

Đề tài "“ NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT KHÁNG THỂ THỎ  
KHÁNG OVALBUMIN DÙNG PHÁT HIỆN  
OVALBUMIN TRONG VACXIN CÚM A/H5N1”

# LỜI CẢM ƠN

Từ lòng biết ơn sâu sắc của mình, em xin dành trang đầu tiên của khóa luận để bày tỏ lòng cảm ơn chân thành đến:

Ban Giám hiệu trường Đại học Nha Trang, Phòng Đào tạo, Ban chủ nhiệm khoa Ché Biển cùng toàn thể quý thầy cô đã giảng dạy tận tình và giúp đỡ em trong quá trình học tập tại trường.

PGS.TS. Lê Văn Hiệp - Viện trưởng Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang, người thầy đã luôn quan tâm hướng dẫn, tạo điều kiện thuận lợi cho em trong quá trình thực tập tại Viện.

CN. Nguyễn Thị Minh Hiền - trưởng phòng, TS. Nguyễn Thị Lan Phương - phó phòng Kiểm Định, CN. Trần Ngọc Nhơn, TS. Đỗ Minh Sĩ đã trực tiếp hướng dẫn, chỉ bảo nhiệt tình, chu đáo và luôn tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất giúp em hoàn thành luận văn này.

Qua đây em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến toàn thể các cô, các anh chị phòng Kiểm Định, phòng Nghiên cứu và phát triển đã nhiệt tình giúp đỡ, góp ý và động viên em trong thời gian thực tập tại phòng.

Em xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc Viện Vắc xin Nha Trang đã tạo điều kiện thuận lợi cho em thực tập tại Viện.

Xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, tất cả bạn bè, anh chị và các em đã quan tâm, giúp đỡ, chia sẻ, động viên em trong suốt thời gian qua.

*Nha Trang, tháng 11 năm 2007*  
Sinh viên

Đào Thị Thanh Vân.

# CHỮ VIẾT TẮT TRONG KHÓA LUẬN



<b>APS</b>	: Amonium persulfat
<b>CV</b>	: Hệ số biến thiên
<b>ĐĐ</b>	: Dược điển
<b>ĐĐVN</b>	: Dược điển Việt Nam
<b>ELISA</b>	: Enzyme - linked immuno sorbent assay (Thử nghiệm miễn dịch gắn men)
<b>FCA</b>	: Tá chất Freund Complete
<b>FIA</b>	: Tá chất Freund Incomplete
<b>HA</b>	: Haemagglutin
<b>IgG</b>	: Immuno globulin G
<b>IU</b>	: International Unit (Đơn vị quốc tế)
<b>KN</b>	: Kháng nguyên
<b>KT</b>	: Kháng thể
<b>LOD</b>	: Limit of detection (Giới hạn phát hiện)
<b>LOQ</b>	: Limit of quantification (Giới hạn định lượng)
<b>NA</b>	: Neuraminidase
<b>OD</b>	: Optical density (Mật độ quang)
<b>PBS</b>	: Photphat buffer saline (Dung dịch đệm của muối Photphat)
<b>SD</b>	: Standard Deviation (Độ lệch chuẩn)
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodium dodecyl sulphate – Poly acrylamide gel Electrophoresis (Điện di gel Poly acrylamide có Sodium dodecyl sulphate)
<b>Streptavidine – PO</b>	: Streptavidine – Peroxydase
<b>RIA</b>	: Radial immuno assay (Thử nghiệm miễn dịch phóng xạ)
<b>RNA</b>	: Ribonucleic Acide (Axit Ribonucleic)
<b>TMB</b>	: 3,3',5,5' – TetraMethyl Benzidine
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'- TetraMethylethylendiamin
<b>WHO</b>	: World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới -TCYTTG)

# MỤC LỤC



TRANG BÌA PHỤ	
LỜI CẢM ƠN	
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	
MỤC LỤC	
DANH MỤC CÁC BẢNG	
DANH MỤC CÁC HÌNH	
LỜI NÓI ĐẦU .....	1
1.1. TÌNH HÌNH BỆNH CÚM A/H5N1 .....	4
1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VACXIN CÚM A/H5N1 HIỆN NAY .....	5
1.3. GIỚI THIỆU VACXIN CÚM A/H5N1 SẢN XUẤT TRÊN TRỨNG GÀ CÓ PHÔI .....	6
1.3.1. Nguyên liệu sản xuất .....	6
1.3.2. Chung sản xuất .....	6
1.3.3. Quy trình sản xuất và kiểm định vacxin cúm A/H5N1 trên trứng gà có phôi .....	7
1.3.4. Tiêu chuẩn chất lượng của vacxin cúm A/H5N1 .....	7
1.4. OVALBUMIN .....	8
1.4.1. Đặc tính .....	8
1.4.2. Cấu tạo .....	9
1.4.3. Tính sinh miễn dịch .....	9
1.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN OVALBUMIN VÀ KHUYẾN CÁO VỀ CÁCH PHÁT TRIỂN VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP .....	10
1.5.1. Các phương pháp phát hiện ovalbumin .....	10
1.5.1.1. Phương pháp Ouchterlony (khuyếch tán miễn dịch kép) .....	11
1.5.1.2. Phương pháp điện di miễn dịch đối lưu .....	11
1.5.1.3. Phương pháp miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoassay- RIA) .....	12
1.5.1.4. Phương pháp ELISA – Kỹ thuật chất hấp phụ miễn dịch gắn enzyme (Enzyme – Linked immunosorbent Assay) .....	12
1.5.2. Các khuyến cáo về cách phát triển và thẩm định phương pháp .....	14
1.6 SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP TINH CHẾ .....	15

1.6.1. Tá chất .....	15
1.6.2. Quy trình gây miễn dịch cơ bản tạo kháng thể đa dòng .....	16
1.6.3. Tinh chế kháng thể IgG .....	17
1.6.3.1. Kết tủa IgG từ huyết thanh hoặc dịch sinh vật khác bằng (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	18
1.6.3.2. Tinh chế IgG nhờ sắc kí trao đổi ion.....	18
1.6.3.3. Tinh chế IgG nhờ cột ái lực protein A- hoặc protein G-sepharose 4B.....	19
1.6.4. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của huyết thanh sau tinh chế .....	20
2.1. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....	22
2.2. VẬT LIỆU .....	22
2.2.1. Sinh phẩm.....	22
2.2.2. Súc vật thí nghiệm .....	22
2.2.3. Hoá chất và dung dịch chuẩn .....	22
2.2.4. Thiết bị.....	23
2.2.5. Dụng cụ.....	24
2.3. PHƯƠNG PHÁP .....	24
2.3.1. Miễn dịch thử thu huyết thanh kháng ovalbumin .....	24
2.3.2. Xác định hiệu giá kháng thể thử kháng ovalbumin bằng phương pháp khuyếch tán miễn dịch kép (Ouchterlony) .....	26
2.3.2.1. Nguyên tắc.....	26
2.3.2.2. Tiến hành.....	26
2.3.3. Tinh chế kháng thể kháng ovalbumin bằng cột HiTrap protein G HP....	27
2.3.3.1. Tinh chế .....	27
2.3.3.2. Phương pháp điện di SDS-PAGE kiểm tra độ sạch của huyết thanh sau tinh chế.....	28
2.3.4. Phương pháp điện di miễn dịch đôi lưu.....	30
2.3.5. Xây dựng phương pháp ELISA định lượng ovalbumin trong vacxin cúm A/H5N1.....	31
2.3.5.1. Nguyên lý .....	31
2.3.5.2. Các bước tiến hành .....	31
2.3.6. Thẩm định phương pháp.....	33
2.3.6.1. Xây dựng đường chuẩn và độ nhạy của phản ứng.....	33
2.3.6.2. Xác định độ chính xác của phương pháp .....	33

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.....	36
3.1. ĐÁNH GIÁ QUY TRÌNH MIỄN DỊCH VÀ SẢN XUẤT KHÁNG THỂ THỎ KHÁNG OVALBUMIN .....	37
3.2. TINH CHẾ KHÁNG THỂ THỎ (IgG) KHÁNG OVALBUMIN .....	40
3.3. XÂY DỰNG HỆ ELISA ĐỊNH LƯỢNG OVALBUMIN.....	43
3.3.1. Chọn hệ đệm khóa phiên .....	43
3.3.2. Xác định nồng độ kháng thể phù hợp cho phủ phiên.....	44
3.4. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP .....	46
3.4.1. Xây dựng đường chuẩn.....	46
3.4.2. Kết quả xác định độ nhạy của phản ứng.....	47
3.4.3. Kết quả xác định độ chính xác và độ đúng của phương pháp .....	49
3.4.4. So sánh với phương pháp điện di miễn dịch đối lưu.....	55
3.5. ỨNG DỤNG HỆ ELISA ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG OVALBUMIN TRONG TRONG VACXIN CÚM A/H5N1 .....	56
4.1. KẾT LUẬN .....	59
4.1.1. Sản xuất kháng thể thỏ kháng ovalbumin.....	59
4.1.2. Đã sử dụng cột HiTrap protein G HP tinh chế thành công kháng thể (IgG) kháng ovalbumin từ huyết thanh thỏ thô .....	59
4.1.3. Xây dựng và thẩm định được hệ ELISA gián tiếp định lượng ovalbumin trong vacxin cúm A/H5N1 .....	59
4.2. KIẾN NGHỊ.....	60
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	1
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC CÁC BẢNG



Bảng 3.1. Kết quả đáp ứng kháng thể của thỏ sau mũi tiêm thứ nhất. ....	37
Bảng 3.2. Kết quả hiệu giá kháng thể sau các mũi tiêm .....	38
Bảng 3.3. Kết quả kháng thể sau khi tinh chế .....	41
Bảng 3.4. Độ nhạy của phản ứng (LOD và LOQ) .....	48
Bảng 3.5. Mật độ quang nền của 6 lần thử nghiệm .....	51
Bảng 3.6. Độ lặp lại của phản ứng .....	52
Bảng 3.7. Độ chính xác và độ đúng của phản ứng.....	54
Bảng 3.8. Kết quả ELISA định lượng các mẫu ovalbumin.....	56

# DANH MỤC CÁC HÌNH



Hình 2.1. Sơ đồ miễn dịch .....	25
Hình 2.2. Sơ đồ lấy máu .....	25
Hình 2.3. Kỹ thuật ELISA gián tiếp định lượng kháng nguyên ovalbumin.....	35
Hình 3.1. Tiêu bản nhuộm Coomassie phương pháp Ouchterlony phát hiện kháng thể kháng ovalbumin .....	39
Hình 3.2 Đồ thị biểu diễn các phân đoạn thu được khi tinh chế huyết thanh kháng ovalbumin. ....	40
Hình 3.3. Tiêu bản nhuộm Coomassie bản điện di SDS-PAGE (10% SDS) các mẫu huyết thanh. ....	42
Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn sự phù hợp giữa các đệm khóa phiên trong phản ứng ELISA định lượng ovalbumin.....	43
Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn sự phù hợp giữa các nồng độ kháng thể thử kháng ovalbumin trong phản ứng ELISA định lượng ovalbumin.....	44
Hình 3.6. Đồ thị đường chuẩn .....	46
Hình 3.7. Tiêu bản nhuộm Coomassie phương pháp điện di đối lưu định lượng ovalbumin .....	55



## ***LỜI NÓI ĐẦU***

Bệnh cúm A/H5N1 được xem là bệnh truyền nhiễm đặc biệt nguy hiểm với sự lây lan nhanh và tỷ lệ tử vong rất cao. Mới chỉ xuất hiện từ cuối năm 2003 tại một số nước châu Á, đến nay dịch cúm A/H5N1 đã lan rộng ra nhiều quốc gia trên thế giới với 229 người nhiễm bệnh, trong đó 131 người tử vong chiếm tỷ lệ 58% [6]. Các trường hợp nhiễm virus cúm được phát hiện mặc dù chỉ xảy ra do lây nhiễm giữa người với các loài gia cầm. Thế nhưng, các chuyên gia trên thế giới đã khẳng định, việc virus cúm A lây nhiễm từ người sang người chỉ còn là vấn đề thời gian. Trước nguy cơ bùng phát của đại dịch, các nước, các tổ chức trên thế giới đã phải vào cuộc để nhanh chóng tìm ra phương thức phòng bệnh hiệu quả.

Vaccin luôn được coi là phương thức hữu hiệu nhất trong việc phòng chống, giảm tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết do các đại dịch gây ra. Công nghệ sản xuất vaccin cúm “thông thường” đã có từ 60 năm trước ở các nước châu Âu và Bắc Mỹ nhưng số lượng ít và mức giá cao [3] nên không thể đáp ứng đủ cho thế giới khi có đại dịch xảy ra, đặc biệt với các nước nghèo, nước đang phát triển lại càng khó khăn hơn.

Tổ chức Y tế thế giới (TCYTTCG) đã khuyến cáo các nước nên tự nghiên cứu sản xuất vaccin cúm A/H5N1 để có thể chủ động trong công tác phòng chống dịch, bảo vệ sức khỏe cộng đồng [3]. Cùng với việc tạo ra các chủng sản xuất vaccin cúm A/H5N1 thích hợp bằng kỹ thuật di truyền ngược, các trung tâm nghiên cứu bệnh cúm quốc tế cũng đưa ra những hướng sản xuất vaccin cúm khác nhau (sản xuất trên trứng gà có phôi, tế bào động vật...). Trên cơ sở đó, tùy thuộc vào điều kiện của từng quốc gia mà lựa chọn con đường sản xuất cho phù hợp nhưng phải đảm bảo tính an toàn và hiệu quả cao.

Tại Việt Nam, viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang đã nghiên cứu sản xuất vaccin cúm A/H5N1 cho người bằng phương pháp nuôi cấy trên trứng gà có phôi. Viện đã sản xuất thử 9 loạt vaccin thành công. Trước khi đưa vào sử dụng, vaccin cúm phải đạt được các tiêu chuẩn an toàn, miễn dịch cần thiết theo quy định

của Bộ Y tế Việt Nam và TCYTTG. Một trong số các tiêu chuẩn đó là hàm lượng ovalbumin, protein trong lòng trắng trứng, là thành phần có khả năng gây dị ứng rất cao. Theo tiêu chuẩn của TCYTTG, lượng ovalbumin trong mỗi liều vacxin cúm A/H5N1 sản xuất từ trứng gà có phôi không được vượt quá 1 µg [10]. Chính vì thế, việc tìm ra một phương pháp xác định hàm lượng ovalbumin với độ nhạy và độ chính xác cao là một điều tiên quyết. Có nhiều phương pháp khác nhau để định lượng ovalbumin như: ELISA, điện di miễn dịch... Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đó cho thấy, phương pháp ELISA là phương pháp cho độ đặc hiệu và độ chính xác rất cao, có khả năng phát hiện ovalbumin ở mức độ nanogram (ng) [10-13]. Các bộ kit ELISA dùng để xác định hàm lượng ovalbumin rất đắt tiền và không phù hợp khi tiến hành các kiểm định trong quá trình sản xuất. Chính vì vậy, với điều kiện trang thiết bị hiện có, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT KHÁNG THỂ THỎ KHÁNG OVALBUMIN DÙNG PHÁT HIỆN OVALBUMIN TRONG VACXIN CÚM A/H5N1”.

***Mục tiêu đề tài:***

1. Sản xuất kháng thể thỏ kháng ovalbumin.
2. Tinh chế kháng thể (IgG) kháng ovalbumin.
3. Ứng dụng kháng thể kháng ovalbumin tinh chế định lượng ovalbumin trong các mẫu vacxin cúm A/H5N1 bằng phương pháp ELISA và phương pháp điện di miễn dịch đối lưu.

A decorative horizontal scroll border with a black outline and rounded ends, containing the chapter title.

## **CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

### **1.1. TÌNH HÌNH BỆNH CÚM A/H5N1 [3], [6]**

Cúm gà hay cúm gia cầm do virus cúm typ A gây nên. Chúng thường gây bệnh trên các loài gia cầm và có thể lây nhiễm sang một số loài động vật có vú. Cúm gia cầm lây lan rất nhanh và khó kiểm soát. Chúng thường lây nhiễm nhanh ở các loài lông vũ và gây chết trên diện rộng.

Năm 1996, virus cúm A/H5N1 lần đầu tiên được phân lập ở ngỗng tại tỉnh Giang Đông, Trung Quốc. Sau đó tiếp tục lan rộng ra nhiều nước châu Á và một số nước châu Âu.

Từ năm 2003, dịch cúm gia cầm H5N1 bùng phát mạnh tại Thái Lan, Việt Nam, Hàn Quốc, Nhật Bản sau đó lan khắp châu Á. Thái Lan và Việt Nam là hai quốc gia bị ảnh hưởng nặng nề nhất. Không chỉ gây bệnh trên gia cầm, virus cúm A/H5N1 còn là mối đe dọa cho sức khỏe con người.

Theo thống kê của TCYTTG, tính đến ngày 04/07/2006 đã có 229 người bị nhiễm cúm A/H5N1 ở 10 quốc gia trong đó có 131 người tử vong chiếm tỷ lệ 58% [6]. Việt Nam vẫn là nước có số người nhiễm cúm A/H5N1 rất cao. Tính đến tháng 6/2007, tại 32 tỉnh thành trong cả nước có 98 người bị mắc bệnh, trong đó có 42 người bị chết [3].

Từ năm 2003 đến nay, tình hình lây nhiễm virus cúm A/H5N1 diễn biến rất phức tạp. Không chỉ gây bệnh trên gia cầm, nó còn gây nhiễm sang một số động vật khác như hổ (Thái Lan), mèo (Thái Lan, Indonesia, Iraq, Đức), lợn (Indonesia, Việt Nam), chồn (biển Baltic, Đức). Số người nhiễm do H5N1 cũng gia tăng không ngừng cả về số lượng lẫn phạm vi ảnh hưởng. Mặc dù các trường hợp nhiễm virus cúm A/H5N1 trên người trong suốt những mùa dịch vừa qua cho thấy, sự nhiễm virus chỉ xảy ra khi có sự tiếp xúc khá chặt chẽ giữa người với các loài gia cầm bệnh. Tuy nhiên, viễn cảnh xuất hiện những chủng virus cúm có khả năng lây từ người sang người là một điều có thể tiên liệu được.

TCYTTG đã đưa ra cảnh báo rằng đại dịch cúm đang đến gần và nhiều khả năng là do một biến chủng của virus cúm gia cầm H5N1. Vì vậy, công tác phòng chống dịch đang diễn ra ở nhiều nước trên thế giới. Hiện nay, giải pháp được nhiều nước trên thế giới đang thực hiện là sản xuất vacxin phòng cúm cho người.

## **1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VACXIN CÚM A/H5N1 HIỆN NAY [1], [3], [6]**

Trước nguy cơ đại dịch cúm đang đến gần, công tác phòng chống dịch đang diễn ra rất khẩn trương ở nhiều nước trên thế giới. Để phòng chống đại dịch thì việc sử dụng vaccin là phương thức hữu hiệu nhất để bảo vệ cộng đồng, làm giảm tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết.

### Tình hình thế giới:

TCYTTG và tổ chức Nông lương thế giới khuyến cáo tất cả các nước, đặc biệt là các nước đang phát triển phải tự nghiên cứu và sản xuất vaccin cúm A/H5N1 để chủ động nguồn vaccin phục vụ cho nhu cầu bảo vệ sức khỏe cộng đồng khi đại dịch xảy ra.

TCYTTG đã đưa ra ba loại vaccin cúm sau cho các nước lựa chọn sản xuất: Vaccin bất hoạt trên trứng gà có phôi và nuôi cấy tế bào; vaccin sống trên trứng gà có phôi và nuôi cấy tế bào; vaccin sống dạng phun mù, hít qua mũi [3].

Hiện nay, trên thế giới mặc dù đã có rất nhiều nước nghiên cứu và sản xuất vaccin cúm A/H5N1 nhưng chưa có nước nào được cấp giấy phép lưu hành. Nhiều hãng sản xuất vaccin lớn như hãng Sanofi Pasteur (Mỹ, Pháp), hai hãng Nobilon, Sovay Pharmaceutials của Hà Lan vv...đang nghiên cứu sản xuất vaccin cúm A/H5N1 bằng phương pháp nuôi cấy trên trứng gà có phôi hoặc nuôi cấy trên các dòng tế bào (như tế bào Vero, MDCK .v.v...).

### Tình hình Việt Nam:

Việt Nam là nước có khí hậu nhiệt đới gió mùa nên rất dễ cho dịch cúm bùng phát và lây lan ra diện rộng. Ngoài ra, đàn gia cầm với số lượng lớn cũng là một yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến việc bùng nổ dịch cúm. Trước nguy cơ đại dịch cúm đang đến gần, vấn đề cân nhắc và lựa chọn một dây chuyền sản xuất vaccin cúm sao cho phù hợp với tình hình thực tế đất nước mà vẫn đảm bảo chất lượng đang là mối quan tâm hàng đầu của nước ta hiện nay. Vấn đề càng trở nên gấp rút hơn khi dịch cúm mỗi ngày một tiến gần hơn. Trước tình hình đó, căn cứ vào ưu nhược

điểm của từng phương pháp mà hiện nay ở Việt Nam đã có nhiều đơn vị sản xuất vacxin cúm H5N1 như:

Năm 2004, viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương nghiên cứu sản xuất vacxin cúm A/H5N1 dùng cho người bằng phương pháp nuôi cấy trên tế bào thận khỉ.

Ngày 18/03/2006, viện Pasteur Tp.HCM phối hợp với viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang và viện Công nghệ sinh học Hà Nội đã bảo vệ thành công đề tài cấp nhà nước mang tên “Nghiên cứu quy trình sản xuất vacxin cúm A/H5N1 dùng cho người bằng kỹ thuật nuôi cấy trên trứng gà có phôi và trên tế bào Vero” tại Hội đồng Khoa học, Bộ khoa học công nghệ [6].

Tiếp theo đó, năm 2007, Viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang đã xây dựng quy trình sản xuất vacxin cúm đạt tiêu chuẩn GMP với sự hỗ trợ của TCYTTG, quy mô sản xuất là 1 triệu liều/năm.

### **1.3. GIỚI THIỆU VACXIN CÚM A/H5N1 SẢN XUẤT TRÊN TRỨNG GÀ CÓ PHÔI [3], [4]**

#### **1.3.1. Nguyên liệu sản xuất**

Nguyên liệu sản xuất vacxin cúm theo phương pháp này là trứng gà sạch có phôi 10 đến 11 ngày tuổi. Trứng được cung cấp từ những cơ sở sản xuất trứng sạch đạt tiêu chuẩn ở trong và ngoài nước.

#### **1.3.2. Chủng sản xuất**

Hiện nay, Viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang đang sử dụng chủng sản xuất NIBRG-14 (Viện NIBSC-Anh), được tái tổ hợp từ hai chủng virus cúm A/VietNam/1194/2004 (H5N1) và A/PR/8/34 (H1N1), trong đó gen mã hóa H5 và N1 lấy từ chủng A/VietNam/1194/2004. Vùng quyết định tính độc trên gen H5 gồm 4 axit amin mang tính kiềm bị cắt bỏ, 6 gen còn lại lấy từ chủng A/PR/8/34. Chủng NIBRG-14 có kháng nguyên bề mặt (H5 và N1) gần gũi với chủng virus cúm A/H5N1 đã phân lập được ở Việt Nam và được TCYTTG cho phép sử dụng làm vacxin [3].

### **1.3.3. Quy trình sản xuất và kiểm định vaccin cúm A/H5N1 trên trứng gà có phôi**

Trứng gà sạch có phôi 10÷11 ngày tuổi được cấy chủng virus cúm. Sau khi vào trong trứng, virus cúm sẽ nhân lên với số lượng lớn. Đến khi đủ số lượng, tiến hành tiến hành thu gặt dịch niêu nang. Dịch niêu nang được tinh chế sau đó được hoàn nguyên và bất hoạt bằng formandehyde. Sản phẩm được đem đi hấp phụ tá chất và pha bán thành phẩm. Sau đó, sản phẩm được đóng lọ tạo thành vaccin thành phẩm.

Song song với quy trình sản xuất, quy trình kiểm định cũng diễn ra theo sơ đồ (phụ lục 1).

### **1.3.4. Tiêu chuẩn chất lượng của vaccin cúm A/H5N1 [10]**

Mỗi lô vaccin cúm A/H5N1 trong quá trình sản xuất cũng như khi thành phẩm, trước khi đưa vào sử dụng đều phải trải qua quá trình kiểm định rất chặt chẽ. Các tiêu chí kiểm tra đều dựa trên các tiêu chuẩn hiện hành của Bộ Y tế Việt Nam và các quy định của TCYTTG cho vaccin cúm uống cho người. Đối với vaccin cúm sản xuất trên trứng gà có phôi, có một chỉ tiêu kiểm tra đặc trưng mà đối với các vaccin sản xuất trên tế bào không có đó là kiểm tra hàm lượng ovalbumin. Đây là một chỉ tiêu rất quan trọng trong số hàng loạt các chỉ tiêu kiểm định vaccin cúm sản xuất trên trứng gà có phôi. Ovalbumin là protein có trong lòng trắng trứng, trong quá trình sản xuất vaccin cúm trên trứng gà, thành phần này có thể còn tồn tại trong vaccin cúm thành phẩm. Ovalbumin là chất gây dị ứng cho cơ thể người và động vật nên việc kiểm tra hàm lượng ovalbumin của các lô vaccin cúm thành phẩm là một yêu cầu bắt buộc. Theo TCYTTG (WHO/TRS 927/2005) thì hàm lượng ovalbumin phải  $\leq 1 \mu\text{g}/1$  liều đơn cho người [10], (phụ lục 2).

## 1.4. OVALBUMIN

### 1.4.1. Đặc tính [17], [18], [19]

Ovalbumin là một protein chính được tìm thấy trong lòng trắng trứng (chiếm 60÷65% protein tổng số), có trọng lượng phân tử là 45kDa [17]. Trong điện di ovalbumin có điểm đẳng điện (pHi) tại pH= 4,6 [19].

Hiện nay đã có một số nghiên cứu về ovalbumin trong một số lĩnh vực khác nhau như:

- Những nghiên cứu chung về cấu trúc và đặc tính
- Những nghiên cứu về cấu trúc serpin và chức năng
- Proteomic
- Những nghiên cứu trong lĩnh vực miễn dịch học

Tuy nhiên, đây mới chỉ là những nghiên cứu ban đầu, chức năng của ovalbumin vẫn chưa được biết đến mặc dù nó được dự đoán là một protein có nhiều tiềm năng. Một trong những ứng dụng của ovalbumin hiện nay là dùng trong điện di trên gel, nó được dùng như một phân tử chuẩn làm mốc đánh dấu. Bên cạnh đó, ovalbumin cũng được dùng trong chữa bệnh. Trong trường hợp bị nghi ngờ ngộ độc kim loại nặng (ví dụ như sắt) ovalbumin có thể chữa trị được vì ovalbumin có khả năng bẫy các ion này trong liên kết sulfuhydrin của nó. Điều này đã ngăn cản sự thu hút kim loại xâm nhập vào trong hệ tiêu hóa (dạ dày và ruột) và ngăn cản sự nhiễm độc [17].

Tuy nhiên, trong lĩnh vực miễn dịch học thì ovalbumin là chất gây dị ứng đối với người và động vật. Do đó, đây là thành phần bắt buộc phải kiểm tra đối với các sản phẩm bị nghi ngờ là có chứa ovalbumin như các dược phẩm: thuốc, vaccin..., các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ: trứng, sữa...

Ovalbumin có thể ổn định trong thời gian 1 năm khi bảo quản ở nhiệt độ từ 2÷8°C [19].



#### **1.4.2. Cấu tạo [17], [18], [19]**

Ovalbumin trong lòng trắng trứng được cấu tạo bởi 385 amino acid. Nó là một glycoprotein với 4 vị trí gắn glucoza. Là một protein tiết ra từ tế bào mặc dù nó thiếu 1 đầu nitơ (-N) trong trình tự của nó.

Cấu trúc của ovalbumin thuộc về dạng cấu trúc serpin của protein, mặc dù không giống phần lớn các serpin khác - ovalbumin không có khả năng ức chế bất kỳ một enzym thủy phân protein nào. Điều này được làm rõ khi so sánh cấu trúc của nó với các serpin.

#### **1.4.3. Tính sinh miễn dịch [2], [5], [8]**

Ovalbumin là một chất sinh miễn dịch mạnh vì nó có đủ các yếu tố của một chất sinh miễn dịch. Đó là:

*Tính lạ:*

Thông thường một chất được gọi là kháng nguyên trước hết phải là một chất lạ đối với cơ thể vì bình thường cơ thể không đáp ứng bảo vệ với một chất của bản thân. Ovalbumin là một protein có trong lòng trắng trứng, do đó đối với các cơ thể động vật nó là một protein lạ (chất lạ). Khi protein này được đưa vào cơ thể động vật (gây miễn dịch) nó sẽ kích thích cơ thể động vật sản xuất ra kháng thể.

*Trọng lượng phân tử đủ lớn:*

Các kháng nguyên thông thường có trọng lượng phân tử trên 6.000 dalton. Với trọng lượng phân tử 45.000 dalton, ovalbumin đủ điều kiện trở thành một kháng nguyên mạnh.

*Cấu trúc phức tạp:*

Bất kỳ một chất sinh miễn dịch nào cũng phải có cấu trúc phân tử tương đối phức tạp. Các chất có cấu trúc càng phức tạp thì tính sinh miễn dịch càng cao, ovalbumin cũng thỏa mãn tính chất này bởi vì ovalbumin có bản chất là protein. Cấu trúc của nó phức tạp do nó được cấu tạo từ các acid amin sắp xếp theo các tổ hợp khác nhau.

Như vậy, với các đặc điểm trên, ovalbumin là một kháng nguyên mạnh hay nó có tính sinh miễn dịch mạnh. Do nó là thành phần gây dị ứng đối với cơ thể nên để đảm bảo an toàn đối với người và động vật, thì các sản phẩm là thuốc, vacxin có nguồn gốc từ trứng, sữa bắt buộc phải kiểm tra thành phần này.

## **1.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN OVALBUMIN VÀ KHUYẾN CÁO VỀ CÁCH PHÁT TRIỂN VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP [5], [8], [14], [15], [16]**

### **1.5.1. Các phương pháp phát hiện ovalbumin [5], [8], [14]**

So với các tiêu chuẩn các chất và thành phần khác thì kiểm tra hàm lượng ovalbumin tương đối khó. Với hàm lượng phát hiện thấp  $\leq 1 \mu\text{g}/1$  liều đơn cho người, đòi hỏi phải có một phương pháp phát hiện phù hợp. Từ bản chất của ovalbumin là một kháng nguyên, không thể thấy bằng mắt thường nên chỉ có thể phát hiện được khi gắn với kháng thể đặc hiệu. Do sự liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể luôn mang tính đặc hiệu cao nên phát hiện sự có mặt và định lượng kháng nguyên hay kháng thể cho độ chính xác cao.

Có nhiều phương pháp khác nhau dùng để xác định mối tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể như:

- Phản ứng kết tủa (Precipitation test)
- Phản ứng ngưng kết (Agglutination test)
- Phản ứng kết hợp bổ thể
- Miễn dịch điện di
- Kỹ thuật huỳnh quang miễn dịch (Immunofluorescent technique)
- Thí nghiệm miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoassay-RIA)
- ELISA- Kỹ thuật chất hấp phụ gắn enzyme (Enzyme-Linked immunosorbent Assay).

Các kỹ thuật này đều dựa vào sự tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể để xác định sự có mặt và định lượng kháng nguyên hoặc kháng thể trong mẫu nghiên cứu.

Trong phạm vi đề tài này, 4 phương pháp sau sẽ được miêu tả chi tiết hơn.

### **1.5.1.1. Phương pháp Ouchterlony (khuyếch tán miễn dịch kép) [5]**

#### Nguyên lý:

Kỹ thuật là sự ngưng kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể xảy ra khi chúng di chuyển trên gel agarose khi cho kháng nguyên và kháng thể ở độ pha loãng thích hợp (ở nồng độ đủ để xảy ra phản ứng ngưng kết). Nếu kháng thể và kháng nguyên ngưng kết đặc hiệu sẽ cho cung kết tựa màu trắng và ngược lại, sẽ không có cung kết tựa nếu kháng nguyên và kháng thể không ngưng kết đặc hiệu.

Ưu điểm: Đây là kỹ thuật đơn giản nhất, dễ thực hiện, ít tốn kém do không phải sử dụng nhiều máy móc, hoá chất.

Nhược điểm: Thời gian hoàn thành một thử nghiệm kéo dài từ 3 đến 4 ngày; sự phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể chỉ mang tính định tính, không định lượng chính xác được hàm lượng; hàm lượng kháng nguyên tối đa có thể phát hiện được rất lớn (từ 20÷30µg/ml) nên không thể xác định được những mẫu có hàm lượng kháng nguyên nhỏ hơn.

Với những ưu và nhược điểm như trên, kỹ thuật này được ứng dụng để phát hiện kháng thể hoặc kháng nguyên trong nghiên cứu chuẩn đoán bệnh, trong những trường hợp xuất hiện kháng nguyên lạ.

### **1.5.1.2. Phương pháp điện di miễn dịch đối lưu [5], [15]**

#### Nguyên lý:

Kỹ thuật này tương tự như kỹ thuật khuyếch tán Ouchterlony nhưng thay cho khuyếch tán tự nhiên người ta đã dùng một lực điện di để hướng dẫn cho kháng nguyên và kháng thể gặp nhau nhanh hơn trên gel agarose. Trong phương pháp này, kháng thể IgG và IgM sẽ di chuyển về phía cực âm, dưới tác dụng của dòng điện kháng nguyên và kháng thể gặp nhau trên gel.

Ưu điểm: Thời gian cho kết quả nhanh chỉ sau 1 giờ.

Nhược điểm: Cũng giống phương pháp Ouchterlony, phương pháp này chỉ mang tính định tính; tốn chi phí nhiều hơn vì phải sử dụng thêm máy móc, hoá chất.

### **1.5.1.3. Phương pháp miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoassay- RIA) [8]**

#### Nguyên lý:

Phương pháp dựa trên sự cạnh tranh giữa kháng nguyên đánh dấu đồng vị phóng xạ với kháng nguyên không đánh dấu đồng vị phóng xạ gắn vào kháng thể đặc hiệu.

Ở lô đối chứng lấy một lượng nhất định kháng nguyên tinh khiết đánh dấu phóng xạ. Kháng nguyên này cùng loại với mẫu thử nghiệm. Trộn kháng nguyên đánh dấu trên với lượng kháng nguyên tương đương kháng thể đặc hiệu, rồi ủ. Rửa kháng nguyên đánh dấu tự do (không gắn với kháng thể). Đo độ phóng xạ của phức hệ kháng nguyên - kháng thể (A).

Ở lô kiểm nghiệm, ngoài kháng nguyên đánh dấu và kháng thể như trên còn trộn thêm kháng nguyên cản thử không đánh dấu gắn vào kháng thể. Rửa kháng nguyên đánh dấu tự do. Đo độ phóng xạ của phức hệ kháng nguyên - kháng thể (B).

Dựa vào tỷ lệ độ phóng xạ đo được A/B xác định nồng độ kháng nguyên trong mẫu thử so với đường cong chuẩn.

Ưu điểm: Phương pháp này cho kết quả nhanh và có độ chính xác cao.

Nhược điểm: Phương pháp này rất tốn kém, sử dụng chất phóng xạ nên không an toàn với người thực hiện.

### **1.5.1.4. Phương pháp ELISA – Kỹ thuật chất hấp phụ miễn dịch gắn enzyme (Enzyme – Linked immunosorbent Assay) [5], [7], [8]**

Enzyme – linked immunosorbent Assay (ELISA) là một kỹ thuật sinh hoá được sử dụng chính trong lĩnh vực miễn dịch học để tìm ra một kháng nguyên hoặc một kháng thể trong mẫu với độ chính xác cao. ELISA được dùng như một công cụ hữu hiệu để chuẩn đoán trong y học và tìm các tác nhân gây bệnh [5].

Vì ELISA có thể xác định được lượng kháng nguyên và kháng thể trong mẫu nên nó là một công cụ hữu ích để xác định nồng độ của kháng thể có trong huyết thanh [7]. Nó còn được dùng để tìm kháng nguyên [8]. Trong công nghiệp thực phẩm, ELISA được ứng dụng để tìm các chất gây dị ứng có trong một số loại thực phẩm như: sữa, lạc, quả óc chó, quả hạnh và trứng.

Nguyên lý:

Phương pháp là sự kết hợp giữa kháng nguyên - kháng thể (trong đó, kháng thể đã được gắn enzyme). Khi cho cơ chất thích hợp, enzyme sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Thông qua cường độ màu mà biết được nồng độ kháng nguyên hay kháng thể cần phát hiện.

Ưu điểm: Đây là kỹ thuật khá nhạy và đơn giản, cho phép xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở nồng độ rất thấp (khoảng 0,1ng/ml). So với kỹ thuật phóng xạ thì kỹ thuật này rẻ tiền và an toàn hơn mà vẫn đảm bảo sự chính xác như nhau.

Nhược điểm: Phải trải qua nhiều bước khác nhau (phụ thuộc vào các hệ ELISA khác nhau) cần nhiều hoá chất. Kỹ thuật này đòi hỏi việc thực hiện các thao tác phải thật chính xác về thời gian, nồng độ các chất. ELISA là một phản ứng rất nhạy do đó chỉ cần thực hiện không đúng một bước nhỏ trong quá trình thực hiện cũng ảnh hưởng rất lớn đến kết quả thu được.

Như vậy, trong các phương pháp phát hiện kháng nguyên đã nêu trên, chỉ có phương pháp ELISA là phương pháp có nhiều ưu điểm nhất thể hiện ở chỗ:

- Phương pháp ELISA có thể phát hiện kháng nguyên ở nồng độ rất thấp (0,1ng/ml) nên có thể định lượng được lượng ovalbumin có trong mẫu vaccin cúm mà hai phương pháp Ouchterlony và điện di đối lưu không phát hiện được.

- Với phương pháp miễn dịch phóng xạ (RIA) mặc dù cũng phát hiện nhanh và rất chính xác nhưng rất tốn kém vì trong quá trình thực hiện sử dụng nhiều máy móc, hóa chất đắt tiền nên ít được sử dụng. ELISA là phương pháp rẻ tiền, hơn nữa, đây lại là kỹ thuật khá nhạy và đơn giản nên dễ thực hiện. Cùng một thử nghiệm có thể kiểm tra nhiều mẫu vaccin khác nhau nên sẽ làm giảm chi phí sản xuất, hạ giá thành vaccin, đây là điều được nhiều nhà sản xuất quan tâm.

- Cùng với các đặc điểm trên, phương pháp ELISA còn an toàn với người thực hiện thử nghiệm, điều này khắc phục được nhược điểm của phương pháp RIA. Thời gian cho kết quả nhanh và chính xác.

Vì những lí do trên, phương pháp ELISA được chọn để định lượng ovalbumin trong vaccin cúm A/H5N1.

### **1.5.2. Các khuyến cáo về cách phát triển và thẩm định phương pháp [10], [14], [16]**

Trong công tác tiêu chuẩn, chúng ta phải xây dựng các quy trình phân tích hay cũng còn gọi là quy trình thử nghiệm để giúp cho việc kiểm tra chất lượng của tiêu chuẩn cũng như các chỉ tiêu đề ra cho tiêu chuẩn đó. Mỗi quy trình hay phương pháp được đưa ra đều phải trải qua rất nhiều nghiên cứu để phát triển và hoàn thiện nó. Để biết được quy trình đề xuất có đáp ứng được yêu cầu dự kiến và đạt tiêu chuẩn của một quy trình phân tích hay không thì nó phải được thẩm định, đánh giá. Cơ sở để đánh giá một quy trình phân tích dựa vào các tiêu chuẩn sau:

- Tính đặc hiệu (Specificity)
- Độ chính xác (Precision)
- Độ lặp lại (Repeatability)
- Độ chính xác trung gian (Intermediate Precision)
- Độ sao lại (Reproducibility)
- Độ đúng (Accuracy)
- Giới hạn phát hiện (Limit of detection - LOD)
- Giới hạn định lượng (Limit of quantitation - LOQ)
- Tính tuyến tính (Linearity)
- Miền giá trị (Range)

Tuy nhiên, các quy trình phân tích được đề cập không phải yêu cầu hết các chỉ tiêu đã nêu. Theo ICH (International conference on Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use), năm 2003, Quy trình phân tích hay thử nghiệm được phân làm 3 loại:

- Các thử nghiệm định tính nhằm đảm bảo xác định đúng chất cần thử trong mẫu thử.
- Các thử nghiệm về độ tinh khiết bao gồm thử định lượng hay thử giới hạn lượng chất không tinh khiết có trong mẫu thử.
- Các quy trình định lượng nhằm đo lường mức độ có mặt của chất cần phân tích có trong mẫu đem thử.

Phụ thuộc vào mỗi quy trình phân tích hay thử nghiệm mà có những tiêu chuẩn phải đề cập riêng.

## **1.6. SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP TINH CHẾ [2], [4], [5], [8], [15]**

Thông thường, các kháng thể có thể được sản xuất dưới dạng kháng huyết thanh (antiserum) đa dòng trong đó chứa nhiều loại kháng thể đa dòng (polyclonal antibodies) hoặc dưới dạng các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies). Để sản xuất kháng thể đa dòng người ta phải sử dụng một số loại kháng nguyên để gây miễn dịch bằng cách tiêm vào động vật được gây miễn dịch sau đó lấy máu để thu kháng huyết thanh của động vật gây nhiễm [5].

Trong quá trình gây miễn dịch tạo kháng thể đa dòng, để quá trình đáp ứng miễn dịch tốt thì kháng nguyên là yếu tố rất quan trọng. Thông thường, người ta thường phối hợp kháng nguyên và tá chất để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

### **1.6.1. Tá chất [2], [4], [5], [8]**

Tá chất là chất phụ gia khi trộn với kháng nguyên sẽ tăng cường đáp ứng miễn dịch (hoặc đáp ứng miễn dịch dịch thể hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào) với kháng nguyên đó.

Tá chất không giống như protein mang bởi vì một hapten nếu cộng thêm với tá chất cũng không trở thành immunogen, nghĩa là không thể gây ra đáp ứng miễn dịch. Như vậy một tá chất sẽ làm tăng cường đáp ứng miễn dịch của một immunogen nhưng không thể biến hapten thành một immunogen [5].

Khi trộn với kháng nguyên, tá chất sẽ giúp cho kháng nguyên lắng cặn hoặc lưu lại chậm trễ trong cơ thể gây miễn dịch, làm tăng mạnh mẽ sự đáp ứng tổng hợp kháng thể. Tá chất tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng cách kích thích đại thực bào làm nhiệm vụ thực bào hoặc kích thích tế bào T hoặc B. Đó là những chất trợ và khó phân giải như: dầu paraffin, hidroxit nhôm... Tá chất cũng có thể là những vi khuẩn bị giết chết (*B.pertusis*, các chủng *Mycobacterium*, các sản phẩm của vi khuẩn, một số nội độc tố) [8].

Có nhiều tá chất quen thuộc và thông dụng như: Gel hidroxit nhôm, các phức hợp kích thích miễn dịch (ISCOM), Lyposom, muối nhôm... Một trong những loại tốt nhất là tá chất đầy đủ Freund (FCA: Freund's Complete Adjuvant) [2]. Hoá

chất này gồm hỗn hợp huyền dịch dầu khoáng trong nước với vi khuẩn *Mycobacterium* đã bị giết. Huyền dịch dầu khoáng tạo ra sự lan toả định khu và kéo dài của kháng nguyên trong cơ thể gây miễn dịch. Vi khuẩn *Mycobacterium* bị giết có tác dụng làm hấp dẫn các đại thực bào và những loại tế bào thích hợp khác của hệ miễn dịch đến vị trí tiêm để làm tăng cường đáp ứng miễn dịch. Tá chất đầy đủ (hay đồng bộ) dùng cho mũi tiêm ban đầu. Các mũi tiêm nhắc lại tiếp theo chỉ sử dụng kháng nguyên trộn với tá chất không đầy đủ (tá chất chỉ chứa huyền dịch dầu khoáng, không chứa xác chết vi khuẩn *Mycobacterium* gọi là Freund's incomplete Adjuvant - FIA) [5].

### **1.6.2. Quy trình gây miễn dịch cơ bản tạo kháng thể đa dòng [5], [8], [15]**

Trong tự nhiên kháng nguyên có thể vào cơ thể qua nhiều con đường khác nhau như qua đường niêm mạc, đường hô hấp, sinh dục, qua da (do xây xước hoặc côn trùng đốt). Chính vì thế, cơ thể sẽ có đáp ứng miễn dịch, tạo kháng thể chống lại một số tác nhân gây bệnh từ môi trường. Tuy nhiên, để thu được lượng nhất định một loại kháng thể đặc hiệu kháng lại một kháng nguyên biết trước thì phải chủ động đưa kháng nguyên đó vào cơ thể động vật đã chọn để gây miễn dịch [5].

Sau khi đã chọn được loại tá chất phù hợp, tiến hành phối trộn với kháng nguyên và đưa vào cơ thể động vật. Người ta có thể chủ động tiêm kháng nguyên vào trong da, dưới da, trong bắp thịt hay tĩnh mạch, giúp kháng nguyên nhanh chóng tiếp cận với các hệ thống miễn dịch. Khi tiêm vào bắp và dưới da sẽ kích thích hạch lympho ngoại vi, còn tiêm tĩnh mạch, phúc mạc sẽ kích thích hệ miễn dịch trong gan, lá lách và tuỷ xương. Tiêm vào hạch kheo chân, kết mạc mắt sẽ kích thích tạo kháng thể toàn thân mạnh. Có trường hợp khi tiêm kháng nguyên vào tĩnh mạch không gây đáp ứng miễn dịch nhưng khi tiêm vào tĩnh mạch dưới da cùng với phụ gia là tá chất thì hiệu quả lại rất mạnh [8]. Đây chính là yếu tố quan trọng khi gây miễn dịch trên động vật thí nghiệm.

Mũi tiêm đầu tiên (ngày thứ nhất, tá chất là FCA) đối với động vật là chuột, thỏ có thể tiêm dưới da bụng. Đối với thỏ có thể tiêm 8÷10 vị trí khác nhau. Các lần tiêm nhắc lại sau 8÷10 ngày tính từ mũi tiêm trước đó, nhưng tá chất được dùng là



FIA hoặc kháng nguyên được hoà trong PBS không chứa azide. Sau các mũi tiêm nhắc lại tiến hành lấy máu kiểm tra hiệu giá kháng thể, nếu hiệu giá kháng thể đạt yêu cầu thì tiến hành lấy máu toàn bộ. Nếu không, tiếp tục tiêm các mũi tiếp theo đến khi hiệu giá kháng thể đạt yêu cầu thì tiến hành lấy máu toàn bộ thu huyết thanh. Trong thời gian gây miễn dịch, động vật được chăm sóc và nuôi dưỡng bằng thức ăn thông thường đã được chỉ định [15].

Thời gian gây miễn dịch của các loài động vật khác nhau và các loại kháng nguyên khác nhau thì khác nhau. Cụ thể như, thời gian lấy máu của các động vật khác nhau được gây miễn dịch là khác nhau. Ví dụ: ở chuột từ 2÷3 tuần, ở thỏ từ 3÷4 tuần, còn đối với cừu, ngựa, linh trưởng sau 4 tuần hoặc lâu hơn [5].

### **1.6.3. Tinh chế kháng thể IgG [5], [11]**

Máu sau khi thu được để đông tự nhiên, sau đó li tâm máu để loại bỏ các tế bào máu và thu huyết thanh. Huyết thanh thu được chứa rất nhiều các loại protein khác nhau như: albumin (40÷44mg/ml),  $\gamma$ - globulin miễn dịch (20÷25mg/ml) gồm có: IgG, IgA, IgM, IgD và IgE và rất nhiều các protein khác chiếm tỷ lệ thấp [5]. Trong khi đó, để sử dụng các huyết thanh này vào các phản ứng (ví dụ ELISA) thì cần có loại globulin tinh khiết, vì vậy cần phải tiến hành tinh chế kháng thể. Tùy vào mục đích thí nghiệm mà tinh chế loại kháng thể mong muốn và chọn phương pháp tinh chế phù hợp. Trong đề tài này, chúng tôi tiến hành tinh chế kháng thể IgG.

IgG là globulin miễn dịch rất giàu trong huyết thanh của người bình thường cũng như có ở các loài động vật bậc cao. Các IgG được ứng dụng nhiều trong điều trị các bệnh nhiễm trùng, trong một số các kỹ thuật miễn dịch như ELISA, chuyển thắm miễn dịch (Immuno-Western Blotting). Để sử dụng IgG cho các ứng dụng trên từ mẫu huyết thanh thu được thì huyết thanh phải được tinh chế. Hiện nay, có một số phương pháp tinh chế IgG như:

- Kết tủa IgG từ huyết thanh hoặc dịch sinh vật khác bằng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Tinh chế IgG nhờ sắc ký trao đổi ion
- Tinh chế IgG nhờ cột ái lực protein A- hoặc proteinG-sepharose 4B

### ***1.6.3.1. Kết tủa IgG từ huyết thanh hoặc dịch sinh vật khác bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$***

#### ***Cách làm:***

Có thể dùng bột rắn  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  thêm vào dịch sinh vật để đạt độ bão hòa 40÷50%. Ủ 30 phút trong một giờ ở 4°C li tâm từ 10.000 xg trong 15 phút. Rửa kết tủa bằng dung dịch muối bão hòa amon sulfat. Hòa lại kết tủa bằng một lượng đệm tối thiểu, thẩm tích đối với đệm trước khi dùng. Có thể sử dụng muối Sodium Sulfate (18% bão hòa) để thay thế cho  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Điều bất lợi là chế phẩm có lẫn các lớp Ig khác.

Theo kinh nghiệm, người ta dùng nồng độ 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bão hòa để kết tủa IgG của thỏ, và 50% đối với các loài khác, hoặc sử dụng 18%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  đối với thỏ và 14% đối với dê.

### ***1.6.3.2. Tinh chế IgG nhờ sắc kí trao đổi ion***

Các chất trao đổi ion thường sử dụng là DEAE-cellulose, DEAE-sephacryl, hoặc DEAE sephadex. Dạng DEAE sephacel dựa trên chất nền là hạt cellulose có khả năng tách các phân tử protein có kích thước lớn ( $1 \times 10^6$ ) trong khi đó chất trao đổi ion trên nền sephadex, là liên kết mạng lưới (cross-linker dextran) thích hợp cho tinh chế protein có khối lượng lớn. DEAE-cellulose ổn định ở pH 2÷12 nhưng dễ bị phá vỡ cấu trúc ở nồng độ axit và kiềm cao và cần tránh các tác nhân oxy hóa mạnh. Trao đổi ion nền sephadex không tan trong tất cả các dung môi, ổn định trong nước, trong dung dịch muối, dung dịch kiềm và dung dịch axit loãng và yếu. Đặc biệt tránh xử lý gel bằng axit hoặc kiềm trong điều kiện nhiệt độ cao. Khi tái sinh chất trao đổi ion này người ta cần ngâm gel trong NaOH 0,2 M khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng và cần bảo quản huyền phù cột gel trong đệm chứa chất chống khuẩn azid 0,02% hoặc merthiolate (thymerosal) 0,01%. Đối với IgG ( $M_w = 150 \text{ kDa}$ ), DEAE sephadex A50 (độ phân giải tốt của DEAE-sephadex A50 từ 30.000÷100.000 dalton), thường được sử dụng.

Phần kết tủa từ huyết thanh thỏ bằng 40÷50% amon sulfat bão hòa sẽ được hòa trong một thể tích đệm photphat 0,07M pH 6,4 và thẩm tích đối với đệm này (2 lần thay đệm mỗi lần 500 ml). Cho mẫu vào các cột đã được cân bằng với đệm

photphat ở trên và rửa chiết tiếp tục bằng đệm photphat và thu mỗi phân đoạn 5ml. Theo dõi quá trình rửa chiết ở bước sóng 280nm. IgG được rửa chiết bằng đệm photphat ở trên và rửa chiết tiếp tục bằng đệm photphat, các chất khác liên kết với cột bị giữ lại và sẽ được rút ra sau. Mức độ tinh sạch của IgG cao ở các phân đoạn đỉnh. Đối với các IgG của người, đệm photphat natri 0,02M, pH 8,0 được sử dụng có hiệu quả tinh sạch cao hơn. Trong tất cả các trường hợp kể trên, IgG đều không liên kết với cột nên không cần sử dụng gradient NaCl. Có thể sử dụng phương pháp này để tinh chế IgG từ dịch phức mạc.

#### **1.6.3.3. Tinh chế IgG nhờ cột ái lực protein A- hoặc protein G-sepharose 4B**

Protein A là một thành phần của thành tế bào của một số chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (tụ cầu vàng). Protein A có đặc tính liên kết ái lực đặc hiệu cao với nhiều loại dưới lớp IgG (IgG3) và hầu như không liên kết với các lớp và các dưới lớp IgG khác của người. Trong khi đó, gần đây người ta cũng đã phát hiện ra protein G từ một số chủng vi khuẩn nhóm C và G của một số *Streptococcus* chỉ liên kết đặc hiệu với tất cả các dưới lớp IgG của người (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>), đồng thời cũng có ái lực đặc hiệu cao với các lớp IgG của các loài động vật khác.

Protein A và protein G đều có khả năng liên kết với cùng một vùng giữa các khu vực CH<sub>2</sub> và CH<sub>3</sub> của phân tử IgG. Protein A chỉ liên kết đặc hiệu với IgG, nhưng protein G có phổ liên kết ái lực rộng hơn. Cụ thể là, protein G không chỉ liên kết với các IgG, còn có ái lực cao đối với albumin và liên kết với một số chất ức chế proteinase, marcogloblin và kininogen. Tuy nhiên, các vùng liên kết đối với IgG và albumin trên phân tử protein G nằm tách biệt nhau. Vì vậy, người ta dễ dàng thiết kế dạng protein G tái tổ hợp không có vị trí liên kết với albumin.

Thông thường, người ta dùng đệm glixin-HCl 0,1 M pH 2,5÷2,8 để chiết rút các IgG ra khỏi cột. Tuy vậy, các kháng thể sau khi chiết rút cần phải được trung hòa tức khắc bằng Tris-HCl 1M (pH 8,0) để tránh làm hỏng hoạt tính IgG. Người ta cũng có thể dùng dung dịch ure 2÷8M hoặc amoniac 1M, pH 11 để chiết rút các IgG.

#### **1.6.4. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của huyết thanh sau tinh chế [5]**

Huyết thanh sau khi tinh chế có thể còn lẫn một số protein khác. Để kiểm tra độ sạch, một phương pháp rất thông dụng và phổ biến hiện nay là phương pháp điện di SDS-PAGE. Phương pháp này cho phép phân tích hoàn hảo các kháng nguyên và kháng thể do đó nó đã nhanh chóng trở thành phương pháp thường quy trong sinh học lâm sàng, chẩn đoán bệnh. Có thể điện di theo mặt phẳng nằm ngang (horizontal electrophoresis) cũng có thể điện di theo chiều thẳng đứng (vertical electrophoresis). Các giá thể được sử dụng cho điện di có thể là giấy thấm, gel agarose hoặc gel polyacrylamide được tẩm dung dịch đệm có pH thường là kiềm (pH 8,3÷8,6).

Khi điện di trên giấy thấm hoặc gel agarose, dưới tác dụng của dòng điện một chiều, protein huyết thanh người có thể chia thành 5÷6 thành phần chủ yếu, di động ở các vị trí tách biệt nhau là albumin  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ -globulin trong đó phân đoạn albumin là băng protein di chuyển nhanh nhất đến cực dương. Nếu giá thể là gel polyacrylamide thì số lượng các phân đoạn protein có thể đạt tới trên 20. Tùy thuộc vào kích thước protein phân tích mà chọn nồng độ gel và các chất cho phù hợp.



**CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

## **2.1. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU**

Thời gian: Từ tháng 08 năm 2007 đến tháng 11 năm 2007.

Địa điểm: Tổ Miễn Dịch, phòng Kiểm Định, Viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang.

## **2.2. VẬT LIỆU**

### **2.2.1. Sinh phẩm**

- Albumin huyết thanh bò (BSA), Sigma
- Casein, Sigma
- Cộng hợp kháng IgG chuột gắn biotin (antimouse IgG biotinlated Species-specific whole Antibody (from sheep), Amersham
- Kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin từ chuột (Monoclonal anti-chicken Egg Albumin (Ovalbumin) antibody procedure in mouse), Sigma
- Marker high, Biorad
- Marker low, Biorad
- Ovalbumin tinh chế, Sigma
- Cộng hợp Streptavidin Horseradish peroxidase, Amersham

### **2.2.2. Súc vật thí nghiệm**

- Thỏ khoẻ mạnh, trọng lượng 2,5kg được trại chăn nuôi Suối Dầu, viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang cung cấp

### **2.2.3. Hoá chất và dung dịch chuẩn**

- Acrylamid 30%, Biorad
- Agarose, Sigma
- Amonium persulfat (APS), Biorad
- Axit sulfuric, Sigma
- Barbitone GPR, BDH
- Barbitone sodium GPR, BDH
- Coomassie brilliant blue, Merck
- Ethanol 96%, Sigma
- Glycine, Merck

- HCl, Merck
- NaCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Merck
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Sigma
- NaN<sub>3</sub>, Sigma
- SDS, Biorad
- Tá chất Freund complete (FCA); tá chất Freund incomplete (FIA), Difco
- N,N,N',N' - TetraMethylethyldiamin (TEMED), Merck
- Tetramethylbenzidine (TMB), Sigma
- Trizma Base, Sigma

#### **2.2.4. Thiết bị**

- Bộ điều nhiệt, Biorad
- Bộ nguồn điện di - Power Dac 300, Biorad
- Buồng điện di nằm ngang, Biorad
- Cân phân tích, Sartorius
- Cột HiTrap protein G HP, Amersham
- Máy đo pH, Seibold
- Máy đọc ELISA - Titertek Multiskal MCC/344, Merck
- Máy khuấy từ, MSE
- Máy lắc, MS1
- Nồi chưng cách thủy, LKB
- Quang phổ kế, Pharmacia Biotech
- Tủ ấm 37°C, Memmer
- Tủ lạnh 4°C, Daewoo
- Tủ lạnh - 40°C, Sanyo

### **2.2.5. Dụng cụ**

- Bàn cân bằng với dụng cụ đo giọt nước, LKB
- Chai thủy tinh 200 ml, 500 ml, 1000 ml, Duran
- Cốc thủy tinh 50 ml, 100 ml, Duran
- Dụng cụ đục gel  $\varnothing 2$  mm, hoặc  $\varnothing 3$  mm, LKB
- Đầu cân 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, Greiner
- Hộp inox dùng để nhuộm và rửa tiêu bản, LKB
- khay giữ ẩm, LKB
- Micropipette 5÷50  $\mu$ l, 20÷200  $\mu$ l, 100÷1000  $\mu$ l, Biohit
- Multichannel 200  $\mu$ l, Biohit
- Pipette F, Sarstedt
- Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, Facol
- Phiến nhựa 96 giếng, Griener
- Syringe 1 ml, 10 ml, Vinahankook
- Tube nhựa 1 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml, Griener
- Tube nhựa 1,8 ml, Nunc

## **2.3. PHƯƠNG PHÁP**

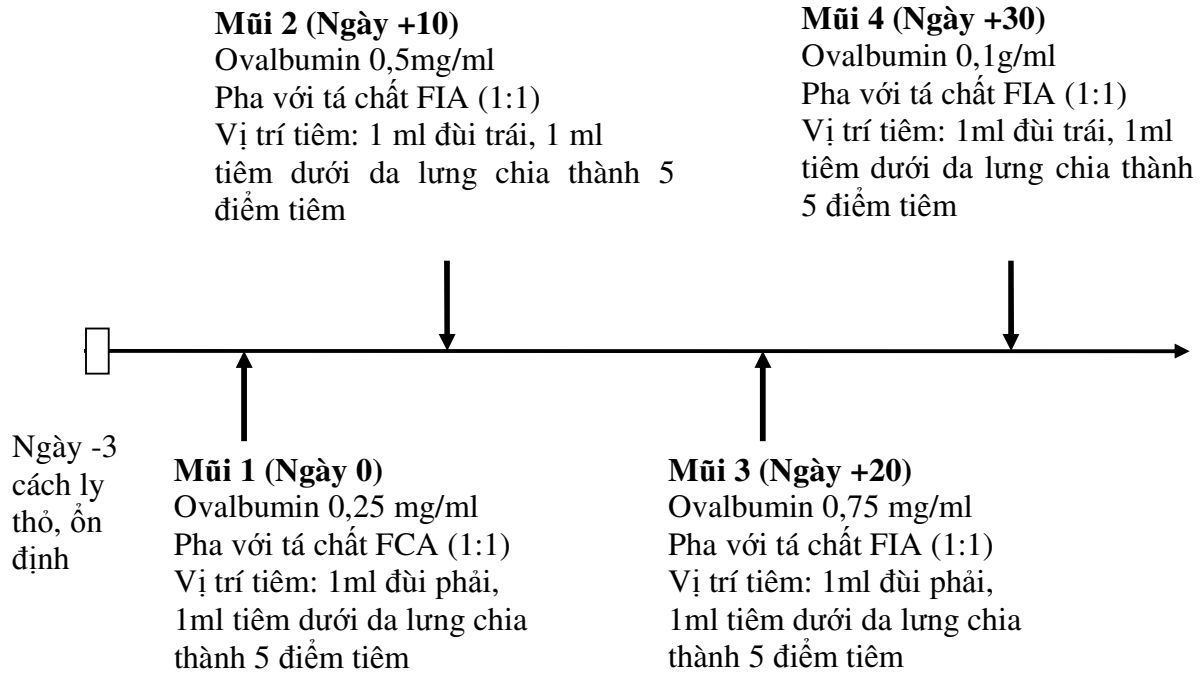
### **2.3.1. Miễn dịch thử thu huyết thanh kháng ovalbumin**

Thỏ sau khi vận chuyển từ trại chăn nuôi Suối Dầu, được cách ly và cho nghỉ trong thời gian 3 ngày. Cân theo dõi trọng lượng trước khi gây miễn dịch, trọng lượng thỏ 2,5 kg là đạt yêu cầu.

Quá trình gây miễn dịch thử thu kháng thể kháng ovalbumin gồm 4 mũi tiêm, mỗi mũi cách nhau 10 ngày. Kháng nguyên ovalbumin hoà tan trong nước muối sinh lí, trộn thêm tá chất, lắc trên máy lắc trong thời gian 30 phút đến khi dung dịch đồng nhất. Sau đó đem tiêm cho thỏ. Nồng độ ovalbumin tăng dần theo thứ tự các mũi tiêm (từ mũi 1 đến mũi 4).

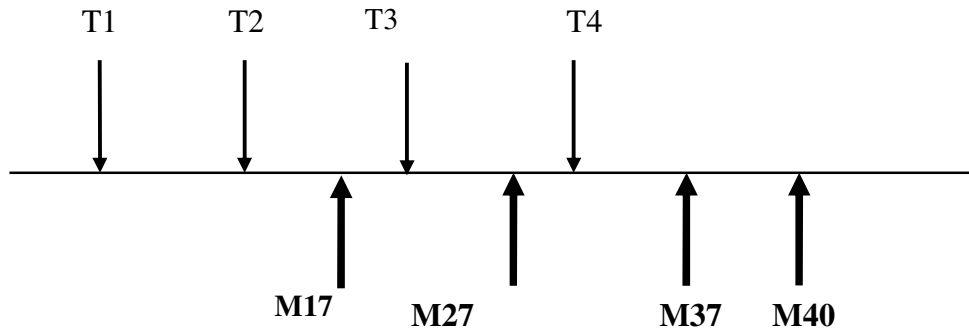


Sơ đồ gây miễn dịch thỏ được miêu tả ở hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ miễn dịch

Sau khi tiêm mũi thứ hai và ba 7 ngày, lấy máu tĩnh mạch tai thỏ kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phương pháp khuếch tán kép trên thạch (Ouchterlony). Nếu hiệu giá đạt yêu cầu sẽ lấy máu toàn bộ thu huyết thanh miễn dịch, nếu không đạt phải tiêm nhắc lại để cho đáp ứng kháng thể đạt yêu cầu. Sơ đồ lấy máu thỏ được miêu tả ở hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ lấy máu

*Chú thích hình 2.2:*

$T_i$  : Mũi tiêm kháng nguyên ovalbumin thứ  $i$

$M_j$  : Mẫu máu lấy vào ngày thứ  $j$

$M_{17}$  : Lấy máu sau khi tiêm mũi thứ hai 7 ngày (ngày thứ 17)

$M_{27}$  : Lấy máu sau khi tiêm mũi thứ ba 7 ngày (ngày thứ 27)

$M_{37}$  : Lấy máu sau khi tiêm mũi thứ tư 7 ngày (ngày thứ 37)

$M_{40}$  : Lấy máu toàn bộ sau khi tiêm mũi thứ tư

### **2.3.2. Xác định hiệu giá kháng thể thử kháng ovalbumin bằng phương pháp khuếch tán miễn dịch kép (Ouchterlony)**

#### **2.3.2.1. Nguyên tắc**

Kháng nguyên và kháng thể cùng khuếch tán trong gel và khi gặp nhau sẽ tạo thành đường tử. Nồng độ tại chỗ của kháng nguyên hoặc kháng thể không những phụ thuộc vào lượng tuyệt đối của chúng ở trong mẫu mà còn phụ thuộc vào kích thước phân tử và tốc độ khuếch tán trong gel.

#### **2.3.2.2. Tiến hành**

Lam được rửa bằng xà phòng và tráng qua nước cất, sau đó lau lại bằng cồn/ acetone (1:1). Cân 1,2g agarose pha trong 100 ml PBS pH7,2, cho thêm chất bảo quản merthiolate với nồng độ 0,01%. Hỗn hợp được chung trong nồi cách thủy cho đến khi agarose tan hoàn toàn. Đổ thạch lên lam, phần thạch còn lại có thể bảo quản trong tủ lạnh đến khi sử dụng. Để 30 phút cho thạch đông lại sau đó dùng khuôn để đục các hoa giếng. 1 lam có thể đục từ 1 đến 3 cụm hoa giếng. Đặt vào mỗi giếng 10  $\mu$ l kháng nguyên hoặc kháng thể.

**Mẫu 1:** Kháng nguyên ovalbumin được pha ra thành các độ pha sau: 50  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ g/ml, 30  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml được cho ở 6 giếng xung quanh. Giếng ở giữa cho huyết thanh thử thô được lấy sau mũi tiêm thứ hai.

**Mẫu 2:** Kháng nguyên 20  $\mu$ g/ml được cho vào giếng giữa. Kháng thể là huyết thanh thử thô kháng ovalbumin lấy sau các mũi tiêm thứ 3, 4 được pha loãng ra các nồng độ khác nhau cho vào các giếng xung quanh.

Tiêu bản được đặt vào hộp ẩm ở nhiệt độ phòng. Sau 24÷48 giờ đọc kết quả sơ bộ. Bước tiếp theo, ngâm tiêu bản trong nước muối sinh lí trong thời gian từ 24÷48 giờ. Trong khoảng thời gian này, thay đệm mỗi ngày hai lần. Sau đó, rửa nhanh tiêu bản 1 lần bằng nước cất. Tiêu bản được phủ lên bằng giấy lọc whatman để ở nhiệt độ phòng hoặc 37°C đến khô.

Tiến hành nhuộm màu bằng thuốc nhuộm Coomassie brilliant blue thời gian ít nhất 10 phút, tẩy màu và rửa sạch với nước cất, để khô.

### **2.3.3. Tinh chế kháng thể kháng ovalbumin bằng cột HiTrap protein G HP**

#### **2.3.3.1. Tinh chế**

Sử dụng cột tinh chế IgG HiTrap protein G HP của Amersham Biociences.

#### ***Nguyên tắc hoạt động của cột:***

Cột tinh chế được cấu tạo từ protein G, đây là protein có ái lực đặc biệt với IgG. Khi cho huyết thanh thô qua cột các IgG được giữ lại trong cột, còn lại các protein khác sẽ đi ra ngoài với dung dịch rửa cột. Các IgG này được hồi giải khỏi cột bằng dung dịch đệm phù hợp.

#### ***Chuẩn bị cột***

Các dung dịch đệm và cột được làm ấm đến nhiệt độ phòng. Sau đó tiến hành mở khóa phần đầu của cột.

#### ***Rửa cột và bơm kháng thể qua cột***

Bơm đầy syringe nhựa 10 ml bằng dung dịch đệm gắn cột ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Sau đó mở khóa phần đuôi của cột và rửa cột bằng 25ml dung dịch trên. Huyết thanh sau khi pha loãng 1/5 được cho vào syringe và bơm qua cột với tốc độ là 1÷5ml/phút. Dung dịch qua cột hứng vào cốc thủy tinh. Sau đó, rửa cột bằng 50 ml dung dịch đệm gắn cột (tốc độ là 1-5ml/phút).

#### ***Thu nhận IgG***

Chuẩn bị 10 tube nhựa loại 15ml có đánh số thứ tự và cho vào mỗi tube nhựa 60  $\mu\text{l}$  Tris-HCl. Thu nhận IgG bằng dung dịch đệm hồi giải cột (elution buffer), tốc độ 1-5ml/phút. Cho qua lần lượt 10 tube nhựa đã đánh dấu mỗi tube nhựa 2,5ml dung dịch qua cột. Huyết thanh sau khi tinh chế ở các tube phải được kiểm tra lại độ

pH. Với chỉ thị là quỳ tím, tiến hành kiểm tra và chỉnh pH của dung dịch bằng dung dịch  $H_3PO_4$  1M hoặc Tris-HCl 1M, sao cho pH ở khoảng trung tính ( $pH \approx 7$ ) là đạt.

Bảo quản huyết thanh sau tinh chế bằng sodium azide 1%(w/v). Chia ra thành các tube nhựa 1,8ml và bảo quản ở  $-20^\circ C$ .

#### ***Rửa và bảo quản cột***

Ngay sau khi thu nhận các IgG, rửa cột lại bằng 25ml dung dịch gắn cột. Pha ethanol 20% (10 ml) để rửa lại cột. Sau đó cất và bảo quản cột.

#### ***Đo OD***

Quang phổ kế được bật trước khi đo 1/2 giờ, các cuvet được rửa và tráng lại bằng nước cất. Các mẫu huyết thanh tinh chế được đo OD ở bước sóng  $\lambda = 280nm$  để định lượng protein tổng số có trong huyết thanh tinh chế. Cho vào 1 cuvet 3ml dung dịch gắn cột đo ở chế độ Zero. Các mẫu còn lại cho vào các cuvet khác mỗi cuvet 3ml huyết thanh tinh chế và tiến hành đo OD. Nếu hàm lượng protein ở phân đoạn nào cao ( $>max$ ) thì tiến hành pha loãng và đo. Từ đó, tính được hàm lượng kháng thể trong mẫu huyết thanh tinh chế.

#### **2.3.3.2. Phương pháp điện di SDS-PAGE kiểm tra độ sạch của huyết thanh sau tinh chế**

- ***Nguyên tắc***

Các phân tử protein tích điện sẽ được di chuyển trên điện trường trên một giá thể rắn hoặc lỏng tùy theo đặc tính tích điện âm hoặc dương và cũng tùy thuộc vào kích cỡ của chúng. Dựa vào marker chuẩn có thể xác định được loại protein trong mẫu.

- ***Tiến hành***

#### ***Chuẩn bị gel***

Pha running gel 10%	
Nước cất	4ml
Acrylamide 30%	3,3ml
1,5M Tris pH8,8	2,5ml
SDS 10%	0,1ml

Amonium persulphate (APS)	0,1ml
TEMED	4ml

Sau khi cho TEMED vào lắc nhẹ tránh tạo bọt. Dung dịch running gel được cho vào khoảng giữa hai phiến kính sao cho mức gel trong khuôn thấp hơn 1cm. 20 $\mu$ l isobutanol được cho thêm vào khuôn gel để phủ lên trên, ngăn ngừa lớp khí ngoài và phá huỷ bọt nước. Để khoảng 30 phút sau đó dùng nước cất rửa lại 5 lần, dùng giấy thấm thấm hết nước.

**Pha Stacking gel 5%**

Nước cất	2,7ml
Acrylamide	0,67ml
1,0M Tris pH6,8	0,5ml
SDS 10%	0,04ml
APS 10%	0,04ml
TEMED	4ml

Dung dịch trên được cho vào tiêu bản (tránh tạo bọt), lược răng cưa được gắn vào giữ hai phiến. Để 30 phút cho gel đông lại.

***Pha huyết thanh chạy điện di***

Huyết thanh thô sau khi tinh chế ở các phân đoạn khác nhau và huyết thanh thô pha loãng 1/10: 10 $\mu$ l huyết thanh thô pha với 90 $\mu$ l nước muối sinh lí. Sau đó lấy 20 $\mu$ l huyết thanh đã pha loãng với 20 $\mu$ l Sample buffer tím. Ủ ở 100°C trong 5 phút bằng bộ điều nhiệt.

***Ráp phiến***

Ráp phiến kính mỏng ở trong vào bộ chạy điện di, rồi đặt bộ chạy vào trong ca chạy điện di. Sau đó rút lược răng cưa ra từ từ. Cho dung dịch chạy điện di vào ngập tràn 2/3 bình chạy, đổ từ trong ra ngoài. Bộ lót được cho vào giữa hai phiến kính nhờ đó cho dung dịch chuẩn vào trước và các mẫu được cho vào theo thứ tự.

***Chạy điện di***

Sau khi cho mẫu, tiến hành chạy điện di ở 90 Vol trong 15 phút, sau đó chạy tiếp 120 Vol trong 70 phút.

### ***Nhuộm tiêu bản***

Sau khi hết thời gian chạy điện di, tiêu bản được lấy ra và ngâm trong dung dịch Xanh Coomasie 25% 500 ml trong thời gian 24 giờ hoặc để qua đêm.

### ***Tẩy màu***

Tiêu bản được lấy ra khỏi dung dịch nhuộm và ngâm trong 500 ml dung dịch tẩy trong 12 giờ. Vớt ra, để khô tự nhiên.

Sau khi đã tinh chế được kháng thể kháng ovalbumin, việc tiếp theo là sử dụng kháng thể này trong các phương pháp khác nhau để định lượng ovalbumin.

### **2.3.4. Phương pháp điện di miễn dịch đối lưu**

#### ***Chuẩn bị thạch và mẫu***

Tấm thủy tinh được rửa bằng xà phòng và tráng qua nước cất, lau lại bằng cồn acetone 50%. 1,5g agarose được hòa tan trong 100 ml dung dịch Barbitol. Đun sôi nhẹ bằng lò vi sóng cho đến khi agarose tan hoàn toàn. Lọc dung dịch trên bằng miếng vải gạc tính lượng dùng vừa đủ. Dùng pipet đổ thạch lên các tấm thủy tinh (khoảng 14÷16ml/tấm kính). Để 30 phút cho thạch đông cứng. Sau khi thạch đã đông, dùng dụng cụ đục thạch thành hai dãy và số lượng giếng tùy theo mẫu kiểm tra, khoảng cách giữa các giếng khoảng 10mm.

Dung dịch ovalbumin cho vào dãy lô cột thứ nhất (10 µl/giếng). Dãy lô cột thứ 2 đối diện cho kháng nguyên ovalbumin (10 µl/giếng).

#### ***Chạy điện di***

Đặt tiêu bản đã có kháng nguyên và kháng thể trên vào buồng điện di. Dãy có kháng nguyên nằm về phía cực âm, dãy có kháng huyết thanh nằm về phía cực dương. Dùng hai miếng giấy whatman thấm nối tiếp giữa bề mặt tiêu bản với dung dịch chạy điện di ở hai cạnh bên của tiêu bản. Đậy nắp buồng điện di, cắm phích điện, bật công tắc bên hông máy.

Điều chỉnh dòng điện chạy vào với hiệu điện thế là 150V (có thể từ 140÷170V) và cường độ dòng điện không vượt quá 90mA. Thời gian chạy điện di từ 30÷60 phút.

### ***Rửa và nhuộm tiêu bản***

Sau khi kết thúc chạy điện di tiêu bản được lấy ra và ngâm trong NaCl 0,85% từ 16÷24 giờ. Trong giai đoạn này, nên thay dung dịch 3 lần. Đây là giai đoạn rất quan trọng, nếu để ngâm lâu đường tua sẽ biến mất. Rửa tiêu bản lại bằng nước cất và ngâm tiêu bản trong nước cất khoảng 30 phút. Đặt tiêu bản vào khay giữ ẩm. Sau đó, làm khô tiêu bản. Làm khô có thể có thể bằng hơi thổi < 30°C. Rửa lại tiêu bản bằng nước cất và đặt tiêu bản vào khay có chứa dung dịch nhuộm Coomassie 25% từ 5÷10 phút.

Đổ thuốc nhuộm đi và tẩy tiêu bản bằng dung dịch tẩy. Cứ như vậy nhuộm rửa ba lần. Để tiêu bản khô tự nhiên.

### **2.3.5. Xây dựng phương pháp ELISA định lượng ovalbumin trong vaccin cúm A/H5N1.**

#### ***2.3.5.1. Nguyên lý***

Kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin từ chuột sẽ bắt kháng nguyên ovalbumin đã liên kết với kháng thể trước đó tạo thành phức hệ kháng thể - kháng nguyên - kháng thể (KT-KN-KT). Cộng hợp kháng IgG chuột gắn biotin được thêm vào sẽ gắn với kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin từ chuột. Sau khi cho tiếp cộng hợp Streptavidin Horseradish peroxidase (Streptavidin-PO) vào nó sẽ liên kết với cộng hợp kháng IgG chuột gắn biotin. Cơ chất thêm vào xảy ra phản ứng chuyển màu. Dừng phản ứng bằng dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M và dựa vào cường độ màu để định lượng hàm lượng ovalbumin có trong mẫu.

#### ***2.3.5.2. Các bước tiến hành***

##### ***Gắn kháng thể kháng ovalbumin vào phiến ELISA***

- Huyết thanh kháng ovalbumin tinh chế
- Pha loãng kháng thể trong đệm carbonate pH 9,6
- Cho 100 µl kháng thể đã pha loãng vào tất cả các giếng của phiến nhựa ELISA, ủ qua đêm ở 37°C.
- Rửa phiến 4 lần bằng dung dịch rửa 0,05% Tween 20 và khóa phiến bằng đệm casein 1%.

- Ủ ở 37°C, sau đó rửa 4 lần bằng dung dịch rửa.

***Ủ với kháng nguyên ovalbumin***

- Cho vào tất cả các giếng 100 µl đệm pha kháng nguyên ovalbumin.
- Cho 100 µl ovalbumin chuẩn 20µg/ml và các mẫu thử ovalbumin vào các giếng ở hai cột đầu tiên.
- Tiến hành pha loãng bậc hai từ cột 2 đến cột thứ 11, cột 12 dùng làm chứng âm.
- Đậy phiến bằng băng keo, ủ 37°C trong một giờ.

***Bắt phức hệ KT-KN bằng kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin từ chuột***

- Rửa phiến 4 lần bằng dung dịch rửa.
- Pha kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin từ chuột thành nồng độ 1/5000 trong dung dịch đệm pha kháng thể.
- Cho vào tất cả các giếng 100 µl kháng thể đơn dòng đã pha loãng.
- Đậy phiến bằng băng keo và ủ 37°C/1 giờ.

***Cho cộng hợp kháng chuột gắn biotin***

- Rửa phiến 4 lần bằng dung dịch rửa.
- Pha cộng hợp IgG kháng chuột gắn biotin thành nồng độ 1/2000 trong dung dịch đệm pha kháng thể.
- Cho vào tất cả các giếng 100 µl cộng hợp kháng chuột gắn biotin đã pha loãng.
- Đậy phiến bằng băng keo và ủ 37°C trong 1 giờ.

***Cho Streptavidine-PO kết hợp biotin trên pha rắn***

- Rửa phiến 4 lần bằng dung dịch rửa.
- Cho vào tất cả các giếng 100 µl dung dịch Streptavidin-PO pha loãng 1/5000 pha trong dung dịch đệm pha kháng thể.
- Đậy phiến bằng băng keo và ủ 37°C trong 1 giờ.

***Hiện màu và tính kết quả***

- Rửa phiến 4 lần bằng dung dịch rửa.



- Cho vào tất cả các giếng 100  $\mu$ l dung dịch cơ chất đã pha loãng trong đệm pha cơ chất.
- Sau 10÷15 phút phản ứng hiện màu. Dừng phản ứng bằng 50  $\mu$ l  $H_2SO_4$  2M/giếng.

Đo mật độ quang (OD) bằng máy đọc ELISA-Titertek Multiskal MCC/344 ở bước sóng 450nm. Tính kết quả bằng phần mềm Kinetic calculator V2.03 (Bio-Tek Instruments) và vẽ đồ thị (hình 2.3)

### **2.3.6. Thẩm định phương pháp**

#### ***2.3.6.1. Xây dựng đường chuẩn và độ nhạy của phản ứng***

- Ovalbumin chuẩn 20  $\mu$ g/ml được pha loãng bậc hai từ cột 2 đến cột 11.
- Kháng thể dùng phủ phiến là huyết thanh thỏ kháng ovalbumin tinh chế, pha loãng 1/1000. Lặp lại các độ pha 24 lần

#### ***2.3.6.2. Xác định độ chính xác của phương pháp***

##### ***Độ lặp lại trong cùng một lần phản ứng***

- Mẫu chuẩn ovalbumin được lặp lại 6 lần trên cùng một phiến, pha loãng bậc hai nồng độ kháng nguyên 20  $\mu$ g/ml từ cột 2 đến cột 11.
- Kháng thể dùng phủ phiến là huyết thanh thỏ kháng ovalbumin tinh chế, pha loãng 1/1000.

##### ***Độ đúng và độ lặp lại giữa các lần khác nhau***

- Các mẫu ovalbumin với nồng độ đã biết trước được lựa chọn ngẫu nhiên (30  $\mu$ g/ml, 15  $\mu$ g/ml, 12,5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 8  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml). Kháng nguyên được pha loãng bậc hai từ cột 2 đến cột 11 của phiến ELISA.
- Kháng thể là huyết thanh thỏ kháng ovalbumin tinh chế.
- Lặp lại 3 lần thí nghiệm độc lập.

*Chú thích hình 2.3.*



Kháng thể thô kháng ovalbumin



Kháng nguyên ovalbumin



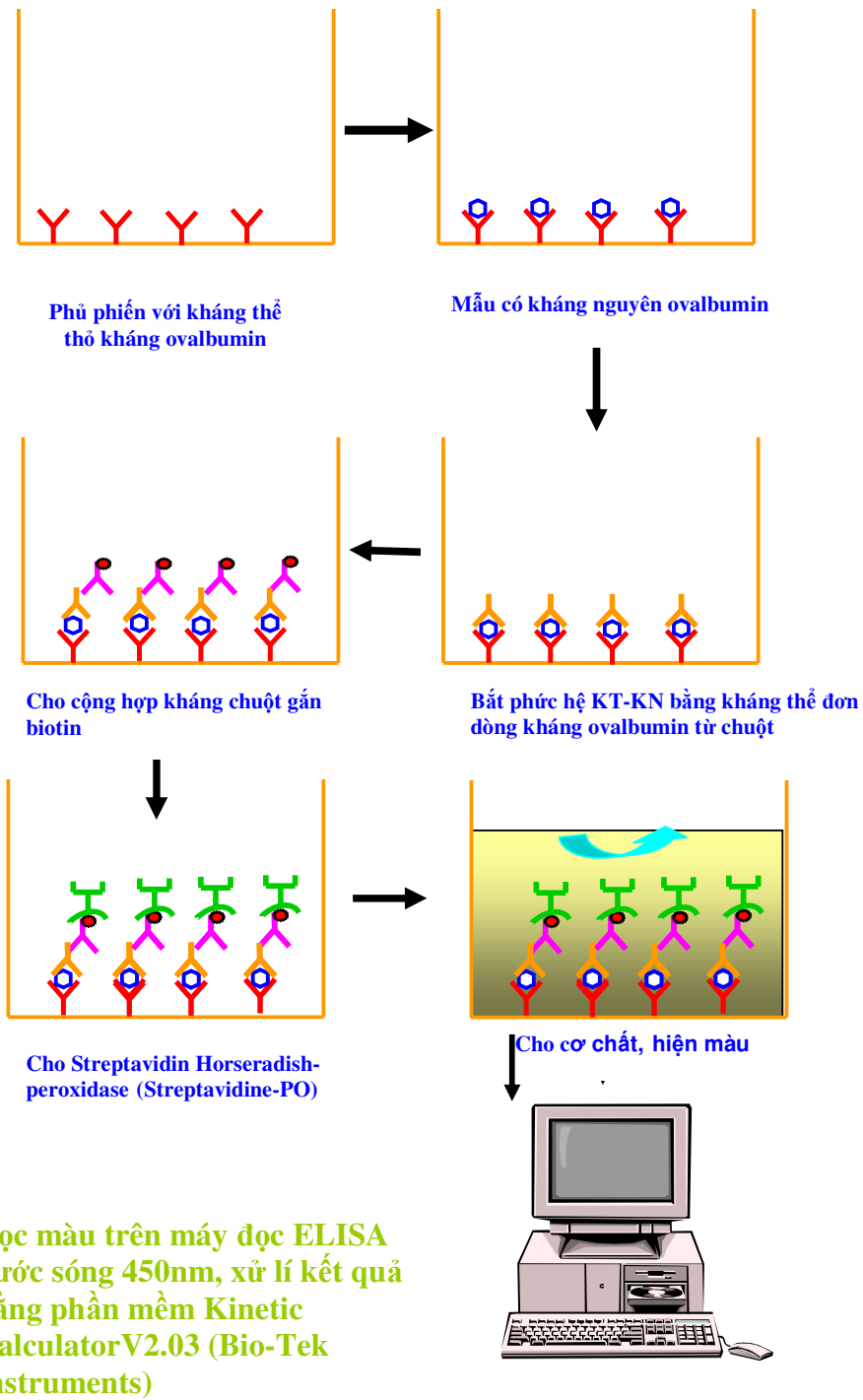
Kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin từ chuột



Streptavidine-PO



Cộng hợp kháng chuột gắn biotin



Hình 2.3. Kỹ thuật ELISA gián tiếp định lượng kháng nguyên ovalbumin

### **CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN**

### 3.1. ĐÁNH GIÁ QUY TRÌNH MIỄN DỊCH VÀ SẢN XUẤT KHÁNG THỂ THỎ KHÁNG OVALBUMIN

Quá trình gây miễn dịch thỏ gồm 4 mũi tiêm với nồng độ kháng nguyên ovalbumin tăng dần và được pha trong tá chất Freund. Sau mũi thứ nhất 7 ngày, lấy máu kiểm tra kháng thể kháng ovalbumin bằng phương pháp khuếch tán miễn dịch kép (Ouchterlony). Huyết thanh thỏ thô được cho ở giữa hoa giếng và các nồng độ kháng nguyên cho xung quanh. Kết quả này được tổng hợp ở bảng 3.1.

*Bảng 3.1. Kết quả đáp ứng kháng thể của thỏ sau mũi tiêm thứ nhất.*

Nồng độ ovalbumin (µg/ml)	50	40	30	20	10	5
Kết quả ngưng kết KN-KT	+	+	+	+	-	-

Chú thích: (+) Có ngưng kết KN-KT

(-) Không có ngưng kết KN-KT

Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy, đã có ngưng kết KN (ovalbumin)-KT (huyết thanh thỏ thô) chứng tỏ trong huyết thanh thỏ đã có kháng thể kháng ovalbumin, hay thỏ đã có đáp ứng kháng thể với ovalbumin. Nồng độ kháng nguyên thấp nhất cho ngưng kết là 20 µg/ml.

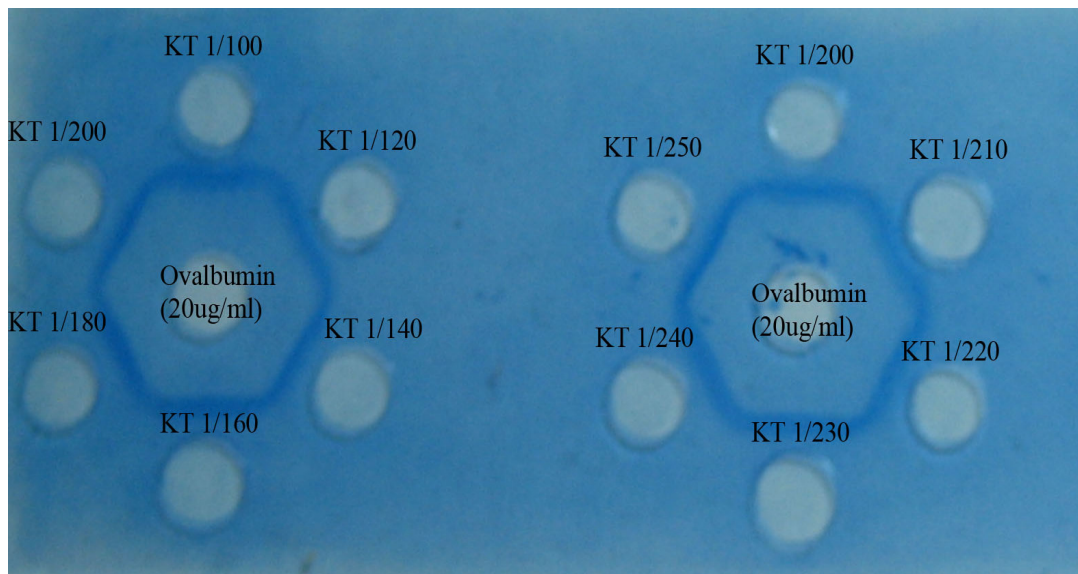
Sau khi phát hiện có kháng thể kháng ovalbumin, tiến hành kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phương pháp trên. Kháng nguyên ovalbumin 20 µg/ml được cho ở giữa, kháng thể (lấy sau các mũi tiêm 7 ngày) được pha loãng trong PBS pH7,2 với các nồng độ khác nhau. Kết quả này được tổng hợp bởi bảng 3.2

**Bảng 3.2. Kết quả hiệu giá kháng thể sau các mũi tiêm**

Độ pha loãng huyết thanh thô	Mẫu máu ngưng kết KN-KT		
	M17	M27	M37
1/2	+	+	+
1/8	+	+	+
1/16	+	+	+
1/32	+	+	+
1/50	-	+	+
1/70	-	+	+
1/90	-	+	+
1/120	-	-	+
1/150	-	-	+
1/200	-	-	+
1/220	-	-	+
1/250	-	-	+

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy, đáp ứng kháng thể ở thỏ tăng lên sau các mũi tiêm nhắc lại. Cùng với việc tăng hàm lượng kháng nguyên theo các mũi tiêm, hiệu giá kháng thể cũng tăng dần lên. Điều này thể hiện ở độ pha loãng cuối cùng của kháng thể vẫn cho ngưng kết KN-KT. Độ pha loãng kháng thể tăng dần từ 1/32 sau mũi tiêm thứ hai đến 1/90 sau mũi tiêm thứ 3 và lên đến 1/250 vẫn cho kết quả dương tính với nồng độ kháng nguyên ovalbumin là 20 $\mu$ g/ml. So sánh với tiêu chuẩn đánh giá đạt yêu cầu là ít nhất ở độ pha loãng 1/100 huyết thanh thô phản ứng Ouchterlony cho kết quả dương tính, kết quả gây miễn dịch trên hoàn toàn phù hợp.

Như vậy, thỏ có đáp ứng miễn dịch tốt với ovalbumin và phác đồ miễn dịch thỏ được sử dụng đạt yêu cầu đề ra.



Hình 3.1. Tiêu bản nhuộm Coomassie phương pháp Ouchterlony  
phát hiện kháng thể kháng ovalbumin

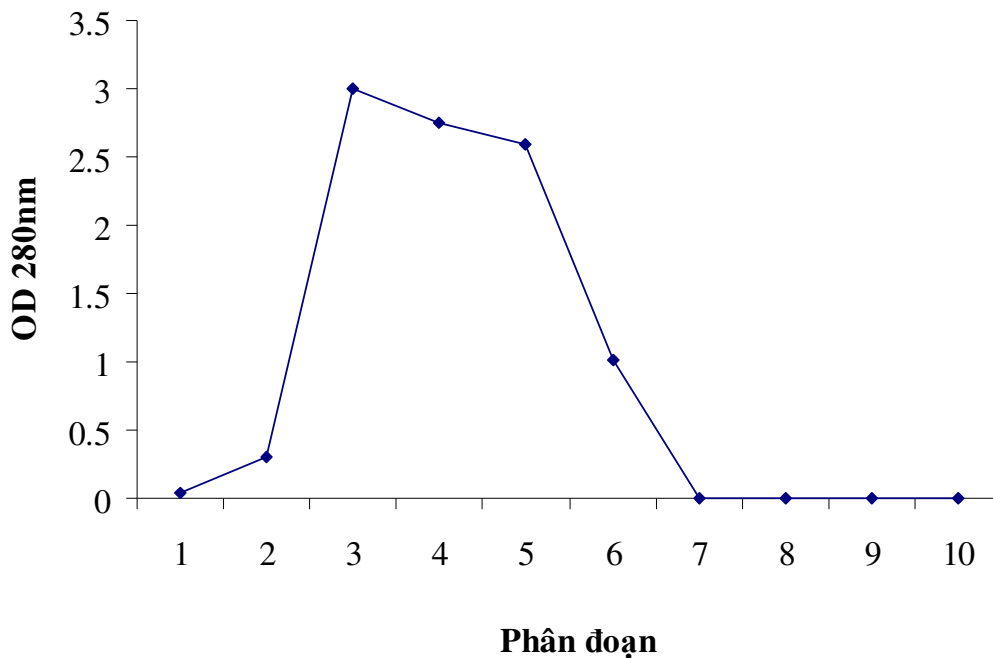
### 3.2. TINH CHẾ KHÁNG THỂ THỎ (IgG) KHÁNG OVALBUMIN

Huyết thanh thỏ thô kháng ovalbumin được tinh chế bằng cột tinh chế IgG HiTrap protein G HP của Amersham Biociences. Kết quả tinh chế được thể hiện qua kết quả đo mật độ quang (OD) huyết thanh sau tinh chế và kết quả chạy điện di SDS-PAGE.

- **Kết quả đo mật độ quang**

Mật độ quang bước sóng 280nm được dùng để xác định hàm lượng protein tổng số có trong mẫu huyết thanh tinh chế.

Kết quả biểu thị ở đồ thị 3.2.



Hình 3.2 Đồ thị biểu diễn các phân đoạn thu được khi tinh chế huyết thanh kháng ovalbumin.

Từ hình 3.2 cho thấy phân đoạn 3, 4, 5 cho kết quả OD cao. Các phân đoạn còn lại có độ OD thấp.

Từ độ OD thu được quy đổi ra hàm lượng IgG trong mẫu theo công thức sau [9]:



$$\text{Hàm lượng kháng thể (IgG)} = \frac{OD}{1,35} \text{ (mg/ml)}.$$

Kết quả này được tổng hợp bởi bảng 3.3.

**Bảng 3.3. Kết quả kháng thể sau khi tinh chế**

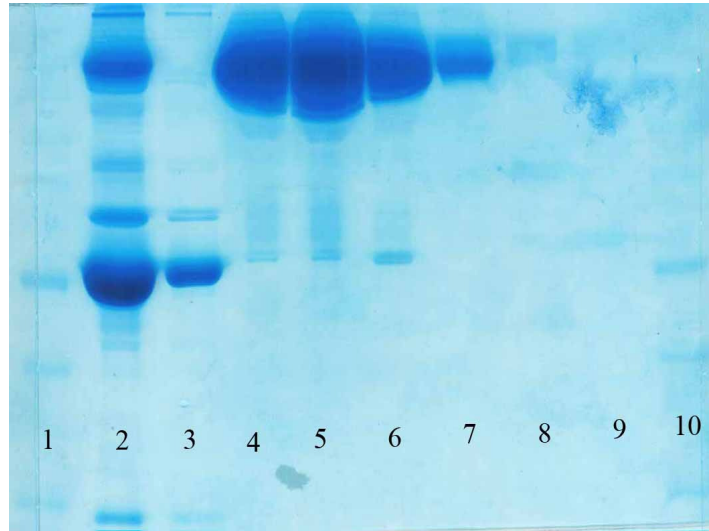
Phân đoạn	OD	Nồng độ IgG (mg/ml)	Hàm lượng IgG (mg)
1	0,034	0,025	0,063
2	0,297	0,221	0,554
3	3,000	4,444	11,110
4	2,750	2,037	5,092
5	2,590	1,918	4,795
6	1,014	0,751	1,877
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-

Theo bảng trên ta thấy IgG được tập trung trong các phân đoạn 3, 4, 5 với nồng độ IgG lần lượt là: 4,444mg/ml; 2,037mg/ml; 1,198mg/ml dung dịch đệm hồi giải. Trong đó, tập trung nhiều nhất là ở phân đoạn 3 với hàm lượng IgG thu được là 11,11mg. Tổng lượng IgG thu được là 23,671mg. Như vậy, với 4ml huyết thanh thô, nồng độ IgG thu được là 5,378mg/ml. Cho thấy, hàm lượng kháng thể sau khi tinh chế là đạt yêu cầu. Do đó, chúng tôi đã chọn các phân đoạn 3, 4, 5 làm mẫu cho các thử nghiệm tiếp theo.

Bên cạnh đó, cùng với việc đo OD của các phân đoạn huyết thanh sau tinh chế, tiến hành đo OD của dung dịch sau khi rửa các protein thừa sau khi qua cột thu được kết quả: OD = 0,004. Như vậy, hàm lượng protein trong mẫu này còn rất thấp chứng tỏ quá trình rửa đã đảm bảo loại hết các protein thừa không liên kết với protein G.

- **Kết quả chạy điện di SDS-PAGE**

Kết quả tinh chế còn thể hiện ở độ tinh sạch của huyết thanh sau tinh chế. Độ tinh sạch của các mẫu huyết thanh sau tinh chế sau khi kiểm tra lại bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.



Hình 3.3. Tiêu bản nhuộm Coomassie bản điện di SDS-PAGE (10% SDS) các mẫu huyết thanh.

1, 10: thang protein, 2: HT thô, 3: dịch thu được sau khi qua cột, 4, 5, 6, 7, 8, 9: phân đoạn 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Hình 3.2 cho thấy, ở các mẫu 4, 5, 6 (tương ứng với phân đoạn 3, 4, 5) có hàm lượng IgG nhiều hơn các mẫu khác. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả cho ở bảng 3.3. Ở mẫu huyết thanh thô, albumin có hàm lượng rất lớn, nhưng sau khi tinh chế, ở các phân đoạn 3, 4, 5, 6, 7, 8 thì thành phần này hầu như không có. Như vậy, huyết thanh tinh chế có độ sạch cao đặc biệt là thành phần albumin được loại bỏ gần như hoàn toàn.

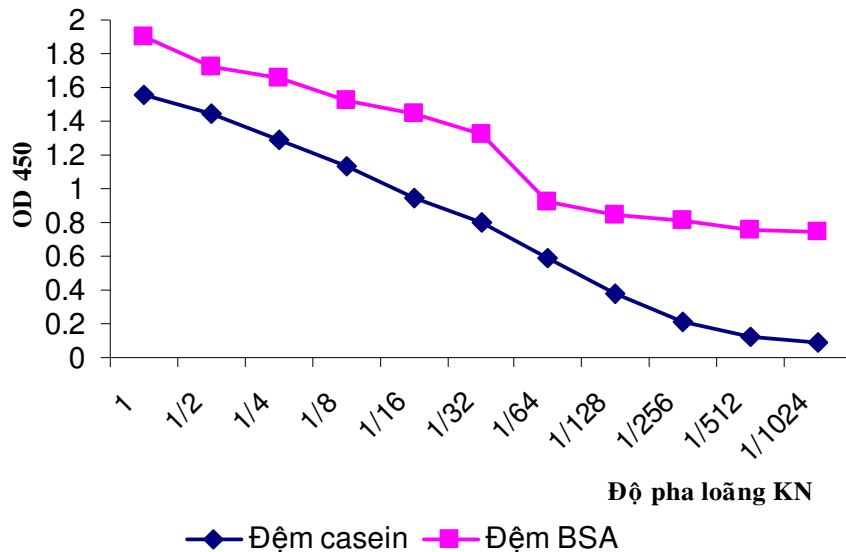
Như vậy, quá trình tinh chế kháng thể kháng ovalbumin đã thành công với hàm lượng kháng thể thu được là 5,873mg/ml huyết thanh thô. Tập trung chủ yếu ở các phân đoạn 3, 4, 5 nhiều nhất là phân đoạn 3 với 11,110 mg. Huyết thanh tinh chế cũng đảm bảo độ sạch khi chạy điện di SDS-PAGE.

### 3.3. XÂY DỰNG HỆ ELISA ĐỊNH LƯỢNG OVALBUMIN.

#### 3.3.1. Chọn hệ đệm khóa phiến

Để xác định loại đệm dùng khóa phiến thích hợp tham gia vào phản ứng ELISA định lượng ovalbumin, đã sử dụng hai loại đệm khác nhau là: BSA 1% và Casein 1%. Nồng độ kháng thể phủ phiến là 1/1000, kháng nguyên ở cột đầu tiên của phiến có nồng độ là 20  $\mu\text{g/ml}$  pha loãng bậc hai từ cột 2 đến cột 11.

Kết quả thể hiện ở hình 3.4.



Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn sự phù hợp giữa các đệm khóa phiến trong phản ứng ELISA định lượng ovalbumin.

Từ đồ thị hình 3.4 ta thấy, đệm Casein là đệm thích hợp nhất cho phản ứng ELISA vì có mật độ quang cao nhất là  $1,557 \pm 0,060$ , đồng thời thể hiện sự tuyến tính giữa mật độ quang và nồng độ kháng nguyên nên phù hợp với điều kiện phản ứng.

Đối với đệm là BSA, mật độ quang nền rất cao  $0,742 \pm 0,034$ , nên không phù hợp với điều kiện phản ứng.

Mật độ quang nền khi khóa phiến bằng BSA cao có thể do BSA và ovalbumin là hai protein đều thuộc nhóm albumin nên BSA có thể có cấu trúc tương tự như ovalbumin. Khi cho kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin vào phản ứng KN-KT xảy ra, một số kháng thể gắn vào BSA. Chính vì vậy nên có hiện tượng

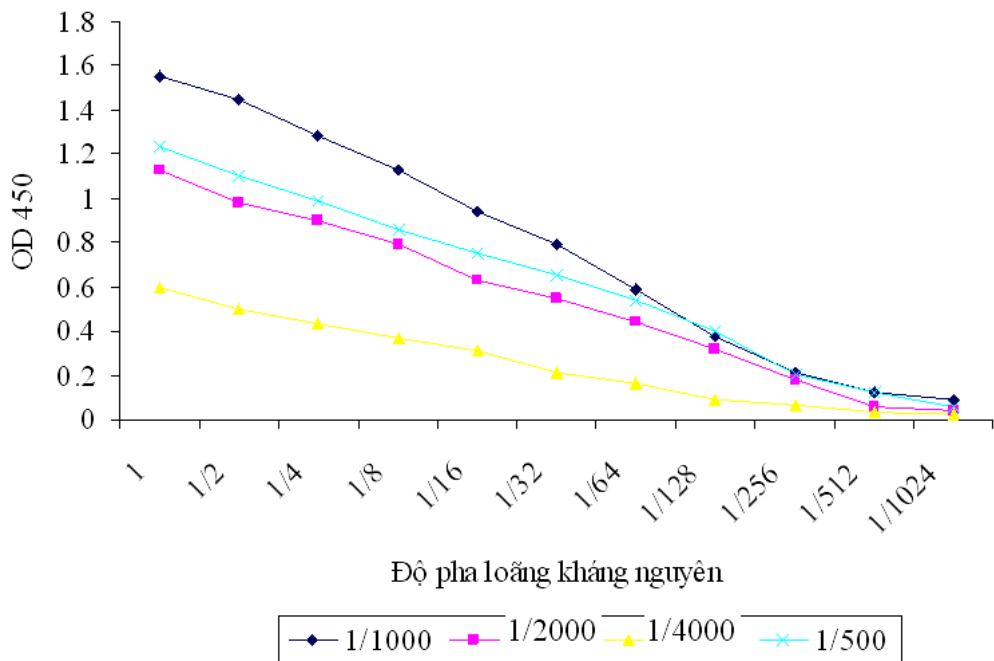
gắn giả làm cho mật độ quang nền cao ( $0,742 \pm 0,034$ ). Điều này không phù hợp khi thực hiện phản ứng ELISA.

Đối với đệm là Casein, đây là một protein trong sữa, không thuộc nhóm albumin nên cấu trúc của protein này hoàn toàn khác với ovalbumin. Có thể vì lí do này mà casein không liên kết với kháng thể đơn dòng kháng ovalbumin. Do đó mật độ quang nền thấp ( $0,078 \pm 0,014$ ), phù hợp với phản ứng ELISA.

Như vậy, với hai hệ đệm là BSA và casein dùng để khóa phiên thì Casein phù hợp cho phản ứng ELISA định lượng ovalbumin. Chính vì thế, hệ đệm casein 1% đã được dùng cho các thử nghiệm tiếp theo.

### 3.3.2. Xác định nồng độ kháng thể phù hợp cho phủ phiên

Để xác định nồng độ tối ưu của kháng thể thử kháng ovalbumin tham gia vào phản ứng, 4 độ pha khác nhau của kháng thể thử kháng ovalbumin tinh chế (kháng thể là hỗn hợp của 3 phân đoạn 3, 4, 5) được sử dụng là: 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000. Kháng nguyên ở cột đầu tiên có nồng độ là 20  $\mu\text{g/ml}$  sau đó được pha loãng bậc hai từ cột 2 đến cột 11. Kết quả thể hiện ở đồ thị 3.5.



Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn sự phù hợp giữa các nồng độ kháng thể thử kháng ovalbumin trong phản ứng ELISA định lượng ovalbumin.

Kết quả từ hình 3.5 cho thấy, ở độ pha kháng thể cao 1/500 có mật độ quang cao nhất là  $1,230 \pm 0,054$ , ở các độ pha 1/2000 và 1/4000 cũng cho mật độ quang cao nhất lần lượt là  $1,120 \pm 0,042$  và  $0,612 \pm 0,038$ . Trong phản ứng ELISA thì các mật độ quang này đều thấp, điều này không phù hợp với điều kiện phản ứng do mật độ quang quá thấp.

Riêng ở độ pha 1/1000 là nồng độ thích hợp nhất cho hệ ELISA vì có mật độ quang cao nhất là  $1,557 \pm 0,060$ , đây là mật độ quang cao, đồng thời thể hiện sự tuyến tính giữa mật độ quang và nồng độ kháng nguyên nên phù hợp với điều kiện của phản ứng. Kết quả thể hiện ở hình 3.5.

Ở độ pha kháng thể cao 1/500 mật độ quang thấp có thể do nồng độ kháng thể gắn phiến quá nhiều dẫn đến sự cạnh tranh vị trí liên kết gắn phiến và gắn đặc hiệu với kháng nguyên ovalbumin. Do đó, những kháng thể không liên kết chặt chẽ sẽ bị rửa trôi làm cho mật độ quang nền thấp.

Ở độ pha kháng thể 1/1000 là phù hợp do nồng độ kháng thể phù hợp với gắn phiến.

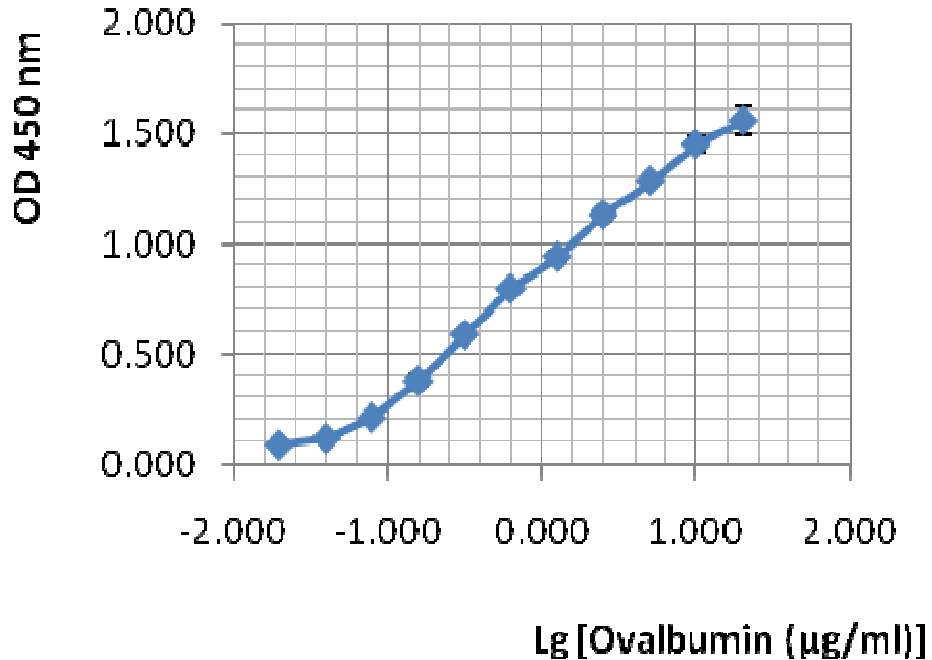
Còn ở các độ pha 1/2000, 1/4000 có mật độ quang thấp có thể do nồng độ kháng thể quá thấp dẫn đến số lượng kháng thể gắn phiến thấp, điều này làm cho mật độ quang thấp, không phù hợp với điều kiện của phản ứng.

Như vậy, nồng độ kháng thể quá cao hoặc quá thấp đều không phù hợp cho phản ứng ELISA định lượng ovalbumin. Ở độ pha kháng thể là 1/1000 là nồng độ thích hợp nhất cho hệ ELISA này. Chính vì vậy, độ pha kháng thể 1/1000 sẽ được dùng cho các thử nghiệm tiếp theo.

### 3.4. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP

#### 3.4.1. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn thể hiện sự phụ thuộc tuyến tính giữa mật độ quang và nồng độ ovalbumin trong mẫu thử.



Hình 3.6. Đồ thị đường chuẩn

Đường chuẩn của phương pháp ELISA định lượng ovalbumin trong nghiên cứu này được thiết lập dựa vào sự thay đổi tuyến tính của mật độ quang (OD) ở bước sóng 450nm của mẫu ovalbumin chuẩn có nồng độ xác định. Mật độ quang của các giếng ELISA được đo ở bước sóng 450 nm bằng máy ELISA Titertek Multiskan MCC/344 (Merck), kết quả của phản ứng được tính bằng phần mềm Kinetic calculator V2.03 (Bio-Tek Instruments).

Sau khi tiến hành phản ứng ELISA với mẫu thử là ovalbumin tinh khiết, nồng độ ovalbumin 20µg/ml pha loãng bậc hai từ cột 2 đến cột 11, khoảng tuyến tính có OD từ 1,5 đến 0,4 (hình 3.6). Trong thực tế, việc xác định nồng độ ovalbumin trong mẫu thử luôn luôn được tính dựa trên sự so sánh OD của mẫu thử với OD mẫu chuẩn tại đoạn tuyến tính của mỗi thử nghiệm.

Theo đồ thị trong hình 3.6, hệ ELISA trong nghiên cứu này có thể xác định được nồng độ ovalbumin trong khoảng từ 30ng đến 20  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả này cho thấy hệ ELISA được xây dựng trong nghiên cứu này có khả năng phát hiện ovalbumin với khoảng nồng độ tương đương với bộ kit ELISA định lượng ovalbumin của hãng Alpha Diagnostic International (1ng đến 20ng/ml).

Như vậy, phương pháp ELISA được xây dựng cho kết quả định lượng ovalbumin đạt yêu cầu đề ra.

### **3.4.2. Kết quả xác định độ nhạy của phản ứng**

Có hai đại lượng đại diện cho độ nhạy của phản ứng là giới hạn phát hiện (Limit of Detection: LOD) và giới hạn định lượng (Limit of Quantitation: LOQ).

LOD là lượng thấp nhất của chất cần thử trong mẫu còn có thể phát hiện được mà không nhất thiết phải xác định chính xác hàm lượng. Thường việc xác định giới hạn phát hiện bằng cách tìm xem chất cần thử có nồng độ cao hơn hay thấp hơn một giới hạn nào đó. LOQ là lượng thấp nhất của chất cần thử có trong mẫu thử còn có thể xác định được với mức độ đúng và chính xác thích hợp. Giới hạn định lượng là một thông số của phương pháp định lượng đối với lượng thấp nhất của chất cần thử có trong khung mẫu và được sử dụng đặc biệt trong việc xác định các tạp chất và các sản phẩm phân hủy. Trong phản ứng ELISA có thể căn cứ trên mật độ quang của mẫu trắng (mật độ quang nền) tính được hai giá trị này theo công thức [10]:

$$\text{LOD} = \text{OD nền trung bình} + 3\text{SD (độ lệch chuẩn)}$$

$$\text{LOQ} = \text{OD nền trung bình} + 10\text{SD}$$

Trong đó, SD (Standard deviation) là độ lệch chuẩn của phản ứng. Độ lệch chuẩn của phản ứng càng thấp thì LOD, LOQ càng có độ chính xác cao hay độ chính xác của phản ứng càng cao.

Cách xác định: với cùng một mẫu đã được làm đồng nhất, tiến hành xác định bằng phương pháp đề xuất nhiều lần n lần ( $n = 6-10$  hay nhiều hơn...), sau đó áp dụng công thức:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X_i - X)^2}{n-1}}$$

Trong đó:  $x_i$  là giá trị đo được thứ  $i$

$X$  là giá trị trung bình

$n$  là số lần đo

Xác định độ nhạy của phương pháp là tìm nồng độ ovalbumin thấp nhất có trong mẫu thử còn có thể phát hiện được và xác định chính xác nồng độ ovalbumin có trong mẫu thử, sau khi tiến hành pha loãng ovalbumin thành nhiều độ pha khác nhau.

**Bảng 3.4. Độ nhạy của phản ứng (LOD và LOQ)**

n	OD nền trung bình	SD	Độ nhạy			
			LOD		LOQ	
			OD	Nồng độ ovalbumin (ng/ml)	OD	Nồng độ ovalbumin (ng/ml)
24	0,078	0,014	0,102	30	0,173	60

Từ bảng 3.4 ta thấy, LOD của phản ứng có mật độ quang là 0,102 và LOQ có mật độ quang là 0,173 tương ứng với nồng độ ovalbumin lần lượt là 30ng/ml và 60ng/ml. Như vậy, đối với mẫu thử có nồng độ ovalbumin  $\geq 30$ ng/ml thì phương pháp ELISA phát hiện được với mức độ định tính. Ở nồng độ ovalbumin  $\geq 60$ ng/ml có trong mẫu thử sẽ được xác định ở mức độ định lượng trong phương pháp này. Kết quả này cho thấy, hệ ELISA được xây dựng trong nghiên cứu này có khả năng phát hiện ovalbumin với khoảng nồng độ tương đương với bộ kit ELISA định lượng ovalbumin của hãng Alpha Diagnostic International (1ng đến 20ng).



Bên cạnh đó, tiêu chuẩn của hàm lượng ovalbumin trong vaccin cúm cho phép là nhỏ hơn 1  $\mu\text{g/ml}$ . Trong khi đó, phương pháp này có thể định lượng được 60ng/ml nhỏ hơn 16 lần so với mức yêu cầu. Chính vì thế, phương pháp này có thể định lượng với các mẫu có hàm lượng ovalbumin thấp và cho độ chính xác cao. Do đó, phương pháp này đạt yêu cầu trong phát hiện và định lượng ovalbumin trong vaccin cúm A/H5N1.

Như vậy, hệ ELISA xây dựng theo phương pháp này đạt tiêu chuẩn xác định nồng độ ovalbumin trong vaccin cúm A/H5N1 theo mục tiêu đã đề ra.

### **3.4.3. Kết quả xác định độ chính xác và độ đúng của phương pháp [13-14]**

Độ chính xác là mức độ sát gần giữa các kết quả thử riêng rẽ  $x_i$  với giá trị trung bình  $\bar{X}$  thu được khi áp dụng phương pháp đề xuất cho cùng một mẫu thử đồng nhất trong cùng điều kiện xác định. Độ chính xác bị ảnh hưởng bởi sai số ngẫu nhiên. Khi đề cập đến độ chính xác một cách chi tiết hơn người ta quan tâm tới độ lặp lại. Độ lặp lại là kết quả thực hiện có giá trị gần sát với giá trị trung bình của các lần thực hiện trước đó trong cùng một lần thực hiện hay giữa các lần thực hiện khác nhau với cùng mẫu thử.

Độ chính xác của phương pháp ELISA được xây dựng trong nghiên cứu này được xác định bằng độ lặp lại của thí nghiệm (trong cùng 1 lần thí nghiệm và giữa các lần thí nghiệm khác nhau). Độ đúng của phương pháp được xác định bằng cách sử dụng các mẫu “spiked” (là các mẫu đã biết trước nồng độ) [13-14].

***Độ lặp lại trong cùng phản ứng***

Để xác định độ lặp lại trong cùng một phản ứng, tiến hành thử nghiệm với mẫu chuẩn ovalbumin, lặp lại 6 lần trong cùng một phiên. Hệ số biến thiên (CV) kết quả được tính theo công thức [16]:

$$CV = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

Trong đó: - X là giá trị OD trung bình của một độ pha sau 6 lần thí nghiệm

- SD là độ lệch chuẩn

Kết quả được tổng hợp ở bảng 3.5, 3.6.

**Bảng 3.5. Mật độ quang nền của 6 lần thử nghiệm**

Nồng độ µg/ml	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6
20	1,581	1,628	1,542	1,497	1,684	1,623
10	1,290	1,390	1,320	1,266	1,372	1,327
5	1,106	1,218	1,126	1,082	1,138	1,186
2,5	0,827	0,966	0,932	0,855	0,948	0,926
1,25	0,525	0,621	0,654	0,606	0,694	0,655
0,625	0,379	0,463	0,425	0,314	0,501	0,404
0,313	0,271	0,267	0,222	0,175	0,263	0,201
0,156	0,149	0,126	0,121	0,107	0,136	0,114
0,078	0,087	0,086	0,085	0,082	0,093	0,090
0,039	0,070	0,072	0,073	0,073	0,078	0,076
0,020	0,062	0,064	0,067	0,070	0,072	0,070

**Bảng 3.6. Độ lặp lại của phản ứng**

Nồng độ µg/ml	OD trung bình	SD	CV%
20	1,593	0,067	4,20
10	1,328	0,047	3,55
5	1,143	0,051	4,44
2,5	0,909	0,055	6,07
1,25	0,626	0,058	9,28
0,625	0,414	0,065	15,80
0,313	0,233	0,040	17,16
0,156	0,126	0,015	12,12
0,078	0,087	0,004	4,44
0,039	0,074	0,003	3,90
0,020	0,068	0,004	5,76
CV%			7,88

Đối với việc thẩm định phương pháp phân tích sinh học, độ chính xác của phương pháp thể hiện bằng hệ số biến thiên (CV%) và giá trị này cần đạt xung

quanh giá trị trung bình, không nên vượt quá 15% ngoại trừ tại điểm LOQ, hệ số biến thiên có thể biến thiên nhiều hơn nhưng không vượt quá 20% [16].

Theo kết quả ở bảng 3.6, hệ số biến thiên thu được là 7,88% của 6 mẫu thử trên cùng phản ứng. Đây là hệ số thấp cho thấy phương pháp có độ lặp lại cao và ổn định. Độ lặp lại trong cùng phản ứng đạt yêu cầu cho phép.

***Độ đúng và độ lặp lại giữa các lần thực hiện phản ứng***

Độ đúng của một quy trình phân tích là mức độ sát gần của các giá trị tìm thấy với giá trị thực khi áp dụng quy trình đề xuất trên cùng một mẫu thử đã được làm đồng nhất trong cùng điều kiện xác định.

Độ đúng thường được biểu thị bằng tỷ lệ phục hồi % của các giá trị tìm thấy so với giá trị được thêm vào mẫu thử bằng phương pháp đề xuất, được tính theo công thức [16]:

$$\frac{M}{M_o} \times 100\%$$

Trong đó:

M là giá trị đo được

M<sub>o</sub> là giá trị thực (nồng độ của các mẫu đã biết trước nồng độ).

Độ phục hồi càng cao thì phương pháp có độ đúng càng cao.

Để xác định tỷ lệ phục hồi và độ lặp lại giữa những lần thí nghiệm độc lập, các mẫu với các nồng độ đã biết trước được lựa chọn ngẫu nhiên (30 µg/ml, 15 µg/ml, 12,5 µg/ml, 10 µg/ml, 8 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml). Tiến hành phản ứng ELISA, độ biến thiên (CV%) và tỷ lệ phục hồi được tính sau 3 lần thí nghiệm độc lập (bảng 3.7).

**Bảng 3.7. Độ chính xác và độ đúng của phản ứng**

Nồng độ lý thuyết của các mẫu “spiked” ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kết quả ELISA		CV (%)	Tỉ lệ phục hồi (%)
	Nồng độ trung bình ( $\mu\text{g/ml}$ )	SD		
30	27,96	1,64	5,87	93,21
15	14,74	0,40	2,72	98,24
12,5	13,75	1,18	8,57	110,00
10	9,68	1,22	1,64	96,77
8	7,45	1,22	1,31	93,13
5	4,85	0,38	7,85	96,93
1	0,80	0,09	1,60	79,67
Trung bình			9,37	95,42

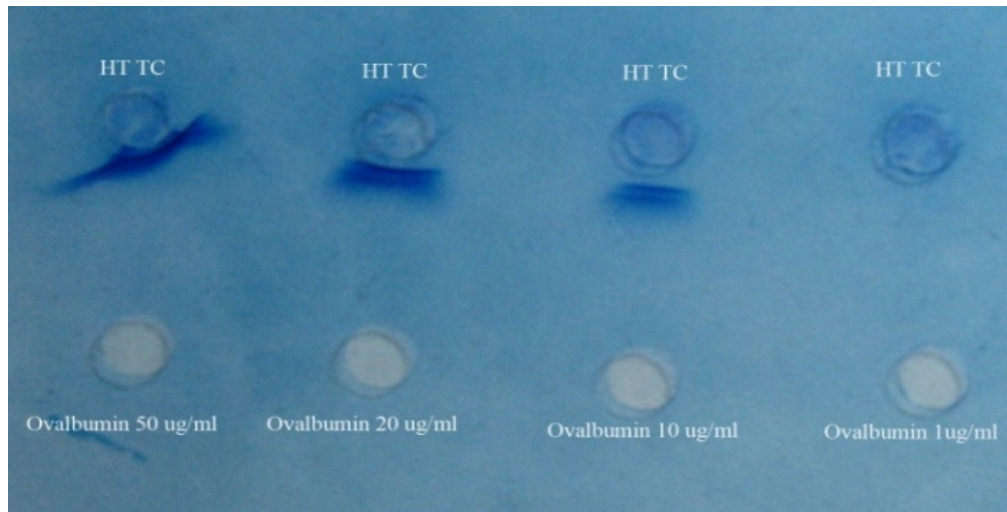
Hệ số phân tán (CV%) của 7 mẫu thử với các nồng độ khác nhau giữa 3 lần thử nghiệm khác nhau đạt 9,37% . Đây là hệ số thấp chứng tỏ phương pháp có độ lặp lại và độ ổn định cao giữa các lần thử nghiệm. Thêm vào đó, tỉ lệ phục hồi đạt 95,42% cho thấy độ đúng của 3 lần thử nghiệm cao. Điều này cho thấy, phương pháp không chỉ cho độ lặp lại và độ ổn định cao mà còn cho độ đúng rất cao.

Như vậy, phương pháp ELISA được xây dựng trong nghiên cứu này có độ chính xác rất cao (độ lặp lại trong cùng phản ứng đạt 7,88% và độ lặp lại sau những lần thí nghiệm độc lập đạt 9,37%), và độ đúng cao (tỉ lệ phục hồi đạt 95,42%).

### 3.4.4. So sánh với phương pháp điện di miễn dịch đối lưu

Để so sánh đối chiếu với các phương pháp miễn dịch khác về độ nhạy trong việc định lượng ovalbumin, phương pháp điện di miễn dịch đối lưu được sử dụng. Kháng thể được sử dụng là kháng thể kháng ovalbumin từ huyết thanh thỏ kháng ovalbumin tinh chế theo qui trình được miêu tả ở trên và các mẫu ovalbumin chuẩn với các nồng độ khác nhau.

Với nồng độ kháng nguyên ovalbumin 50  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  được đặt ở các giếng phía cực âm và huyết thanh thỏ kháng ovalbumin tinh chế đặt ở các giếng phía cực dương. Kết quả ở hình 3.7 cho thấy, xuất hiện cung ngưng kết KN-KT ở nồng độ ovalbumin từ 10÷50  $\mu\text{g/ml}$ . Ở nồng độ ovalbumin là 1  $\mu\text{g/ml}$  không thấy xuất hiện cung ngưng kết. Điều này cho thấy, phương pháp điện di miễn dịch đối lưu chỉ có thể phát hiện được ovalbumin với nồng độ thấp nhất là 10  $\mu\text{g/ml}$ .



Hình 3.7. Tiêu bản nhuộm Coomassie phương pháp điện di đối lưu định lượng ovalbumin

Như vậy, với thời gian thực hiện ngắn (1 ngày, 1 đêm), có thể thực hiện cùng lúc 1 lượng mẫu lớn, độ lặp lại, độ nhạy 30 ng/ml (bảng 3.4), độ chính xác rất cao (CV <15%, tỉ lệ phục hồi > 95%, bảng 3.7), phương pháp ELISA được xây dựng trong nghiên cứu này là phương pháp có ưu thế vượt trội trong việc định lượng ovalbumin.

### 3.5. ỨNG DỤNG HỆ ELISA ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG OVALBUMIN TRONG TRONG VACCIN CÚM A/H5N1

Sau khi tối ưu hoá các thông số của phương pháp ELISA, các mẫu ovalbumin (trong vacxin cúm và ovalbumin thô sản xuất từ lòng trắng trứng) được sử dụng để thẩm định phương pháp. Mỗi mẫu ovalbumin được đo 3 lần để xác định độ lặp lại (Bảng 3.8).

**Bảng 3.8. Kết quả ELISA định lượng các mẫu ovalbumin**

Mẫu ovalbumin	Nồng độ ovalbumin xác định bằng ELISA	CV (%)
Dịch niệu nệm trứng gà có phôi không nhiễm virus	< 30 ng/ml	7,87
Dịch niệu nệm trứng gà có phôi không nhiễm virus lô 4	< 30 ng/ml	8,12
Dịch virus sau lọc thô	< 30 ng/ml	7,69
Vacxin cúm bán thành phẩm lô 1	< 30 ng/ml	6,89
Vacxin cúm bán thành phẩm lô 3	< 30 ng/ml	13,6
Vacxin cúm bán thành phẩm lô 4	< 30 ng/ml	12,5
Lòng trắng trứng	3 µg/ml	9,83

Theo kết quả ở bảng 3.8 cho thấy:

Nồng độ ovalbumin trong lòng trắng trứng là cao nhất (3 µg/ml) do ovalbumin là thành phần chính của lòng trắng trứng. Tuy nhiên, ovalbumin ở dịch niệu nệm (niệu nang) rất ít (<30ng/ml). Điều này cho thấy, kỹ thuật hút dịch niệu



nệm trong quá trình sản xuất là rất quan trọng, tránh hút lòng trắng trứng sẽ làm giảm hàm lượng ovalbumin trong vacxin cúm A/H5N1.

Ở các lô vacxin cúm bán thành phẩm và dịch virus sau lọc thô nồng độ ovalbumin rất thấp (đều nhỏ hơn 30 ng/ml), cho thấy tất cả các mẫu này đều đạt tiêu chuẩn chất lượng về hàm lượng ovalbumin.

Hệ số biến thiên (CV%) trong các mẫu tương đối thấp (CV% < 15%) cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ ổn định cao. Như vậy, phương pháp có độ chính xác cao.

Có thể nhận thấy rằng, phương pháp ELISA mà chúng tôi xây dựng có độ đặc hiệu cao vì không chỉ có khả năng phát hiện các mẫu ovalbumin tinh khiết mà còn có khả năng định lượng các mẫu ovalbumin thô với độ lặp lại cao.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical line on the left and a horizontal line at the top and bottom, all ending in small circular curls.

**CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

## **4.1. KẾT LUẬN**

### **4.1.1. Sản xuất kháng thể thử kháng ovalbumin**

- Đã sản xuất được kháng thể thử kháng ovalbumin, hiệu giá đạt 1/250 (phương pháp Ouchterlony), nồng độ kháng nguyên là 20 µg/ml.
- Đã xây dựng được quy trình gây miễn dịch thử sản xuất kháng thể kháng ovalbumin với kháng nguyên ovalbumin pha trong tá chất Freund. Quy trình miễn dịch gồm 4 mũi, liều lượng kháng nguyên tăng dần từ 0,5÷1mg/ml.

Thời gian gây miễn dịch là 40 ngày.

### **4.1.2. Đã sử dụng cột HiTrap protein G HP tinh chế thành công kháng thể (IgG) kháng ovalbumin từ huyết thanh thử thô**

- Nồng độ kháng thể (IgG) sau tinh chế là: 5,378mg/ml
- Đảm bảo độ sạch huyết thanh sau tinh chế (loại được hầu hết ambumin trong huyết thanh thô)

### **4.1.3. Xây dựng và thẩm định được hệ ELISA gián tiếp định lượng ovalbumin trong vacxin cúm A/H5N1, với các thông số sau:**

- Độ nhạy: LOD = 0,102; LOQ= 0,173
- Độ chính xác: CV% trong cùng lần thực hiện: 7,88%  
và CV% trong các lần thực hiện: 9,37%
- Độ đúng: Tỷ lệ phục hồi: 95,42%
- Phương pháp đạt độ ổn định cao.

#### **4.2. KIẾN NGHỊ**

- Ứng dụng phương pháp ELISA gián tiếp để kiểm định tiêu chuẩn ovalbumin trong vaccin cúm A/H5N1.
- Xây dựng bộ kit định lượng ovalbumin trong vaccin cúm A/H5N1

# TÀI LIỆU THAM KHẢO

## TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Lê Văn Hiệp (2007) , “Vaccin cúm A/H5N1 nào cho người Việt Nam”, Tạp chí Y học dự phòng, 2007, tập XVII, số 3 (88), tr 44-47.
2. Lê Văn Hiệp (2006), *Vaccin học những vấn đề cơ bản*, NXB Y Học, Hà Nội
3. Lê Văn Hiệp, Nguyễn Thị Minh Hiền, Lê Văn Bé, Nguyễn Thị Lan Phương, Trần Ngọc Nhơn, Đặng Thị Hồng Vân, Viện Vắc xin và sinh phẩm y tế Nha Trang (2007), “Nghiên cứu sản xuất vaccin cúm A/H5N1 cho người trên trứng gà có phôi, từ chủng NIBRG-14 tại viện Vaccin”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập XVII, số 5 (90) Phụ bản, tr 52-56.
4. Lê Văn Hiệp và Đặng Thị Hồng Vân (2007), “Thử nghiệm các loại tá chất cho vắc xin cúm A/H5N1”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập XVII, số 6(91), tr5-9.
5. Đỗ Ngọc Liên (2004), *Thực hành hoá sinh miễn dịch*, NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội
6. Lê Thị Hoài Thu (2006), *Đáp ứng miễn dịch trên súc vật thí nghiệm của vaccin cúm A/H5N1*, Luận văn tốt nghiệp cử nhân, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Tp. Hồ Chí Minh.
7. Nguyễn Thị Nguyệt Thu (2002), *Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật hai kháng nguyên kẹp kháng thể để theo dõi đáp ứng miễn dịch*, Luận văn thạc sĩ dược học, Tp. Hồ Chí Minh-2002.
8. Phạm Văn Ty (2004), *Miễn dịch học phân tử*, NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội.

## **TÀI LIỆU TIẾNG ANH**

9. Biodirectory (2004), Amersham Biociences, p709.
10. Edevåg G, Eriksson M, Granström M, The development and standardization of an ELISA for ovalbumin determination in influenza vaccines, J Biol Stand 1986;14(3):223-30.
11. Gel Filtration principle and methods (2002), Amersham Biosciences, p63, p116.
12. Paszkowska M, Jankowski M, Usefulness of ELISA and radial immunodiffusion tests for evaluation of the degree of purification of influenza diagnostic and vaccine preparations, Med Dosw Mikrobiol 1991; 43(3-4):135-43,
13. Kürsteiner O, Moser C, Lazar H, Durrer P, Inflexal V--the influenza vaccine with the lowest ovalbumin content, Vaccine 2006;24(44-46):6632-5,
14. The European Agency for evaluation of medicinal products , Human medicines evaluation unit (1997) “ ICH topic Q2A Validation of analytical methods: methodology” CPMP/ICH/281/95, pp,1-9,
15. The Royal tropical Institute (1987), Manual of International course in serological diagnostic techniques, Amsterdam, pp 88-91.
16. US department of Health and Human Services Food and Drug administration, Center for Drug Evaluation and research (CDER), Center for veterinary Medicine (CVM) (2001) “ Guidance for Industry - Bioanalytical Method”, pp1-20.

## **TÀI LIỆU INTERNET**

17. <http://en.Wikipedia.org/wiki/ovalbumin>
18. <http://vi.wikipedia.org/wiki/>
19. <http://www.research.com.miscabs/ovalbab.htm>
20. <http://www.seramun.de/ADI-SER,PDF>
21. <http://www.worthington-biochem.com/OA/default.html>

## PHỤ LỤC 2

### Dự thảo chất lượng vaccin Fluvac phòng cúm A/ H5N1 hấp phụ

STT	Các chỉ tiêu	Tiêu chuẩn đánh giá	Tiêu chuẩn áp dụng
1.	Vô trùng	Không có sự phát triển của vi sinh vật.	ĐĐVN tập 3, Hà Nội (2003)
2.	Hiệu lực bất hoạt	8/10 trứng gà có phôi 10÷11 ngày tuổi sống sót sau khi được cấy truyền 0.2ml mẫu thử ở mỗi độ pha 1; 1/10 và 1/100. không có hoạt tính ngưng kết hồng cầu trong dịch niệu nang của tất cả các trứng được cấy truyền lần 2.	WHO/TRS 927/2005
3.	Nồng độ kháng nguyên HA	$\geq 15\mu\text{g}/1$ liều đơn cho người hoặc nồng độ kháng nguyên đủ để tạo được hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu $\geq 1/40$ trong huyết thanh của gà trống 3÷6 tháng tuổi sau liều miễn dịch thứ 2, 10 ngày với quy trình miễn dịch 2 liều cách nhau 20 ngày.	WHO/TRS 927/2005 WHO consultation for the development of a global action plan to increase the supply of pandemic influenza vaccines.
4.	Protein tổng số	$\leq 6$ lần tổng số nồng độ HA của vaccin nhưng không nhiều hơn $100\mu\text{g}$ protein/1 chủng virus/1 liều đơn cho người và tổng số protein không nhiều hơn $300\mu\text{g}/1$ liều	WHO/TRS 927/2005

		đơn cho người.	
5.	Endotoxin	$\leq 100\text{IU}/1$ liều đơn cho người.	DD Anh – Crown Copyright 2001
6.	Ovalbumin	$\leq 1\mu\text{g}/1$ liều đơn cho người.	WHO/TRS 927/2005
7.	Cảm quan	- Trạng thái lắng cặn: phần nước ở trên là dịch trong, không màu, phần cặn màu trắng lắng ở dưới. - Sau khi lắc nhẹ tạo thành huyền dịch đồng nhất, không lẫn chất lạ hoặc chất khó hòa tan.	
8.	pH	$7 \pm 0,5$	ĐĐVN tập 3, Hà Nội (2003)
9.	Tính an toàn	Toàn bộ chuột thí nghiệm sống khỏe mạnh sau ít nhất 7 ngày theo dõi.	ĐĐVN tập 3, Hà Nội (2003)
10.	$\text{Al}(\text{OH})_3$ hoặc $\text{AlPO}_4$	$1\text{mg} \pm 0,2/\text{ml}$	ĐĐVN tập 3, Hà Nội (2003)
11.	Merthiolate	$\leq 0,2\text{g}/\text{l}$	ĐĐVN tập 3, Hà Nội (2003)
12.	Formandehyt tồn dư	$\leq 0,2\text{g}/\text{l}$	ĐĐVN tập 3, Hà Nội (2003)



### PHỤ LỤC 3

#### CÁCH PHA CÁC DUNG DỊCH

Pha dung dịch PBS pH7,2

NaCl:	9g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	1,1g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	0,28g
Nước cất vừa đủ 1 lít.	

Pha dung dịch nhuộm màu (Coomassive brilliant blue)

Công thức pha cho 200 ml	
Acetic acid	20 ml
Ethanol 96%	90 ml
Nước cất	90 ml
1g coomassive brilliant blue	

Pha dung dịch tẩy màu

Công thức pha cho 500 ml	
Acetic acid	50 ml
Ethanol 96%	225ml
Nước cất	225ml

Pha dung dịch đệm barbitol 0,1M, pH8,6

Barbitone sodium GPR (BDH, prod.nr.27283):	20,6g
Barbitone GPR (BDH, prod.nr.27282):	4,0g
Nước cất	1000 ml

Đệm Glycine-HCl 0,1M; pH=2,5÷2,6 (dùng để chiết rửa kháng thể ra khỏi cột hấp phụ miễn dịch)

Điều chế glycine 0,2M (15,01g hòa với nước cất thành 800 ml)

HCl 2M dùng để điều chỉnh pH của dung dịch glycine đến 2,5÷2,6. Sau đó thêm nước cất vừa đủ 1 lít. Trước khi dùng pha loãng hai lần với nước cất.

Sodium phosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 20mM, pH7,0

Cân 2,48g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pha trong 800 ml nước cất. Điều chỉnh pH bằng dung dịch  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1M đến 7. Sau đó thêm nước cất đủ 1 lít.

#### Tris-HCl

Cân 12,11g trizma base pha trong 80 ml nước cất. Dùng axit HCl 1N để chỉnh về pH 9,0. sau đó thêm nước cất vừa đủ 100 ml.

#### Đệm carbonate, pH=9,6

$\text{NaN}_3$	0,2g
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1,5g
$\text{NaHCO}_3$	2,39g
Nước cất vừa đủ một lít	
Chỉnh về pH = 9,6	

#### Dung dịch Sodium acetate

Sodium acetate khan	90,2g
Nước cất vừa đủ 1 lít	
Chỉnh về pH=5,5	

#### Cơ chất TMB (dùng cho một phiên)

Nước cất	9ml
Na-acetate	1ml
TMB/Ethanol	0,167ml
Oxi già 30%	2 $\mu$ l

#### Đệm khóa phiên

Casein	1g
PBS, pH7,2	100 ml

#### Đệm ELISA

Casein	0,5g
Tween 20	50 $\mu$ l
PBS vừa đủ	100 ml

#### Dung dịch rửa phiên

Nước cất:	1 lít
Tween 20	0,5ml

## PHỤ LỤC 1

### SƠ ĐỒ QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ KIỂM ĐỊNH VẮC XIN CÚM SẢN XUẤT TRÊN TRỨNG GÀ CÓ PHÔI

