

NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG TẾ BÀO LAI SINH KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG ĐỘC TỔ STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) CÓ NGUỒN GỐC TỪ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Nghiêm Ngọc Minh¹, Nguyễn Thị Hoài Thu², Phạm Thùy Linh², Thân Đức Dương³, Vũ Thị Thu Hằng³, Lê Văn Phan⁴

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Công ty Cổ phần Phát triển Công nghệ Nông thôn

⁴Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài: 06.11.2015

Ngày nhận đăng: 20.3.2016

TÓM TẮT

Tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sản sinh ra 11 loại độc tố và 20 độc tố ruột (từ SEA đến SEE, từ SEG đến SER và SEU). Trong đó, độc tố ruột nhóm B (Staphylococcal enterotoxin B - SEB) là dạng độc tố chịu nhiệt gây bệnh đường ruột thường gặp trong các vụ ngộ độc thực phẩm liên quan đến tụ cầu. Các triệu chứng của nhiễm độc SEB khởi phát là sốt đột ngột, khoảng 40-41°C, ớn lạnh, nhức đầu, đau cơ và ho khan. Trường hợp nặng, bệnh nhân cảm thấy khó thở và tức ngực. Khi ăn phải độc tố, bệnh nhân bị viêm ruột dẫn tới buồn nôn, nôn và tiêu chảy. Mặc dù SEB không được coi là độc tố gây chết, nhưng với mức độ phơi nhiễm cao có thể dẫn đến nhiễm trùng, sốc và tử vong. Trong nghiên cứu này, để sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho SEB, kháng nguyên tái tổ hợp SEB đã loại bỏ độc tính được dùng để gây miễn dịch trên chuột tạo tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên. Tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên thu được từ lách và hạch của chuột được dung hợp với tế bào Myeloma để tạo dòng tế bào lai hybridoma sinh kháng thể đơn dòng. Bằng phản ứng ELISA và Western blot, chúng tôi đã sàng lọc được dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên SEB. Kết quả thu được từ nghiên cứu này cho thấy, kháng nguyên tái tổ hợp SEB có khả năng gây đáp ứng miễn dịch ở chuột BALB/c tạo kháng thể đơn dòng kháng lại kháng nguyên SEB. Kháng thể đơn dòng tạo ra sẽ được sử dụng để chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố SEB trên cơ sở sắc ký miễn dịch.

Từ khóa: ELISA, kháng nguyên tái tổ hợp SEB, kháng thể đơn dòng, tế bào lai hybridoma, western blot

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tụ cầu vàng *S. aureus* là một trong những nguyên nhân chính gây ngộ độc thực phẩm do chúng tiết ra các độc tố ruột staphylococcal enterotoxins (SEs). Trong đó, độc tố SEB bền với nhiệt là tác nhân chính thường gặp nhất trong các vụ ngộ độc thực phẩm do *S. aureus* (Jones, Khan, 1986). SEB hoàn chỉnh bao gồm một trình tự tín hiệu (signal peptide) gồm 27 amino acid ở đầu N (Jones, Khan, 1986). SEB ở dạng hoạt động là 1 chuỗi polypeptide đơn gồm 239 amino acid với khối lượng phân tử khoảng 28,336 kDa. Cấu trúc không gian của SEB gồm: 7 vùng xoắn α ; 14 phiến gấp nếp β và một cầu nối disulfite nối cysteine ở vị trí 120 và 140 (Kijek *et al.*, 2000). Protein SEB hình thành 2 vùng cấu trúc đặc biệt phức tạp được đóng gói nhỏ gọn chặt chẽ, cho phép SEB chống lại sự tác động của các protease trong dịch ruột, dạ dày như trypsin, chymotrypsin và

papain (Le Loir *et al.*, 2003). SEB là một siêu kháng nguyên, nó liên kết trực tiếp với phân tử phức hợp tương mô lớp II của tế bào trình diện kháng nguyên và vùng V β của thụ thể tế bào T theo cách thức không đặc hiệu kháng nguyên, dẫn đến sản sinh lượng lớn cytokine là chất trung gian gây độc của SEB (Stiles *et al.*, 2001). SEB gây độc cho đường tiêu hoá, đường hô hấp, các vết thương, thậm chí có thể xâm nhập qua da lành, có thể phân tán vào thức ăn, nguồn nước hoặc trong không khí. Vì vậy, SEB được liệt kê vào danh mục các tác nhân sinh học sử dụng trong chiến tranh và khủng bố sinh học (da Cunha *et al.*, 2007). Do đó, việc phát triển các kỹ thuật có khả năng phát hiện nhanh độc tố SEB đóng vai trò cực kỳ quan trọng và có ý nghĩa to lớn trong công tác phòng bệnh. Có nhiều phương pháp miễn dịch học khác nhau để phát hiện độc tố ruột của tụ cầu trong các mẫu thực phẩm như phương pháp khuếch tán miễn dịch, miễn dịch phóng xạ, phản ứng

ELISA và que thử nhanh. Hiện nay, các que thử nhanh dựa trên cơ sở sắc ký miễn dịch là lựa chọn tối ưu để phát hiện nhanh và chính xác các tác nhân sinh học cụ thể là vi khuẩn, virus, bào tử vi khuẩn... ngay tại hiện trường cho kết quả trong vài phút. Đây cũng là dạng que thử được sử dụng phổ biến, rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như chẩn đoán bệnh trong y học, phát hiện các chất gây nghiện, dấu vết trong khoa học hình sự, phát hiện độc chất... Que thử dạng sắc ký miễn dịch mà cơ sở là phản ứng đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu của nó. Phản ứng được thực hiện trên màng mỏng theo kiểu sắc ký nên dạng que thử này được gọi là sắc ký miễn dịch. Để sản xuất được que thử nhanh dựa trên cơ sở sắc ký miễn dịch cho chẩn đoán SEB đòi hỏi phải tạo ra được kháng thể đơn dòng phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên SEB. Trong nghiên cứu này, protein tái tổ hợp SEB được sử dụng làm kháng nguyên gây miễn dịch cho chuột để sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên SEB của *S. aureus*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Protein tái tổ hợp sạch SEB dạng đột biến loại độc tính do Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

Chuột BALB/c thuần chủng và tế bào Myeloma Sp2/0 do Khoa thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Dung dịch PBS 1x, Tween 20 (Sigma, Mỹ).

HRP conjugated anti-Mouse, kháng nguyên Staphylococcal enterotoxin, TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), HCL 1M, Bicarbonate, Bovine Serum Albumin (BSA).

Phương pháp

Gây miễn dịch cho chuột

Chuột được gây miễn dịch bằng phương pháp tiêm vào gan bàn chân. Kháng nguyên được dùng để gây miễn dịch cho chuột là protein tái tổ hợp SEB tinh khiết. Kháng nguyên được trộn với chất bổ trợ là Freund's complete adjuvants và Freund's incomplete adjuvants (Invitrogen). Chuột được gây miễn dịch 3 lần, mỗi lần cách nhau 3 ngày. Ngày thứ 10 kể từ khi gây miễn dịch, chuột được giết và thu tế bào lympho B ở lách, ở hạch bẹn và được sử dụng để dung hợp với tế bào Myeloma Sp2/0.

Tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng

Quy trình tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng được thực hiện theo phương pháp của Köhler và Milstein (Köhler, Milstein, 1975). Cụ thể, tế bào Myeloma Sp 2/0 và tế bào lympho B được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:10, sau đó ly tâm tế bào ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút và thu cặn tế bào. Nhỏ 0,3 ml dung dịch PEG 50% (M.W. 1450; Sigma) vào cặn tế bào và ủ 60 giây ở nhiệt độ phòng, sau đó bổ sung tiếp 10 ml môi trường tế bào DMEM (Invitrogen) vào, ly tâm tế bào ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút và thu cặn tế bào. Sau khi loại bỏ dịch nổi và hoàn nguyên cặn tế bào trong môi trường chọn lọc DMEM có bổ sung hypoxanthine aminopterin thymidine - HAT, 150 µl dung dịch tế bào sẽ được đưa vào mỗi giếng trên đĩa 96 giếng và ủ trong tủ ấm 37°C. Sau 10 ngày, loại bỏ dịch nuôi cấy tế bào và thêm vào mỗi giếng 150 µl môi trường chọn lọc DMEM có bổ sung hypoxanthine thymidine - HT. Sau 2-4 ngày, tiến hành kiểm tra khả năng tiết kháng thể đơn dòng của các dòng tế bào lai bằng phản ứng ELISA và Western blot để sàng lọc các tế bào dương tính.

Tách dòng (cloning) tế bào lai hybridoma

Các tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng được tách dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn và chọn giếng trong đĩa nuôi cấy tế bào có chứa tế bào lai (hybridoma) cho kết quả ELISA dương tính cao nhất. Sau đó, tế bào lai được pha loãng để đạt 1 tế bào/100 µl/giếng, nuôi cấy tế bào ở 37°C với 5% CO₂. Kiểm tra lại khả năng sinh kháng thể đơn dòng bằng phản ứng ELISA. Chọn ra dòng tế bào có hiệu giá kháng thể cao nhất, nhân lên với lượng lớn để bảo quản hoặc tiêm vào ổ bụng chuột, thu dịch báng.

Phương pháp ELISA để sàng lọc dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng

Nguyên tắc của phương pháp ELISA là kháng thể đơn dòng đặc hiệu sẽ kết hợp với kháng nguyên là protein tái tổ hợp SEB. Sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể này sẽ được phát hiện thông qua một kháng thể cộng hợp đặc hiệu loài gắn enzyme và một cơ chất hiện màu. Các bước tiến hành như sau: gắn đĩa ELISA với 100 µl kháng nguyên là protein tái tổ hợp SEB qua đêm ở nồng độ thích hợp. Rửa đĩa ELISA đã được gắn kháng nguyên bằng dung dịch rửa (PBS + 0,05% Tween 20) để loại bỏ những kháng nguyên không gắn vào bề mặt bán. Che chắn đĩa ELISA bằng 300 µl dung dịch rửa có bổ sung 5% sữa gầy; ủ đĩa ELISA trong 1 h ở 37°C; rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Cho kháng thể đơn dòng (là dịch nuôi cấy tế bào lai tiết kháng thể) vào 100 µl/giếng; ủ

đĩa ELISA ở 37°C trong 1 h; rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Cho 100 µl/giếng kháng thể cộng hợp (Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG, Invitrogen) đặc hiệu loài gắn enzyme vào, ủ đĩa ELISA ở 37°C trong 1 h; rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Cho 100 µl/giếng dung dịch cơ chất hiện màu TMB, ủ đĩa ELISA ở 37°C trong 10 phút, dùng phản ứng bằng cách bổ sung 50 µl H₂SO₄ 1N vào. Đo giá trị OD₄₅₀ (mật độ quang học) bằng đọc ELISA và đánh giá kết quả. Theo kinh nghiệm những giếng có giá trị OD ≥ 0,5 được coi là dương tính, tức là có mặt của kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên SEB.

Phương pháp Western blot

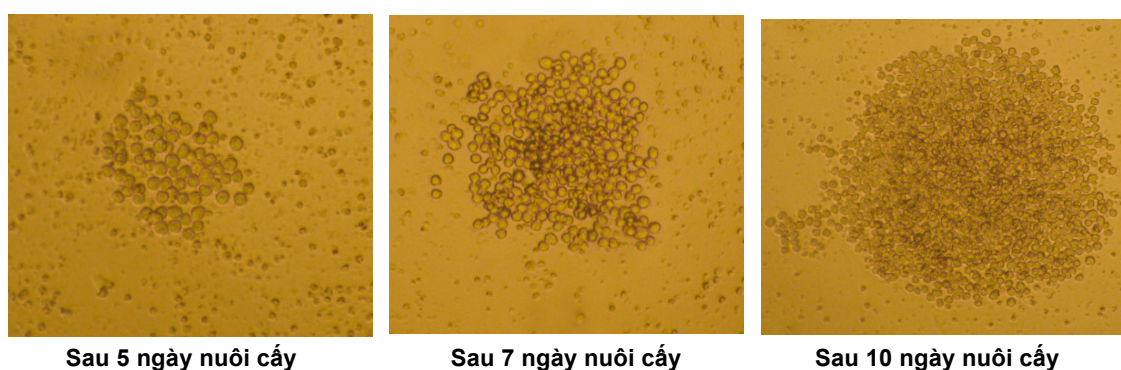
Được thực hiện theo phương pháp của Daniel (Daniel *et al.*, 1996), cụ thể là protein tái tổ hợp SEB sau khi chạy điện di trên gel polyacrylamide 12% được chuyển sang màng PVDF. Quá trình chuyển màng được thực hiện ở 4°C, trong 2 h, hiệu điện thế 100 V. Màng PVDF này được ủ với kháng thể 1 trong 3 h, sau đó được nhuộm tiếp với kháng thể 2

gắn enzym cộng hợp kháng thể pha loãng 10.000 lần trong 5% sữa gầy, lắc trong 2-3 h. Cuối cùng, màng được ngâm trong dung dịch hiện màu trong điều kiện không có ánh sáng đến khi quan sát thấy các băng màu hiện rõ ràng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc các tế bào lai hybridoma tiết kháng thể đơn dòng bằng phản ứng ELISA

Để tạo được dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng độc tố SEB, chúng tôi tiến hành lai tế bào Myeloma Sp2/0 với tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên. Sau khi tiến hành dung hợp 2 loại tế bào này, nuôi cấy trên môi trường chọn lọc HAT và HT, chúng tôi tiến hành kiểm tra toàn bộ số giếng dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10 x 20 và đánh dấu những giếng có tế bào lai. Hình 1 là ảnh tế bào lai hybridoma thu được ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau.



Hình 1. Tế bào lai hybridoma ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau.

Bảng 1. Kết quả lai (fusion) giữa tế bào Myeloma Sp2/0 và tế bào lympho B của chuột BALB/c được gây miễn dịch với protein tái tổ hợp SEB.

Lần lai (fusion)	Số lượng tế bào dùng để lai		Số đĩa nuôi cấy tế bào dùng (đĩa 96 giếng)	Tổng số giếng nuôi cấy tế bào	Tổng số giếng có tế bào lai	Tỷ lệ % số giếng có tế bào lai/giếng nuôi cấy tế bào
	Tế bào Myeloma	Tế bào lympho B				
1	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	8	768	720	93,75
2	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	8	768	680	88,54
3	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	8	768	739	96,22
4	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	8	768	744	96,87

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành 4 đợt thí nghiệm khác nhau để sản xuất tế bào lai hybridoma tiết kháng thể đơn dòng. Mỗi đợt thí nghiệm, sau khi lai giữa tế bào Myeloma Sp2/0 và tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên, chúng tôi tiến hành nuôi cấy tế bào trên 8 đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng và kết quả được trình bày trong bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ lai tạo thành công tế bào lai là rất cao, tỷ lệ các giếng nuôi cấy có tế bào lai dao động từ 88,54-96,87%. Cụ thể, ở lần lai thứ nhất có 720/768 giếng nuôi cấy tế bào có tế bào lai, đạt 93,75%; lần lai thứ hai có 680/768 giếng có tế bào lai, đạt 88,54%; lần lai thứ ba có 739/768 giếng có tế bào lai, đạt 96,22% và ở lần lai thứ tư cho kết quả cao nhất với 744/768 giếng có tế bào lai, đạt 96,87%.

Để sàng lọc được các dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng mong muốn, dịch nuôi cấy tế bào của tất cả các giếng có tế bào lai đã được thu nhận và dùng cho phản ứng ELISA. Trong nghiên cứu này, kháng nguyên dùng để gây miễn dịch cho chuột cũng như dùng để gắn bản ELISA (200 ng/giếng) là protein tái tổ hợp SEB được biểu hiện trong hệ *E. coli*. Mặc dù protein tái tổ hợp SEB đã được tinh chế trước khi sử dụng, nhưng tỷ lệ protein có nguồn gốc từ *E. coli* còn sót lại là rất lớn. Điều này cũng có nghĩa là sẽ có 3 khả năng xảy ra đối với tế bào lai được sinh ra, bao gồm: (1) tế bào lai được tạo ra

nhưng không tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu, (2) tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên SEB và (3) tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho protein có nguồn gốc từ *E. coli*. Để sàng lọc và thu nhận được đúng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên SEB, hai loại kháng nguyên là protein tái tổ hợp SEB và vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 đã được sử dụng một cách riêng rẽ để gắn bản ELISA. Kết quả sàng lọc tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng bằng phản ứng ELISA được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, ở lần lai thứ nhất có 15/720 giếng (2,08%) và lần lai thứ 3 có 25/739 giếng (3,38%) đều cho kết quả ELISA dương tính khi sử dụng hai loại kháng nguyên gắn bản riêng rẽ là protein tái tổ hợp SEB được biểu hiện trong hệ *E. coli* chủng BL21 và vi khuẩn *E. coli* chủng BL21. Từ kết quả này cho thấy, mặc dù protein tái tổ hợp SEB đã được tinh chế trước khi dùng nhưng protein của vi khuẩn *E. coli* vẫn còn sót lại và chưa được loại bỏ hoàn toàn, điều này cũng có nghĩa là kháng nguyên protein tái tổ hợp SEB đã được tinh chế dùng để gây miễn dịch cho chuột BALB/c để sản xuất kháng thể đơn dòng có lẫn cả kháng nguyên là protein của vi khuẩn *E. coli* còn sót lại và kháng thể đơn dòng được tạo ra cho kết quả ELISA dương tính với cả 2 loại kháng nguyên gắn bản là kháng thể đặc hiệu cho protein của vi khuẩn *E. coli*.

Bảng 2. Kết quả sàng lọc tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên SEB bằng phản ứng ELISA.

Lần lai	Tổng số giếng kiểm tra	Kết quả phản ứng ELISA					
		Sử dụng kháng nguyên gắn bản là protein tái tổ hợp SEB được biểu hiện từ vi khuẩn <i>E. coli</i> chủng BL21		Sử dụng kháng nguyên gắn bản là vi khuẩn <i>E. coli</i> chủng BL21		Số giếng cho kết quả dương tính với kháng nguyên SEB, âm tính với vi khuẩn <i>E. coli</i> chủng BL21	
		Số giếng dương tính	Tỷ lệ %	Số giếng dương tính	Tỷ lệ %	Số giếng dương tính	Tỷ lệ %
1	720	15	2,08	15	2,08	0	0
2	680	18	2,64	17	2,5	1 (5A3)*	0,15
3	739	25	3,38	25	3,38	0	0
4	744	23	3,09	22	2,95	1 (8F11)*	0,13

Ghi chú: *5A3 và 8F11 là ký hiệu tên của 2 dòng tế bào lai cho kết quả dương tính với kháng nguyên SEB, âm tính với *E. coli* chủng BL21.

Đối với lần lai thứ 2, có 18/680 giếng (2,64%) cho kết quả ELISA dương tính với kháng nguyên gắn bản là protein tái tổ hợp SEB, trong khi chỉ có 17/680 giếng (2,5%) cho kết quả ELISA dương tính với kháng nguyên gắn bản là vi khuẩn *E. coli*, điều

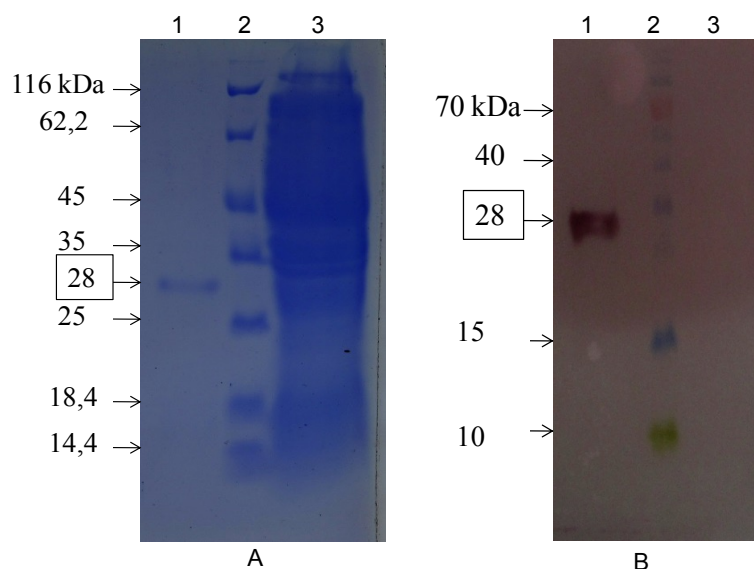
này cũng có nghĩa là trong số 18 giếng cho kết quả ELISA dương tính thì có 17 giếng (94,44%) có kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên là protein của vi khuẩn *E. coli* và chỉ có 1 giếng (5,56%) có kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng

nguyên là SEB mà không bắt cặp chéo với kháng nguyên là vi khuẩn *E. coli*. Tương tự, ở lần lai thứ 4 có 23/744 giếng (3,09%) cho kết quả ELISA dương tính với kháng nguyên gắn bản là protein tái tổ hợp SEB, trong khi chỉ có 22/744 giếng (2,95%) cho kết quả ELISA dương tính với kháng nguyên gắn bản là vi khuẩn *E. coli*. Điều này cho thấy, trong số 23 giếng cho kết quả ELISA dương tính thì có 22 giếng (95,65%) có kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên là protein của vi khuẩn *E. coli* và chỉ có 1 giếng (4,35%) có kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên là SEB mà không bắt cặp chéo với kháng nguyên là vi khuẩn *E. coli*. Như vậy, sau 4 lần lai, chúng tôi đã lai tạo thành công 2 dòng tế bào lai hybridoma (ký hiệu là 5A3 và 8F11) tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho protein kháng nguyên SEB.

Western blot

Kháng nguyên dùng để gây miễn dịch cho chuột BALB/c để sản xuất kháng thể đơn dòng cũng như dùng để gắn bản ELISA để sàng lọc kháng thể đơn dòng là protein tái tổ hợp SEB được biểu hiện trong hệ vi khuẩn *E. coli* chủng BL21.

Protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện ra đã được tinh chế và kiểm tra trên gel SDS-PAGE. Kết quả chạy điện di trên gel SDS-PAGE chỉ nhìn thấy có một băng protein duy nhất trên gel SDS-PAGE với kích thước như dự kiến là 28 kDa (Hình 2A). Để kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu của kháng thể đơn dòng được tạo ra với kháng nguyên là protein tái tổ hợp SEB, phản ứng Western Blot đã được sử dụng. Trong phản ứng Western Blot, ngoài protein tái tổ hợp SEB, vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 không mang gen SEB cũng như không mang protein tái tổ hợp SEB được sử dụng đồng thời để kiểm tra xem có hay không sự bắt cặp chéo của kháng thể đơn dòng được tạo ra với vi khuẩn *E. coli* chủng BL21. Kết quả thu được từ phản ứng Western blot (Hình 2B) cho thấy, kháng thể đơn dòng tạo ra chỉ bắt cặp đặc hiệu với kháng nguyên là protein tái tổ hợp SEB mà không bắt cặp chéo với kháng nguyên là vi khuẩn *E. coli* chủng BL21. Kích thước băng protein phản ứng với kháng thể đơn dòng là khoảng 28 kDa (hình 2B), đúng như dự kiến và đúng với kích thước băng protein tái tổ hợp SEB thu được sau khi tinh chế và chạy trên gel SDS-PAGE (Hình 2A).



Hình 2. Kết quả chạy điện di protein trên gel SDS-PAGE (A) và phản ứng Western blot (B) để kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu của kháng thể đơn dòng được tạo ra (dòng 8F11) với kháng nguyên là protein tái tổ hợp SEB. 1: Protein tái tổ hợp SEB tinh sạch; 2A: Protein chuẩn (Fermentas, Mỹ); 2B: Protein chuẩn có màu (Fermentas, Mỹ); 3: protein của vi khuẩn *E. coli* chủng BL21.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã sản xuất thành công kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho độc tố SEB có nguồn gốc từ *Staphylococcus aureus*. Kết quả này sẽ là cơ sở vững

chắc để chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố SEB dựa trên cơ sở sắc ký miễn dịch.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện từ trong khuôn khổ của đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu

ché tạo que thử phát hiện nhanh độc tố Staphylococcal enterotoxin B (SEB) của tụ cầu vàng" mã số KC.04.14/11-15. Chúng tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Jones CL, Khan SA (1986) Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 166(1): 29-33.

Kijek TM, Rossi CA, Moss D, Parker RW, Henchal EA (2000) Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of Staphylococcal Enterotoxin B. *J Immunol Methods* 236(1-2): 9-17.

Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2: 630-676.

Stiles BG, Garza AR, Ulrich RG, Boles JW (2001) Mucosal vaccination with recombinantly attenuated staphylococcal enterotoxin B and protection in a murine model. *Infect Immun* 69: 2031-2036.

Da Cunha M, Calsolari RA, Junior JP (2007) Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol* 51: 381-390.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Daniel MB, Michael DR, Stuart JE (1996) Protein Methods, 2nd edn. New York: Wiley-Liss Inc.

SCREENING OF HYBRIDOMA CELL LINES SECRETING MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) DERIVED FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Nghiêm Ngọc Minh^{1,✉}, Nguyễn Thị Hoài Thu², Phạm Thủy Linh², Than Đức Dương³, Vũ Thị Thu Hằng³, Lê Văn Phan⁴

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Rural Technology Development Joint Stock Company

⁴Vietnam National University of Agriculture

SUMMARY

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) produces 11 types of toxins and more than 20 different Staphylococcal enterotoxins (SEs), including SEA to SEE, SEG to SER and SEU. Among them, enterotoxin type B (Staphylococcal enterotoxin B - SEB) is quite heat stable and causes gastrointestinal diseases in food poisoning. The symptoms of SEB intoxication begin with the onset of sudden fever, about 40°C to 41°C, chills, headache, muscle aches and dry cough. Some patients feel shortness of breath and chest pain. Although SEB is not considered lethal, high level of exposure can lead to shock and death. Therefore, a nontoxic SEB recombinant antigen was produced to immunize mice to create B lymphocytes. Myeloma cells were fused with the B lymphocytes to generate hybridoma lines. The screening of monoclonal antibodies for the SEB antigen was determined by ELISA and Western blot tests. This study demonstrates that an SEB recombinant antigen can immunize a response against SEB in BALB/c mice. The production of monoclonal antibodies will be used to make a rapid detection strip for SEB based on immunochromatography.

Keywords: ELISA, hybridoma line, monoclonal antibody, SEB recombinant antigen, Western blot

✉ Author for correspondence: Tel: +84-988886930; E-mail: nghieminh@igr.ac.vn