng một nồng độ tiêm, giá trị OD<sub>450</sub> mẫu huyết thanh không có sự khác biệt

giữa các chuột được tiêm với các loại kháng nguyên khác nhau (p > 0,0001). Giá trị hiệu giá kháng thể có xu hướng tăng khi nồng độ kháng nguyên gây miễn dịch tăng. Giá trị OD<sub>450</sub> mẫu huyết thanh không có sự khác biệt lớn giữa các chuột được tiêm ở các nồng độ khác nhau (p > 0,0001). Tuy nhiên, với nồng độ kháng nguyên gây miễn dịch là 200 µg/mL/con thì giá trị hiệu giá kháng thể có xu hướng đạt giá trị cao hơn so với các nồng độ tiêm khác (Bảng 2).

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Cù Thị Thiên Thu & cs. (2017) nhưng có sự khác biệt so với nghiên cứu của Fantl & cs. (1982). Theo Fantl & cs. (1982), chuột BALB/c gây đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên 11α-hydroxyprogesterone ở liều 30 µg/con tốt hơn ở liều 5 µg/con. Sự khác biệt này có thể do sự khác biệt về cấu trúc kháng nguyên. Như vậy, với 3 kháng nguyên được lựa chọn trên thị trường đều có khả năng gây miễn dịch tốt trên chuột BALB/c.

### 3.2. Số lượng tế bào lympho B ở chuột gây miễn dịch

Thí nghiệm tiến hành đánh giá số lượng tế bào lympho B ở những chuột có đáp ứng miễn dịch tốt nhất với nồng độ kháng nguyên được tiêm 200 µg/mL/con. Số lượng tế bào lympho B của 5 chuột có đáp ứng miễn dịch tốt nhất với kháng nguyên progesterone antigen đạt giá trị trung bình là 1,94×10<sup>9</sup> tế bào, dao động từ 1,5×10<sup>9</sup> tế bào đến 2,7×10<sup>9</sup> tế bào; đối với kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen đạt giá trị trung bình là 1,64×10<sup>9</sup> tế bào, dao động từ 1,3×10<sup>9</sup> tế bào đến 2,2×10<sup>9</sup> tế bào; đối với kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen đạt giá trị trung bình là 1,72×10<sup>9</sup> tế bào, dao động từ 1,5×10<sup>9</sup> tế bào đến 2,2×10<sup>9</sup> tế bào (Bảng 3).

**Bảng 2. Giá trị OD<sub>450</sub> mẫu huyết thanh chuột ở các nồng độ gây miễn dịch khác nhau đối với từng loại kháng nguyên**

Tên kháng nguyên	Nồng độ kháng nguyên gây miễn dịch (µg/mL/con)				
	0	50	100	200	300
Progesterone antigen	0,081 <sup>a</sup> ± 0,012	0,597 <sup>ab</sup> ± 0,146	1,172 <sup>b</sup> ± 0,247	2,301 <sup>b</sup> ± 0,698	2,089 <sup>b</sup> ± 0,723
Progesterone -3-BSA antigen	0,064 <sup>a</sup> ± 0,006	0,514 <sup>ab</sup> ± 0,191	0,952 <sup>b</sup> ± 0,317	1,916 <sup>b</sup> ± 0,781	1,736 <sup>b</sup> ± 0,829
Progesterone-3-CMO: BSA antigen	0,067 <sup>a</sup> ± 0,005	0,526 <sup>ab</sup> ± 0,261	1,075 <sup>b</sup> ± 0,519	1,865 <sup>b</sup> ± 0,68	1,811 <sup>b</sup> ± 0,583

Ghi chú: Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình mang các chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa thống kê (P < 0,0001).

**Bảng 3. Số lượng tế bào lympho B ở chuột có khả năng đáp ứng miễn dịch tốt nhất với 3 kháng nguyên khác nhau**

Tên kháng nguyên	Hiệu giá kháng thể	Số lượng tế bào lympho B ( $\times 10^9$ )
Progesterone antigen	2,982	1,60
	2,913	2,70
	2,874	2,10
	2,864	1,50
	2,884	1,80
Progesterone -3-BSA antigen	2,542	1,70
	2,672	1,60
	2,913	2,20
	2,993	1,30
	2,943	1,40
Progesterone-3-CMO: BSA antigen	2,632	1,90
	2,719	1,60
	2,542	1,50
	2,275	1,40
	2,096	2,20

**Bảng 4. Kết quả lai (fusion) giữa tế bào Myeloma Sp2/0-Ag14 và tế bào lympho B của chuột BALB/c được gây miễn dịch với các kháng nguyên khác nhau**

Lần lai (fusion)	Số lượng tế bào dùng để lai		Số đĩa nuôi cấy tế bào (đĩa 96 giếng)	Tổng số giếng nuôi cấy tế bào	Tổng số giếng có tế bào lai	Tỷ lệ % số giếng có tế bào lai/giếng nuôi cấy tế bào
	Tế bào myeloma Sp2/0-Ag14	Tế bào lympho B				
Progesterone antigen						
1	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	8	768	723	94,14
2	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	8	768	654	85,16
3	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	8	768	743	96,74
4	$2,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	8	768	629	81,90
5	$2,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^8$	8	768	701	91,28
Progesterone-3-BSA antigen						
1	$1,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	8	768	602	78,39
2	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	8	768	721	93,88
3	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	8	768	589	76,69
4	$1,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	8	768	378	49,22
5	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	8	768	478	62,24
Progesterone-3-CMO: BSA antigen						
1	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	8	768	664	86,46
2	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	8	768	704	91,67
3	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	8	768	689	89,71
4	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	8	768	576	75,00
5	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	8	768	593	77,21

### 3.3. Kết quả tạo tế bào lai tiết kháng thể kháng progesterone

#### 3.3.1. Tạo tế bào lai

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tế bào lai (hybridoma cell) thu được tương đối cao (Bảng 4). Đối với kháng nguyên progesterone antigen, tỷ lệ lai thành công cao nhất đạt 96,74% (lần lai thứ 3), tỷ lệ lai thành công thấp nhất đạt 81,90% (lần lai thứ 4); đối với kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen tỷ lệ lai thành công cao nhất đạt 93,88% (lần lai thứ 2), tỷ lệ lai thành công thấp nhất đạt 49,22% (lần lai thứ 4); đối với kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen tỷ lệ lai thành công cao nhất đạt 91,67% (lần lai thứ 2), tỷ lệ lai thành công thấp nhất đạt 75% (lần lai thứ 4). Kết quả nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Cù Thị Thiên Thu & cs. (2017), của White & cs. (1982) nhưng cao hơn so với nghiên cứu của Yücel & Çirakoğlu (1999, 2000). Theo Cù Thị Thiên Thu & cs. (2017), tỷ lệ giếng có tế bào lai/giếng nuôi cấy tế bào đều đạt trên 90%. Trong khi đó, nghiên cứu của White & cs. (1982) ở 4 lần lai khác nhau thì tỷ lệ giếng có tế bào lai ở 3 lần lai đều đạt 100%, chỉ có 1 lần lai đạt 42% (21/50 giếng). Số giếng có tế bào lai ở 2 lần lai trong nghiên cứu của Yücel & Çirakoğlu năm 1999 lần lượt là 20,08% (có 135/672 giếng) và 35,71% (có 240/672 giếng), năm 2000 lần lượt là 58,92% (có 396/672 giếng) và 37,05% (có 249/672 giếng).

Để sàng lọc được tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng progesterone, dịch nuôi cấy tế bào của tất cả các giếng có tế bào lai đã được thu nhận và đánh giá bằng phản ứng ELISA. Do hormone progesterone là phi protein nên để tăng khả năng đáp ứng miễn dịch thì progesterone đã được gắn với BSA, do đó chuột đáp ứng miễn dịch với cả progesterone và với BSA. Vì vậy, để sàng lọc và thu nhận đúng được các dòng tế bào lai hybridomas tiết kháng thể cho từng loại kháng nguyên thì các kháng nguyên khác nhau sẽ được gắn bản riêng rẽ cho tế bào lai tương ứng trong phản ứng ELISA. Bên cạnh đó, mỗi phản ứng ELISA với kháng nguyên gắn bản là BSA được thực hiện song song. Kết quả sàng lọc

tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng cho từng loại kháng nguyên khác nhau được thể hiện trong bảng 5, 6 và 7.

Kết quả bảng 5, 6, 7 cho thấy tỷ lệ giếng tế bào lai có kết quả dương tính với các loại kháng nguyên thấp (dưới 5%). Ở các lần lai, tỷ lệ số giếng dương tính với kháng nguyên progesterone antigen dao động từ 1,88-4,13%, với kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen dao động từ 0-3,23%, với kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen dao động từ 1,22-4,37% trên tổng số giếng có tế bào lai. Tuy nhiên, khi sử dụng kháng nguyên gắn bản là BSA cho phản ứng ELISA để kiểm tra tính đặc hiệu của các tế bào lai đối với các loại kháng nguyên thì tỷ lệ số giếng có tế bào lai dương tính với các loại kháng nguyên và âm tính với BSA là rất thấp (<1% so với tổng số giếng có tế bào lai). Số giếng có tế bào lai ở các lần lai khác nhau có khả năng tiết kháng thể kháng kháng nguyên progesterone antigen là 5/3.450 tổng số giếng, kháng kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen là 3/2.768 tổng số giếng và kháng kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen là 3/3.226 tổng số giếng. Như vậy, ở các lần lai khác nhau thì tỷ lệ giếng có tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng thấp hơn so với nghiên cứu của Cù Thị Thiên Thu & cs. (2017), White & cs. (1982), Yücel & Çirakoğlu (1999, 2000). Tỷ lệ số giếng có tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên là progesterone trong nghiên cứu của Cù Thị Thiên Thu & cs. (2017) là 0,68%, của White & cs. (1982) ở 2 lần lai là 16,67% (4/24 giếng) và 41,67% (10/24 giếng). Theo nghiên cứu của Yücel & Çirakoğlu (1999), số giếng có tế bào tiết kháng thể trong 2 lần lai lần lượt là 3,7% (có 5/135 giếng) và 4,58% (có 11/240 giếng), tuy nhiên số giếng có tế bào lai tiết kháng thể đặc hiệu với progesterone chỉ có 1 giếng/1 lần lai. Trong nghiên cứu tương tự của Yücel & Çirakoğlu (2000), số giếng có tế bào lai tiết kháng thể ở 2 lần lai lần lượt là 5,3% (21/396 giếng), 3,2% (8/249 giếng) và ở mỗi lần lai cũng chỉ có 1 giếng tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với progesterone.

**Bảng 5. Kết quả sàng lọc tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên progesterone antigen bằng phản ứng ELISA**

Lần lai	Tổng số giếng kiểm tra	Kết quả phản ứng ELISA					
		Sử dụng kháng nguyên gắn bản Pro-3-CMO		Sử dụng kháng nguyên gắn bản BSA		Số giếng cho kết quả dương tính với kháng nguyên Pro-3-CMO, âm tính với BSA	
		Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)	Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)	Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	654	14	2,14	14	2,14	0	0
2	701	18	2,57	15	2,14	3	0,43
3	629	26	4,13	26	4,13	0	0
4	723	25	3,46	23	3,18	2	0,28
5	743	14	1,88	14	1,88	0	0

**Bảng 6. Kết quả sàng lọc tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen bằng phản ứng ELISA**

Lần lai	Tổng số giếng kiểm tra	Kết quả phản ứng ELISA					
		Sử dụng kháng nguyên gắn bản Pro-BSA		Sử dụng kháng nguyên gắn bản BSA		Số giếng cho kết quả dương tính với kháng nguyên Pro-BSA, âm tính với BSA	
		Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)	Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)	Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	378	0	0	0	0	0	0
2	589	19	3,23	19	3,23	0	0
3	478	9	1,88	7	1,46	2	0,42
4	602	12	1,99	12	1,99	0	0
5	721	21	2,91	20	2,77	1	0,14

**Bảng 7. Kết quả sàng lọc tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen bằng phản ứng ELISA**

Lần lai	Tổng số giếng kiểm tra	Kết quả phản ứng ELISA					
		Sử dụng kháng nguyên gắn bản Pro-3-CMO		Sử dụng kháng nguyên gắn bản BSA		Số giếng cho kết quả dương tính với kháng nguyên Pro-3-CMO, âm tính với BSA	
		Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)	Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)	Số giếng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	576	7	1,22	7	1,22	0	0
2	689	16	2,32	16	2,32	0	0
3	704	13	1,85	10	1,42	3	0,43
4	664	29	4,37	29	4,37	0	0
5	593	11	1,85	11	1,85	0	0

### 3.3.2. Khả năng bắt cặp đặc hiệu giữa kháng thể với kháng nguyên tương ứng

Kháng thể tạo ra từ các tế bào lai được sử dụng để xác định khả năng bắt cặp chéo giữa các kháng thể đơn dòng kháng các kháng nguyên progesterone bằng phản ứng ELISA. Tất

cả các phản ứng đều cho giá trị  $OD_{450} > 0,5$ , trong đó giá trị  $OD_{450}$  ở những phản ứng của kháng nguyên với kháng thể do chính nó tạo ra có xu hướng cao hơn (Bảng 8). Đây được coi là phản ứng dương tính, tức là có mặt của kháng thể kháng kháng nguyên progesterone.

**Bảng 8. Giá trị OD<sub>450</sub> kháng thể đơn dòng kháng các loại kháng nguyên progesterone**

Tên kháng thể	Kháng nguyên gắn bản		
	Progesterone antigen	Progesterone-3-BSA antigen	Progesterone-3-CMO: BSA antigen
KT Progesterone antigen	1,672 <sup>a</sup> ± 0,157	1,244 <sup>b</sup> ± 0,182	1,431 <sup>b</sup> ± 0,179
KT Progesterone-3-BSA antigen	1,142 <sup>a</sup> ± 0,142	1,493 <sup>b</sup> ± 0,121	1,201 <sup>a</sup> ± 0,104
KT Progesterone-3-CMO: BSA antigen	1,463 <sup>a</sup> ± 0,153	1,601 <sup>b</sup> ± 0,171	1,732 <sup>b</sup> ± 0,174

Ghi chú: Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình mang các chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,0001$ ).

#### 4. KẾT LUẬN

Chuột có khả năng đáp ứng miễn dịch tốt nhất đối với các kháng nguyên progesterone ở nồng độ 200 µg/mL/con.

Số lượng tế bào lympho B của 5 chuột có đáp ứng miễn dịch tốt nhất với kháng nguyên progesterone antigen đạt giá trị trung bình là  $1,94 \times 10^9$  tế bào, với kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen là  $1,64 \times 10^9$  tế bào, với kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen là  $1,72 \times 10^9$  tế bào.

Tỷ lệ lai thành công giữa tế bào lympho B với tế bào Myeloma Sp2/0-Ag14 tương đối cao. Tỷ lệ lai thành công trong công thức chuột được tiêm kháng nguyên progesterone antigen đạt 96,74%, chuột được tiêm kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen đạt 93,88%, chuột được tiêm kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen đạt 91,67%.

Kết quả nghiên cứu đã tạo được 5 dòng tế bào lai (E4, E3, C6, H3, F10) có khả năng tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên progesterone antigen, 3 dòng tế bào lai (C12, D7, F11) có khả năng tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên progesterone-3-BSA antigen, 3 dòng tế bào lai (G5, H3, A7) có khả năng tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên progesterone-3-CMO: BSA antigen.

Để có thể sử dụng chế tạo kit, nghiên cứu sẽ tiếp tục đánh giá tính đặc hiệu của kháng thể tạo ra với các hormone cùng nhóm steroid.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài “Nghiên cứu sản xuất kháng thể đơn

dòng đặc hiệu progesterone để chế tạo que thử nhanh (Quick Sticks) chẩn đoán có thai sớm ở bò” thuộc chương trình CNSH trong nông nghiệp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bernard H.J. (1996). Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. W.B. Saunders Company, USA.
- Burger A. (1970). Medicinal Chemistry. John Wiley & Sons Inc., England. 911.
- EMEA (2004). Committee for veterinary medicinal products progesterone. UK, 4 pages.
- Gomes W.R. & Erb R.E. (1965). Progesterone in bovine reproduction: A review. 48(3) : 314-330. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(65\)88222-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(65)88222-4)
- Fantl V.E., Wang D.Y. & Knyba R.E. (1982). The production of high affinity monoclonal antibodies to progesterone. Journal Steroid Biochemistry. 17: 125-130. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(82\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0022-4731(82)90110-8).
- Fatýma Yücel & Beyazýt Çirakođlu (1999). Production of monoclonal antibodies specific for progesterone. Turk Journal of Biology. 23: 393-399.
- Fatýma Yücel & Beyazýt Çirakođlu (2000). Production of monoclonal antibodies specific for progesterone, Estradiol by Simultaneous Injection of Different Steroids. Turk Journal of Biology. 24: 697-705.
- Köhler G. & Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256 (5517): 495-497.
- Liddell J.E. & Cryer A. (1991). A Practical Guide to Monoclonal Antibodies. John Wiley & Sons Ltd; Chichester: [https://books.google.com.vn/books?hl=vi&lr=&id=pO-qidc4VgoC&oi=fnd&pg=PR7&ots=XbxQhnD9BS&sig=ND0f9-r2QQGqE41RV9oeD60vv68&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.vn/books?hl=vi&lr=&id=pO-qidc4VgoC&oi=fnd&pg=PR7&ots=XbxQhnD9BS&sig=ND0f9-r2QQGqE41RV9oeD60vv68&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Leger JP. & Wsaldanha J. (2000). Monoclonal Antibodies. Cell Feeder. pp. 10-30.
- Pope G.S., Majzlyk I., Ball P.J.H. & Leaver J.D. (1976). Use of progesterone concentrations in plasma and



- milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *British Veterinary Journal*. 132: 497-506.
- Cù Thị Thiên Thu, Nguyễn Bá Mùi, Lê Văn Phan, Nguyễn Thị Phương Giang, Nguyễn Hoàng Thịnh, Phạm Kim Đăng (2017). Tạo dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng progesterone. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*. 23(12): 25-29.
- Thirapatsukun T. & Entwistle K.W. (1978). Plasma progesterone levels an early pregnancy test in beef cattle. *Theriogenology*. 9(4) : 323-331.
- White A., Anderson D.C. & Daly J.R. (1982). Production of highly specific monoclonal antibody to progesterone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 54(1): 205-207.