

TẠO CÁC DÒNG TẾ BÀO LAI SINH KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG ĐẶC HIỆU PROGESTERON

NGUYỄN THỊ TRANG, NGUYỄN THỊ CÚC,
ĐỖ THỊ PHƯƠNG, ĐỖ THỊ THẢO

Viện Công Nghệ Sinh học

Progesterone là hormon sinh sản thuộc loại hormone steroid có trọng lượng phân tử nhỏ (314 Da), được tiết ra chủ yếu từ thể vàng của buồng trứng và một phần từ nhau thai. Hàm lượng progesterone trong máu có liên quan trực tiếp đến động thái của quá trình sinh sản. Nó là một hormon “chìa khoá” để thiết lập và duy trì một chu kỳ sinh sản bình thường của con cái. Hàm lượng progesterone trong dịch thể đạt thấp nhất trong ngày đầu động dục. Sau đó tăng lên từ ngày thứ 3-6, hàm lượng progesterone tăng cao vào ngày thứ 9-18 rồi giảm dần đến trước ngày động dục ở kỳ sau [2]. Nếu trứng được thụ tinh và làm tổ ở tử cung thì hàm lượng progesterone đạt ngưỡng cao nhất sau 21-22 ngày rồi ổn định trong suốt quá trình mang thai với tác dụng an thai. Vì vậy, việc xác định hàm lượng progesterone trong máu và sữa kết hợp với các biện pháp chẩn đoán lâm sàng có thể giúp chẩn đoán sớm sự có thai hay các rối loạn sinh sản ở gia súc cái như thể vàng tồn lưu [1].

Công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng phát triển mạnh mẽ đã đem lại những ý nghĩa vô cùng quan trọng trong khoa học và thực tiễn. Một trong số những ứng dụng của nó là chẩn đoán nhanh và chính xác các bệnh của người và vật nuôi nhờ vào tính đặc hiệu và độ nhạy rất cao của kháng thể đơn dòng [3, 4, 5, 7]. Đối với progesterone, rất nhiều công ty sinh học trên thế giới đã và đang sử dụng kháng thể đơn dòng kháng progesterone trong các kit định lượng để phục vụ cho việc định tính và định lượng hormone này trong chẩn đoán bò sữa như DELFIA-Progesterone kit (PerkinElmer - US); EIA-Progesterone kit (Cayman - US); M-kit (Ridgeway Science - UK)....

Bản thân progesterone không kích thích cơ thể sinh đáp ứng miễn dịch nên trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng progesterone có gắn

Albumin (P3-A1) làm kháng nguyên gây miễn dịch cho chuột. Tế bào lympho B tách từ lá lách chuột BALB/c đã có đáp ứng miễn dịch với P3-A1 sẽ được thu nhận để lai với tế bào myeloma Sp2/0-Ag14. Trải qua các bước sàng lọc và tạo dòng, 2 dòng tế bào sinh kháng thể đơn dòng kháng progesterone có tính đặc hiệu và độ nhạy cao nhất đã được thu nhận. Kháng thể đơn dòng thu được từ dịch nổi nuôi cấy 2 dòng tế bào này đã được kiểm tra tính đặc hiệu và hiệu giá.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phương pháp nuôi cấy tế bào Sp2/0-Ag14 in vitro

Tế bào Sp2/0-Ag14 do GS. J. M. Pezzuto thuộc trường Đại học Hawaii, Hoa Kỳ cung cấp. Tế bào được nuôi cấy dưới dạng hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy RPMI-1640 có bổ sung 10% FBS, 1% PSF, 10% Sodium pyruvat (GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1 : 3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở 37°C, 5% CO₂.

2. Phương pháp gây miễn dịch

Chuột BALB/c cái, khoẻ mạnh từ 6-8 tuần tuổi được gây miễn dịch với kháng nguyên progesterone gắn Albumin (Sigma). Kháng nguyên ở các nồng độ 100 µg/con/lần; 250 µg/con/lần và 500 µg/con/lần được trộn đều với tá chất CFA (Completed Freund's adjuvant) theo tỉ lệ 1 : 1 cho lần tiêm đầu và với tá chất IFA (Incompleted Freund's adjuvant) theo tỉ lệ 1:1 cho lần tiêm nhắc lại. Kháng nguyên sau khi được trộn với tá chất sẽ được tiêm dưới da của chuột. Lần tiêm nhắc lại được thực hiện vào 3-4 tuần sau lần tiêm đầu. Lần tiêm cuối cùng cho chuột được thực hiện 3 ngày trước khi thí nghiệm lấy tế bào lympho B.

3. Phương pháp lai tế bào và tách dòng

Lá lách chuột được lấy khỏi cơ thể chuột và tách rời thành từng tế bào [6]. Hỗn dịch này được rửa sạch bằng PBS và đem lai với tế bào Sp2/0-Ag14 với tỉ lệ 1 : 10 trong điều kiện tác động của 40% polyethylene glycol (PEG, MW1500 - Sigma), tỉ lệ 1:2 trong 1 phút, tiếp tục thêm 20ml môi trường RPMI-1640 để rửa. Sau quá trình rửa để loại bỏ PEG, tế bào được bổ sung môi trường Dulbecco Modified Eagle medium (DMEM) (GIBCO # 11995) có bổ sung 10% HAT (GIBCO # 21060-017) và được chia vào các phiến 96 giếng. Sau 5 ngày, tế bào lai được thay môi trường có bổ sung 10% HT (GIBCO # 11067-030). Sau 7 ngày, 100 µl dịch nổi thu nhận từ mỗi giếng nuôi tế bào được kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng đặc hiệu progesterone bằng phương pháp ELISA. Dịch nổi nào có được giá trị OD cao gấp 3 lần so với đối chứng âm được xem là có hoạt tính, nói cách khác là có kháng thể kháng progesterone trong dịch nổi tương ứng với sự xuất hiện của tế bào lai có khả năng sản xuất kháng thể kháng progesterone. Thu nhận tế bào lai hybridomas từ các giếng có hoạt tính mạnh (giá trị OD cao) cấy chuyển sang phiến 24 giếng có môi trường RPMI-1640 để tiếp tục nuôi cấy. Kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp ELISA để

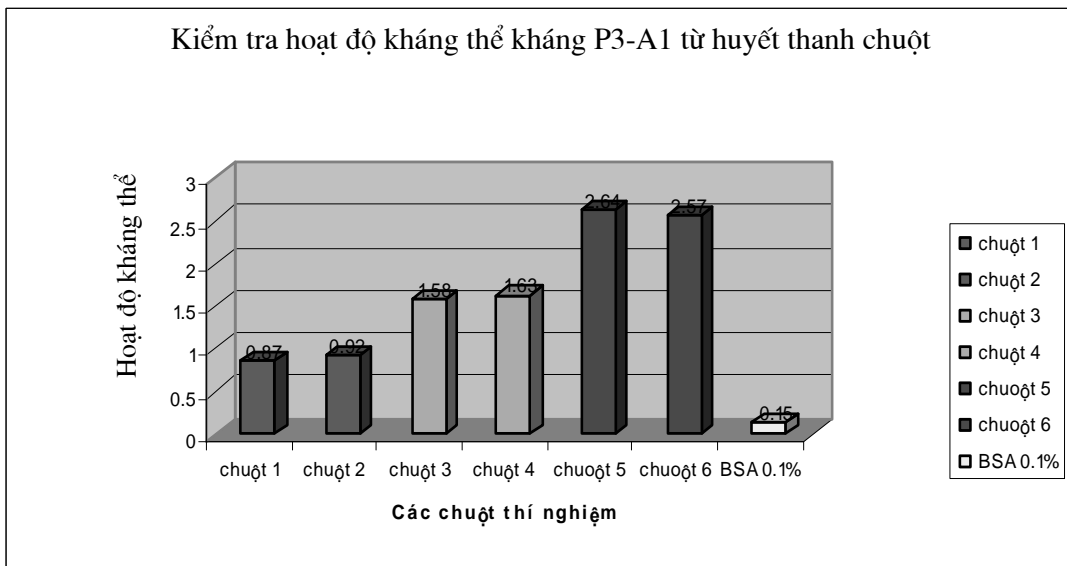
tiến hành tách dòng. Lựa chọn các giếng có một clone tế bào, có sinh kháng thể kháng progesterone để nhân nuôi lượng lớn, từ đó tinh sạch và kiểm tra hiệu giá của kháng thể đơn dòng thu được.

4. Phương pháp ELISA để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng đặc hiệu progesterone

Phương pháp ELISA được thực hiện theo Liddell và Cryer (1993). Kháng nguyên được pha loãng ở nồng độ 250 ng/ml trong Carbonate coating buffer (100 µl/giếng) và ủ bản 1 giờ ở 37°C. Tiếp theo, bản ủ được rửa 5 lần bằng Washing buffer (Phosphate-buffered saline – PBS có bổ sung 0,05% Tween 20 và 1% skim milk). Tiếp tục bổ sung 100 µl dịch nổi cần kiểm tra vào từng giếng, ủ 1 giờ ở 37°C. Goat-Antimouse IgG conjugate HRP (horseradish peroxidase) (Promega # W4021) được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng P3-A1. Thêm 100 µl/giếng cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) và ủ 1 giờ ở 37°C. Đọc kết quả ELISA ở bước sóng 450 nm.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Gây miễn dịch cho chuột



Hình 1. Kết quả kiểm tra hoạt độ kháng thể kháng P3-A1 từ kháng huyết thanh của chuột được gây miễn dịch

Tiến hành gây miễn dịch cho 06 chuột BALB/c với kháng nguyên P3-A1. Trong đó, 6 chuột được chia làm 3 lô thí nghiệm. Chuột 1 và 2 thuộc lô thứ nhất được tiêm kháng nguyên ở liều 100 µg/con/lần. Chuột 3 và 4 thuộc lô thứ 2 được tiêm kháng nguyên với liều 250 µg/con/lần. Chuột 5 và 6 thuộc lô thứ 3 được tiêm kháng nguyên với liều 500 µg/con/lần. Sau quá trình gây miễn dịch, máu từ hốc mắt của 6 chuột được thu lại và tách huyết thanh. Các mẫu huyết thanh này được sử dụng cho phản ứng ELISA để kiểm tra khả năng đáp ứng miễn dịch của các lô thí nghiệm. Kết quả cho thấy, chuột ở lô 1 có đáp ứng miễn dịch thấp nhất và ở lô 3 với liều kháng nguyên 500 µg/con/lần cho đáp ứng cao nhất thể hiện qua giá trị OD cao nhất trong phản ứng ELISA (Hình 1). Dựa vào kết quả này, chuột số 5 ở lô số 3 được lựa chọn để thu tế bào lympho B phục vụ cho quá trình lai tạo tế bào hybrid sau này.

2. Lai tạo và chọn dòng dòng tế bào hybrid sản xuất kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu progesterone

Sau quá trình dung hợp tế bào (trên 288 giếng) rồi sàng lọc bằng môi trường chọn lọc HAT và HT, 202 giếng có xuất hiện tế bào lai. Như vậy, hiệu quả lai (fusion efficiency) đạt tới 70,14%. Để chọn ra được giếng có tế bào lai sinh kháng thể mong muốn, phương pháp ELISA được sử dụng nhằm kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng progesterone trong dịch

nổi thu được ở các giếng. Kết quả có 35/202 giếng (đạt 17,33%) dương tính với P3-A1. Trên cơ sở đó, giếng có giá trị OD cao nhất được lựa chọn để thu nhận, làm sạch dòng bằng phương pháp pha loãng tối hạn và chọn lọc bằng phương pháp ELISA. Sau quá trình này, 8 dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng progesterone tốt nhất kí hiệu MCAPr1 đến MCAPr8 tương ứng với 8 giếng có giá trị OD cao nhất nằm trong khoảng từ 1,47 đến 2,57 đã được lựa chọn. 8 dòng tế bào lai nói trên được nhân nuôi ở cấp độ lớn hơn để kiểm tra các chỉ tiêu khác. Tuy nhiên, trong quá trình nhân nuôi, 5 dòng tế bào lai là dòng MCAPr1, MCAPr2, MCAPr4, MCAPr5, MCAPr7 đã chứng minh khả năng sinh kháng thể với hiệu suất tốt hơn hẳn 3 dòng còn lại. Vì vậy, 05 dòng trên được lựa chọn nhân nuôi để thu kháng thể đơn dòng nhằm tiếp tục quá trình sàng lọc bằng biện pháp kiểm tra tính đặc hiệu trên các kháng nguyên khác nhau.

3. Đánh giá tính đặc hiệu và hiệu giá kháng thể của 5 dòng tế bào đã chọn

Để đáp ứng được yêu cầu của thực tiễn cần phải có dòng tế bào sinh kháng thể tốt, các kháng thể đơn dòng thu được phải có tính đặc hiệu và độ nhạy cao, do vậy 5 dòng tế bào được kiểm tra hiệu giá kháng thể và tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng với các hormon steroid có cấu trúc gần giống với progesterone là testosterone, estradiol, corticosterone. Kết quả được trình bày ở bảng 1:

Bảng 1

Tính đặc hiệu và hiệu giá kháng thể thu được từ 5 dòng tế bào sản xuất kháng thể đơn dòng kháng progesterone

STT	Dòng tế bào	Progesterone	Estradiol	Testosterone	Corticosterone	Hiệu giá kháng thể
1	MCAPr1	+	-	-	-	2500
2	MCAPr2	+	+	-	-	1000
3	MCAPr4	+	-	-	+	3000
4	MCAPr5	+	-	-	-	2000
5	MCAPr7	+	-	+	+	2500

Ghi chú: (+). có kết quả dương tính với giá trị OD $\geq 0,5$ trong phản ứng ELISA; (-) là kết quả âm tính với giá trị OD $\leq 0,5$ trong phản ứng ELISA.

Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy, dòng tế bào MCAPr1 và MCAPr5 có độ đặc

hiệu cao khi có phản ứng dương tính với progesterone và âm tính với tất cả các kháng

nguyên còn lại. Đồng thời, hiệu giá kháng thể đơn dòng của 2 dòng này tương đối tốt (2500 với dòng MCAPr1 và 2000 với dòng MCAPr5). Từ kết quả nghiên cứu ở trên chúng tôi tiến hành nhân nuôi *in vitro* 2 dòng tế bào lai hybrid để thu số lượng lớn nhằm tạo nguồn tế bào để tạo băng cho chuột và để lưu giữ bảo quản trong nitrogen lỏng.

4. Gây băng thực nghiệm trên chuột bằng dòng tế bào lai MCAPr1

Kháng thể đơn dòng thu được từ dịch nổi nuôi cấy thường rất tinh sạch, tuy nhiên, hàm lượng của chúng rất thấp và nếu sử dụng để sản xuất các kit chẩn đoán thì không khả thi do giá thành rất cao. Trong khi đó, nếu sử dụng tế bào lai để gây băng trên chuột thì lượng kháng thể đơn dòng thu được thường cao gấp 100 - 1000 lần so với trong dịch nổi. Do đó, từ kết quả nghiên cứu *in vitro*, 10 chuột thí nghiệm dòng BALB/c được tiến hành gây băng bằng tế bào lai MCAPr1 [6]. Kết quả cho thấy, đã có 6 chuột xuất hiện băng và thu được 45 ml dịch băng. Với lượng dịch băng này, chúng tôi thực hiện các bước tinh sạch, thu nhận và bảo quản kháng thể đơn dòng trong tủ lạnh sâu -80°C để tiến tới nghiên cứu, hoàn thiện quy trình gắn với chất nhũ vàng (colloidal gold) nhằm ứng dụng trong việc tạo các kit ELISA hoặc EIA định lượng progesterone sau này.

III. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã gây miễn dịch thành công với nồng độ kháng nguyên Progesterone-albumin phù hợp là 500 µg/con/lần. Sau quá trình lai và tách dòng, 2 dòng tế bào lai MCAPr1 và MCAPr5 sản sinh kháng thể đơn dòng kháng progesterone chất lượng cao đã được lựa chọn. Thông qua phản ứng ELISA, hiệu giá và tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng từ dòng MCAPr1 cho kết quả tốt nhất nên được lựa chọn để gây băng cho chuột nhằm thu lượng lớn

kháng thể đơn dòng. Với 10 chuột thí nghiệm, 6 chuột đã xuất hiện băng và 45 ml dịch băng đã được thu nhận để tinh sạch và phục vụ cho việc tạo kit định lượng progesterone sau này.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. J. M. Pezzuto, trường đại học Hawaii, Hoa Kỳ đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện công trình nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Xuân Tịnh, Tiết Hồng Ngân, Nguyễn Bá Mùi, Lê Mộng Loan**, 1996: Sinh lý học gia súc: 63-68. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
2. **Phan Văn Kiềm, Trịnh Quang Phong, Nguyễn Quý Quỳnh Hoa, Tăng Xuân Lưu**, 2003: Ứng dụng kết quả nghiên cứu hàm lượng progesteron để chẩn đoán và điều trị rối loạn sinh sản ở bò sữa: 708-711. Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. **Birch J. R., Lennox E. S.**, 1995: Monoclonal antibodies: principles and applications. John Wiley & Sons.
4. **Celis A., Dejgaard Kurt, Julio E. Celis**, 1994: Cell Biol., 2: 269-275.
5. **Kohler G., Milstein C.**, 1975: Nature, 256(5517): 495-497.
6. **Liddell E. J., Cryer A.**, 1991: A practical guide to monoclonal antibodies. John Wiley & Sons.
7. **Me C., Speir R. E.**, 1996: Aspects Cambridge: 92-98.
8. **Sithigorngul P., Chauyhuwong P., Sithigorngul W., Longyant S., Chaivisuthangkura P., Menasveta P.**, 2000: Dis Aqua Organ, 10: 42(1).

STUDYING ON CREATION OF HYBRIDOMAS PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR PROGESTERON

TRANG THI NGUYEN, CUC THI NGUYEN,
PHUONG THI DO, THAO THI DO

SUMMARY

The progesterone highest level is reached on the 21st and 22nd days of pregnancy. The concentrations of progesterone in milk and serum can be quantitated. This concentration changes by time and is used as indicators of pregnancy or diseases in cattle. To quantify the amount of progesterone in milk or serum, using monoclonal antibody is very feasible. In our study, we were successful in fusion between myeloma SP2/0-Ag14 and the lymphoid B isolated from spleen of the mouse that were immunized by P3-A1 at the dose of 500 µg/mouse/time as the most effective concentration. By using the limiting dilution method, we cloned and selected the 2 clones of hybridomas - MCAPr1 and MCAPr5 which were able to produce specific monoclonal antibody against progesterone. To check the specificity of achieved monoclonal antibodies, the supernatants collected from culturing hybridomas were tested with others steroids which is progesterone similar structures such as estradiol, testosterone and corticosterone. Without any cross reaction, the clone MCAPr1 is selected for further culture at the larger scale in mice. From 6/10 experiment mice, we collected 45 ml of ascite fluid. The purified monoclonal antibody gained from this ascite fluid is saved at the -80°C for developing the quantitative progesterone kit in future.

Key words: Enzyme Linked Immuno Absorbent Assay (ELISA) Hybridomas, monoclonal antibody, myeloma, progesterone, steroid.

Ngày nhận bài: 7-8-2009