



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027803

(51)⁷ C12Q 1/70

(13) B

(21) 1-2012-03493

(22) 23/11/2012

(30) 100142951 23/11/2011 TW

(45) 25/03/2021 396

(43) 27/05/2013 302A

(73) NATIONAL CHENG KUNG UNIVERSITY (TW)

No. 1, Ta-Hsueh Road, Tainan City, Taiwan

(72) Trai-Ming YEH (TW); Yung-Chun CHUANG (TW); Shi-Wei LIN (TW).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN TRƯỜNG HỢP NHIỄM VIRUT FLAVIVIRIDAE

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae bao gồm các bước chuẩn bị mẫu sinh học chứa phức hợp bao gồm ít nhất hai protein, protein phi cấu trúc 1 và thrombin hoặc protein phi cấu trúc 1 và prothrombin, chuẩn bị kháng thể bắt giữ gắn kết với một trong hai protein này, chuẩn bị kháng thể phát hiện gắn kết với protein còn lại trong hai protein này và xác định trường hợp nhiễm virus bằng kết quả phản ứng của kháng thể bắt giữ khi cả hai kháng thể gắn với phức hợp. Sáng chế cũng đề cập đến một phương pháp khác để phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus, đặc biệt là phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các virus thuộc họ Flaviviridae gây bệnh viêm não, sốt Dengue và các bệnh nhiễm trùng toàn thân khác ảnh hưởng lớn đến sức khỏe cộng đồng, luôn là đối tượng mà các chuyên gia lo ngại và lưu tâm. Virus Dengue (Dengue virus - DENV) thuộc họ Flaviviridae, chi *flavivirus*, có thể được chia thành bốn kiểu huyết thanh gồm DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 theo sự khác biệt về kháng nguyên của chúng.

Bệnh sốt xuất huyết Dengue / hội chứng sốc Dengue, (DHF / DSS) hoặc sốt Dengue (Dengue Fever - DF) và các triệu chứng khác sẽ xuất hiện khi cơ thể bị nhiễm virus Dengue. Triệu chứng lâm sàng của sốt xuất huyết Dengue / hội chứng sốc Dengue bao gồm mất dịch cơ thể, tăng hematocrit, giảm tiểu cầu, và sốc do giảm lưu lượng máu. Mặc dù nguyên nhân sinh bệnh học của sốt xuất huyết Dengue / hội chứng sốc Dengue vẫn chưa được biết, nhưng có nhiều bằng chứng cho thấy việc chảy máu và giảm tiểu cầu của bệnh nhân DHF có liên quan đến tình trạng giảm tiểu cầu trong máu, thiếu hụt các yếu tố của hệ thống đông máu và tổn thương hệ thống biểu mô.

Virus Dengue chứa khoảng 1100 cặp bazơ chủ yếu mã hóa ba protein cấu trúc: protein vỏ C, protein màng M, protein áo ngoài (Mantle protein) E, cũng như bảy protein phi cấu trúc khác: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4A, NS4b và NS5. Theo các nghiên cứu hiện nay, NS1 không chỉ là protein quan trọng trong cơ chế nhiễm virus Dengue, mà còn có liên quan mật thiết với các triệu chứng do virus dengue gây ra, chẳng hạn DHF.

NS1 là protein đã glycosyl hóa, có kích thước 46 ~ 50 kDa. Protein NS1 loại có liên quan đến màng và loại tiết trong mô của động vật có vú bị nhiễm luôn được tìm thấy. Do đó, việc phát hiện xem protein NS1 có tồn tại trong cơ thể bệnh nhân hay không là cách thức khá hiệu quả để phát hiện xem bệnh nhân đó có bị nhiễm virus Dengue hay không.

Tất cả các kỹ thuật hoặc bộ kit phát hiện trường hợp nhiễm virus *Dengue* có trên thị trường đều chỉ phụ thuộc vào tính đặc hiệu của kháng thể kháng NS1 và phương pháp miễn dịch. Tuy nhiên, kỹ thuật thông thường, cho dù đó là tách virus khỏi cơ thể bệnh nhân hay RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction - phản ứng chuỗi polymeraza-phiên mã ngược) để xác định loại virus nhiễm đều cực kỳ tốn thời gian, chi phí cao, và phụ thuộc nhiều vào thiết bị thí nghiệm, vì vậy phạm vi ứng dụng rất hẹp.

Ngoài ra, phương pháp phát hiện nêu trên cần phải được thực hiện trong các điều kiện môi trường nghiêm ngặt để tránh gây nhiễm vô ý ở mức độ nhỏ ảnh hưởng đến các kết quả chẩn đoán. Quan trọng hơn, các phương pháp phát hiện NS1 nêu trên đều thiếu tính nhạy và không thể cung cấp kết quả thử nghiệm với độ chính xác cao đối với các nhiễm trùng sớm hoặc nhẹ, từ đó dẫn đến các hậu quả nghiêm trọng chẳng hạn chẩn đoán sai hoặc chậm bắt đầu quá trình điều trị.

Do đó, việc đề xuất phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae (bao gồm *virus dengue*) có độ nhạy và độ chính xác cao trở thành một trong các mục tiêu quan trọng trong lĩnh vực y học và y tế công cộng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục các vấn đề trên, một mục đích của sáng chế này là đề xuất phương pháp phát hiện virus Flaviviridae có độ nhạy cao, độ chính xác cao và nhanh chóng, đặc biệt tập trung vào phương pháp phát hiện virus *Dengue*.

Protein phi cấu trúc 1 (NS1) thường xuất hiện trong cơ thể sinh vật hoặc các tế bào bị nhiễm virus Flaviviridae. Ngoài ra, phần lớn protein NS1 sẽ kết hợp với các yếu tố đông máu trong máu như thrombin hoặc prothrombin như được xác nhận trong sáng chế này. Do đó, việc phát hiện tổ hợp của NS1 và thrombin, hoặc tổ hợp của NS1 và prothrombin trong cơ thể bệnh nhân sẽ là phương pháp hiệu quả để phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae. Nghĩa là, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae qua tổ hợp của NS1 và thrombin hoặc của NS1 và prothrombin.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae, bao gồm: chuẩn bị thrombin hoặc prothrombin để tạo ra phức hợp chứa ít nhất hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và thrombin, hoặc hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và prothrombin; chuẩn bị kháng thể bắt giữ gắn kết với một trong hai protein này; chuẩn

bị kháng thể phát hiện gắn kết với protein còn lại trong hai protein này; và xác định kết quả phản ứng của kháng thể phát hiện khi cả kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện gắn với phức hợp.

Sáng chế đề xuất phương pháp khác để phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae, bao gồm: chuẩn bị mẫu sinh học chứa phức hợp, phức hợp này bao gồm ít nhất hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và thrombin, hoặc hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và prothrombin; chuẩn bị kháng thể bắt giữ gắn kết với một trong hai protein này; chuẩn bị kháng thể phát hiện gắn kết với protein còn lại trong hai protein này; và xác định kết quả phản ứng của kháng thể phát hiện khi cả kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện gắn với phức hợp.

Theo một trong các phương án của sáng chế, protein phi cấu trúc 1 và thrombin hoặc protein phi cấu trúc 1 và prothrombin được gài vào nhau.

Theo một trong các phương án của sáng chế, mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật có vú.

Theo một trong các phương án của sáng chế, mẫu sinh học có nguồn gốc từ người. Theo một trong các phương án, protein phi cấu trúc là protein chế tiết hoặc annexin.

Theo một trong các phương án của sáng chế, kháng thể bắt giữ là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.

Theo một trong các phương án của sáng chế, kháng thể phát hiện là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “virus Flaviviridae” là virus biểu hiện chủ yếu protein phi cấu trúc 1 (NS1); tốt hơn là, chi Flavivirus và chi virus Pestivims; tốt hơn nữa là, Flavivirus, như virus sốt vàng da hoặc virus Dengue (DENV). Theo một trong các phương án, virus Flaviviridae là virus Dengue, và bao gồm các kiểu huyết thanh khác nhau như DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Theo sáng chế, thuật ngữ “sinh học” trong mẫu sinh học chủ yếu bao gồm động vật chủ có thể bị nhiễm virus Flaviviridae, tốt hơn là bao gồm động vật có vú, như người, khỉ, chuột, gia súc, cừu, chó, mèo, hoặc lợn. Theo một trong các phương án, sinh vật này là người.

Theo sáng chế, thuật ngữ “mẫu sinh học” có thể có dạng bất kỳ, chủ yếu là vật thể bất kỳ có thể bị ảnh hưởng bởi virus Flaviviridae trong cá thể, đặc biệt bao gồm máu, huyết tương, nước tiểu, hoặc bạch huyết v.v., hoặc mô hoặc các tế bào xung quanh mà

máu, huyết tương, nước tiểu, hoặc bạch huyết chảy qua. Tốt hơn là, các mẫu sinh học bao gồm các tế bào có thể bị nhiễm virus Flaviviridae, ít nhất bao gồm tế bào thần kinh, tế bào cơ, tế bào gan, tế bào nội mô, tế bào máu, hoặc tế bào limphô; tốt hơn là, mẫu sinh học bao gồm tế bào nội mô hoặc tế bào máu của động vật có vú. Các mẫu sinh học có thể là mẫu tươi, được nuôi cấy mô, hoặc được làm lạnh hoặc đông lạnh. Ngoài ra, mẫu sinh học còn có thể được đánh giá tỷ lệ nồng độ của hai protein NS1 và thrombin hoặc NS1 và prothrombin bằng cách tinh chế, ly tâm, chiết, cô đặc, v.v..

Tóm lại, phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae được đề xuất theo sáng chế là phương pháp gắn kết kháng thể trong các mẫu sinh học bao gồm phức hợp hai protein NS1 và thrombin, hoặc NS1 và prothrombin. Ngoài ra, so sánh với giải pháp kỹ thuật đã biết sử dụng NS1 làm đích phát hiện duy nhất, phương pháp phát hiện theo sáng chế là phương pháp có độ nhạy và độ chính xác cao hơn trong việc phát hiện virus Flavivirus.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae theo sáng chế;

Fig. 2 là sơ đồ thể hiện phương pháp khác để phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae theo sáng chế;

Fig. 3 thể hiện số liệu về tổ hợp của rNS1 với thrombin hoặc với prothrombin theo một trong các phương án;

Fig. 4A là bảng số liệu thống kê về thử nghiệm với tổ hợp NS1-thrombin và NS1 không gắn kết trong huyết thanh đo bằng phương pháp theo sáng chế.

Fig. 4B là bảng số liệu thống kê về thử nghiệm trên huyết thanh của bệnh nhân bị nhiễm virus dengue đo bằng phương pháp theo sáng chế và bằng bộ kit Platelia TM Dengue NS1 Ag ELISA có trên thị trường.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một trong các phương pháp có độ nhạy và độ chính xác cao để phát hiện virus Flaviviridae theo sáng chế được mô tả dưới đây dựa trên các Fig. liên quan.

Các bước của phương pháp phát hiện virus Flaviviridae theo sáng chế thể hiện trên Fig. 1 bao gồm: chuẩn bị mẫu sinh học chứa phức hợp, phức hợp này bao gồm ít nhất hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và thrombin, hoặc hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và prothrombin; chuẩn bị mẫu sinh học chứa phức hợp, phức hợp này bao gồm ít nhất hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và thrombin, hoặc hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và prothrombin (Bước S11); chuẩn bị kháng thể bắt giữ gắn kết với một trong hai protein này (Bước S12); chuẩn bị kháng thể phát hiện gắn kết với protein còn lại trong hai protein này (Bước S13); và xác định kết quả phản ứng của kháng thể phát hiện khi cả kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện gắn với phức hợp (Bước S14).

Ở bước S11 của phương án này, mẫu sinh học được lấy từ cá thể bị nghi ngờ nhiễm virus Flaviviridae, mẫu sinh học này chứa phức hợp nếu cá thể đúng là bị nhiễm virus, trong đó phức hợp này chứa ít nhất hai protein, có thể là NS1 và thrombin, hoặc NS1 và prothrombin. Theo phương án này, hai protein trong phức hợp là khớp với nhau, nghĩa là cả hai cấu trúc có thể kết hợp với nhau hoặc có các phần được gắn kết đồng hóa trị. Trong khi theo các phương án khác, nhưng không giới hạn ở đó, hai protein cũng có thể được gắn kết gián tiếp qua các phân tử khác. Các phân tử của phức hợp này có thể là NS1 và thrombin cũng như NS1 và prothrombin, và số lượng các phân tử là không giới hạn không phụ thuộc vào số lượng của NS1, thrombin, hoặc prothrombin, vì vậy phức hợp này có thể gồm một NS1 với hai thrombin hoặc với hai prothrombin, hoặc gồm hai hoặc nhiều NS1 được kết hợp với thrombin hoặc với prothrombin. Tất cả những điều được mô tả này không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Theo phương án này, mẫu sinh học là huyết thanh của người, và đồng thời có chứa nhiều phức hợp, một số trong chúng chứa NS1 và thrombin, một số chứa NS1 và prothrombin. Ngoài ra, cần lưu ý rằng NS1 không bị giới hạn ở dạng của nó, nó có thể có dạng chế tiết trong đó protein được tiết ra ngoại bào, hoặc dạng liên quan đến màng trong đó protein được kết hợp với màng bề mặt tế bào vật chủ, ngoài ra, NS1 có thể là dạng không cải biến sau dịch mã, hoặc có cải biến sau dịch mã như dạng được glycosyl hóa, hoặc phosphoryl hóa. Tất cả những điều được mô tả này không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Tiếp theo, phương pháp phát hiện này bao gồm bước chuẩn bị kháng thể bắt giữ (được thể hiện ở bước S12 trên Fig. 1), và kháng thể phát hiện (được thể hiện ở bước S13 trên Fig. 1) và lần lượt kết hợp chúng với phức hợp gồm NS1 và thrombin. Nghĩa là, kháng thể bắt giữ sẽ kết hợp với một trong hai protein trong phức hợp, và kháng thể phát hiện sẽ kết hợp với protein kia. Tiến hành tương tự khi phức hợp gồm NS1 và prothrombin.

Kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện có thể là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng, trong ví dụ thử nghiệm theo sáng chế, hầu hết trong chúng là kháng thể đa dòng. Để tạo thuận lợi cho việc tiến hành phát hiện, kháng thể bắt giữ được cố định trước trên chất nền rắn, như chất nền được chế tạo từ nilông, polystyren, polyvinyl clorua (GB 5023.7-1997) hoặc nitroxenluloza, poly vinyliden florua (PVDF), và chất nền này có thể có các dạng khác nhau, như tấm có lỗ, cột, hoặc băng thử. Tuy nhiên, không bị giới hạn ở chỗ kháng thể bắt giữ có thể được kết hợp với mẫu sinh học ở dạng huyền phù, khi đó việc lựa chọn chỉ phụ thuộc vào phương pháp tách kháng thể bắt giữ được gắn kết và không được gắn kết với phức hợp sau đó, và cũng phụ thuộc vào tính thuận tiện của thao tác của người dùng. Tất cả những điều được mô tả này không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Theo phương án thực hiện này, tốt hơn là mẫu sinh học trước tiên được kết hợp với kháng thể bắt giữ, và sau đó bổ sung kháng thể phát hiện vào để phản ứng. Cụ thể, theo phương án thực hiện này, kháng thể bắt giữ là kháng thể kháng NS1, và kháng thể phát hiện là kháng thể kháng thrombin hoặc kháng prothrombin. Khi mẫu sinh học được bổ sung vào chất nền đã cố định kháng thể bắt giữ, trước tiên kháng thể bắt giữ sẽ gắn kết đặc hiệu với NS1, và sau đó kháng thể phát hiện được bổ sung, được kết hợp với thrombin hoặc prothrombin. Tất nhiên, kháng thể bắt giữ theo sáng chế cũng có thể gặp kháng thể kháng thrombin hoặc kháng prothrombin, ba protein này có thể đồng thời được kết hợp cùng với nhau khi kháng thể bắt giữ là kháng thể kháng NS1, hoặc khi thực hiện trong huyền phù.

Để tạo thuận lợi cho việc phát hiện và phân tích sau đó, kháng thể phát hiện tốt hơn là được kết hợp với một chất khác có chức năng nhận biết, ví dụ, ở dạng tiếp hợp với enzym có thể tạo huỳnh quang hoặc phát quang khi phản ứng với chất nền, như enzym luxiferaza của đom đóm, enzym phát quang của vi khuẩn, phosphataza kiềm, catalaza, peroxidaza củ cải ngựa (HRP), enzym β -galactosidaza, uricaza, hoặc sữa, hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang và các chỉ dấu như floresxein isothioxynat (FITC), 5-carboxyfloresxein, 6-carboxyfloresxein, các anthoxyanin (anthoxyanin) hoặc

phycoerytrin, hoặc rodamin v.v., hoặc các chất đồng vị phóng xạ để phát hiện bằng phóng xạ như H3, C11, C14, P32, S35, I123, I124, I125, I131, Tc111, hoặc Lu177 v.v., hoặc các phân tử bất giữ đã gắn kết có thể được sử dụng như biotin, v.v.. Theo phương án thực hiện của sáng chế, có thể, nhưng không giới hạn ở, HRP được sử dụng ở dạng tiếp hợp để phát hiện kháng thể. Kỹ thuật tiếp hợp gắn kết kháng thể và phản ứng phát quang thường là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, vì vậy không cần mô tả ở đây. Tuy nhiên, kháng thể phát hiện có thể không ở dạng tiếp hợp, nhưng kết hợp với một kháng thể khác, gắn kết đặc hiệu với kháng thể phát hiện theo sáng chế, trong đó kháng thể này ở dạng tiếp hợp và là chất tạo tín hiệu. Khi kháng thể phát hiện được kết hợp với phức hợp, kháng thể này gắn với kháng thể phát hiện và được phân tích. Tất cả những điều được mô tả này không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ở bước S14, khi kháng thể bất giữ và kháng thể phát hiện được kết hợp với phức hợp, kết quả phát hiện có thể được xác định bằng phản ứng của kháng thể phát hiện. Cụ thể hơn, do chỉ kháng thể bất giữ được cố định trên chất nền, và kháng thể phát hiện được kết hợp với kháng thể bất giữ qua phức hợp, do đó, nếu đối tượng phát hiện không được chứa trong mẫu sinh học, tức là chứa phức hợp NS1 và thrombin, hoặc NS1 và prothrombin, thì sau bước loại bỏ sẽ không có tín hiệu có thể phát hiện được. Do đó, protein NS1 của virus Flaviviridae và mức độ nhiễm được xác định trong mẫu sinh học bằng cách xác định xem có tín hiệu được phát hiện hay không và cường độ tín hiệu để khẳng định cá thể có bị nhiễm virus Flaviviridae không.

Nguyên lý của sáng chế được mô tả trên đây có thể được áp dụng như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) hoặc phương pháp thấm điểm, tốt hơn là, như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzyme dạng kẹp (ELISA kẹp).

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp khác để phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae, được thể hiện trên Fig. 2, bao gồm các bước chuẩn bị mẫu sinh học chứa protein phi cấu trúc (Bước S21); chuẩn bị thrombin hoặc prothrombin để tạo ra phức hợp chứa ít nhất hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và thrombin, hoặc hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và prothrombin (Bước S22); chuẩn bị kháng thể bất giữ gắn kết với một trong hai protein này (Bước S23); chuẩn bị kháng thể phát hiện gắn kết với protein còn lại trong hai protein này (Bước S24); và (Bước S25).

Phương pháp phát hiện này phần lớn là giống với phương pháp phát hiện nêu trên

và có thể tham khảo phần mô tả chi tiết trên. Sự khác biệt của phương pháp này là ở chỗ, ở bước S21, mẫu sinh học chứa protein NS1, và protein NS1 có thể là protein ban đầu được kết hợp với thrombin hoặc prothrombin, hoặc có thể là protein độc lập với thrombin hoặc prothrombin.

Sau đó, ở bước S22, lượng dư tương đối của thrombin hoặc prothrombin được chuẩn bị, và NS1 ở dạng phức hợp với thrombin hoặc prothrombin là đối tượng phát hiện, vì vậy NS1 không gắn kết với thrombin hoặc prothrombin trong mẫu sinh học có thể được phát hiện một cách hiệu quả trong cơ thể hoặc làm tăng khả năng phát hiện phức hợp ban đầu. Ngoài ra, thrombin hoặc prothrombin này có thể được phân lập hoặc tinh chế từ sinh vật và cũng có thể là một vài protein chức năng được tạo ra bằng cách tổng hợp nhân tạo. Tất cả các kỹ thuật này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực.

Dưới đây, sáng chế đưa ra nhiều ví dụ về virus Dengue, trong đó mô tả phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae, và chứng minh sự cải thiện về độ nhạy và độ chính xác của phương pháp phát hiện này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Protein NS1 của virus Dengue có thể được kết hợp với thrombin hoặc prothrombin

Tạo ra NS1 tái tổ hợp (recombinant NS1 - rNS1)

Nhằm đích trên kiểu huyết thanh của virus Dengue typ II (chủng PL046), đoạn mỗi xuôi: CATATGGTGTCTACTAGTATT GGTGGG và đoạn mỗi ngược: CTCGAGTCCGGCTGTGACCAAGGA được khuếch đại trình tự ADN có chiều dài đầy đủ của NS1 và được gắn kết với vectơ pET-43.1a (+) (Novagen, Madison, WI) tạo thành plasmit tái tổ hợp. Sau đó, plasmit tái tổ hợp được chuyển sang E. coli (chủng Rosetta), và gây ra sự biểu hiện protein dung hợp rNS1 được đánh dấu bằng (His) 6 trong E. coli dưới tác dụng cảm ứng của isopropyl- β -D-thio-pyran-galactosidaza (IPTG) 1 mM. Sau đó, plasmit tái tổ hợp được tinh chế bằng gel agarosa (Sephacrose, GE Healthcare, Sweden, chelat coban clorua ở nồng độ 500 mM). Cuối cùng, sử dụng phương pháp BCA (axit bixinconinic) (Thermo Scientific, Rockford, IL) để định lượng nồng độ protein rNS1. Các chi tiết tiến hành khác của phương pháp nêu trên thường là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực vì vậy không cần đề cập đến ở đây.

Kiểm tra tổ hợp của rNS1 và thrombin hoặc prothrombin bằng ELISA

50 µl thrombin bò (2 đơn vị NIH/ml) (NIH - National Institute of Health - Viện y tế quốc gia), prothrombin (2 µg/ml), Haematologic Technologies (VT, USA), α -casein (10 µg/ml, sigma-Aldrich, CA, USA) chứa dung dịch đệm phủ cacbonat/bicacbonat (0,5 M, pH=9,6) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ (GeneDireX, Las Vegas, NV) và được đặt vào môi trường 4°C qua đêm và sau đó phong bế bằng albumin huyết thanh bò (1%, BSA) chứa dung dịch nước muối đệm phosphat (phosphate buffer saline - PBS). Protein NS1 tinh chế được kết hợp với biotin bằng bộ kit biotin hóa ImmunoProb™ (Sigma-Aldrich, CA, USA), và bổ sung rNS1 được biotin hóa tái tổ hợp với các nồng độ khác nhau vào các lỗ và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó bổ sung streptavidin-HRP được pha loãng 200 lần (R&D Systems, Minneapolis, MN). Cuối cùng, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) được sử dụng làm chất nền để đo màu trong 10 phút và ngừng bằng axit sulfuric 2N, sau đó đo hệ số hấp thụ ở 450 nm (OD450).

Kết quả được thể hiện trên Fig. 3, cho thấy so với α -casein, lỗ chứa thrombin và prothrombin thu được giá trị OD450 cao hơn. Điều này chứng tỏ rằng thrombin và prothrombin tạo thành tổ hợp với rNS1. Ngoài ra, cùng với mức tăng nồng độ rNS1, mức độ tạo thành tổ hợp của thrombin và prothrombin cũng tăng. Điều này chứng minh rằng rNS1 có thể được tạo thành tổ hợp với thrombin và prothrombin để tạo ra phức hợp.

Ví dụ 2: Thử nghiệm đánh giá độ nhạy của phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae theo sáng chế

Thu các mẫu thử nghiệm

Các mẫu huyết thanh từ 80 bệnh nhân bị nhiễm virus Dengue được thu lại, trong đó 32 bệnh nhân bị nhiễm DENV-2 và 48 bệnh nhân bị nhiễm DENV-3. 22 mẫu huyết thanh khác từ bệnh nhân bị bệnh viêm gan C (HCV) và 12 mẫu huyết thanh từ các cá thể khỏe mạnh được dùng làm nhóm đối chứng.

So sánh NS1 không gắn kết và phức hợp NS1-thrombin

55 µl thrombin bò (2 đơn vị NIH/ml) chứa hoặc 55 µl α -casein (10 µg/ml, sigma-Aldrich, CA, USA) chứa dung dịch đệm phủ cacbonat/bicacbonat (0,5 M, pH=9,6) được sử dụng làm nhóm đối chứng, và được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ (GeneDireX, Las Vegas, NV) và được đặt vào môi trường 4°C qua đêm và sau đó được phong bế bằng gelatin 0,25% chứa dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) trong 1 giờ, sau đó rửa bằng PBST ba lần.

Phức hợp NS1-thrombin của huyết thanh bệnh nhân được phát hiện bằng một phương pháp phát hiện khác theo sáng chế. Đĩa ELISA 96 lỗ được phủ kháng thể đa dòng kháng thrombin của thỏ (GeneTex, 2 µg/ml, San Antonio, TX), kháng thể này là kháng thể bất giữ. Sau đó, bổ sung huyết thanh nêu trên vào phản ứng. Sau đó, bổ sung huyết thanh kháng NS1 của chuột (được pha loãng 10000 lần) vào lỗ, và bổ sung peroxidaza củ cải ngựa được tiếp hợp kháng thể globulin miễn dịch G dê kháng chuột (được pha loãng 5000 lần, Zymed, San Francisco, CA) làm kháng thể phát hiện. Sau đó so màu và giải thích giống như ví dụ 1.

Huyết thanh của bệnh nhân bị nhiễm virus dengue và huyết thanh của nhóm đối chứng được pha loãng bằng PBST 10 lần, và sau đó bổ sung vào lỗ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường 37°C. Sau đó, bổ sung kháng thể đa dòng kháng NS1 của thỏ (được pha loãng 1000 lần, Genetex, San Antonio, TX) trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường 37°C. Sau đó, bổ sung peroxidaza củ cải ngựa được tiếp hợp kháng thể globulin miễn dịch G dê kháng thỏ (được pha loãng 5 000 lần, Zymed, San Francisco, CA) để phản ứng và rửa, sau đó bổ sung 50 µl 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) làm chất nền để so màu, và đọc giá trị OD450 bằng máy đọc đĩa vi thể VersaMax (Molecular Devices, Crawley, West Sussex, UK).

Kết quả thử nghiệm được phân tích thống kê, trong đó ngưỡng giá trị là dựa trên trung bình cộng giá trị thử nghiệm của huyết thanh của các cá thể khỏe mạnh $\pm 2SD$ (độ lệch chuẩn). Fig. 4A là bảng số liệu thống kê kết quả thu được với phức hợp NS1-thrombin và NS1 không gắn kết trong huyết thanh đo được bằng phương pháp theo sáng chế. Như được thể hiện trên Fig. 4A, khoảng 30% bệnh nhân bị nhiễm virus dengue có huyết thanh có thể được đánh giá bằng protein NS1 không gắn kết, tuy nhiên, có tới 78,8% bệnh nhân bị nhiễm virus dengue có huyết thanh có thể được đánh giá bằng phức hợp NS1-thrombin bằng phương pháp theo sáng chế, ngoài ra, chỉ ít hơn 18% bệnh nhân có huyết thanh không thể được phát hiện bằng protein NS1 không gắn kết và phức hợp NS1-thrombin.

So sánh kết quả thu được bằng phương pháp phát hiện theo sáng chế và bằng bộ kit có trên thị trường

Protein NS1 của 59 mẫu huyết thanh khác từ bệnh nhân bị nhiễm virus dengue được phát hiện bằng bộ kit Platelia™ Dengue NS1 Ag ELISA có trên thị trường (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France). Bộ kit này sử dụng phương pháp ELISA kẹp, đánh giá bằng kháng thể đơn dòng để bắt giữ NS1. Phương pháp phát hiện

theo sáng chế được mô tả như trên đây.

Fig. 4B là bảng số liệu thống kê về thử nghiệm trên huyết thanh của bệnh nhân bị nhiễm virus dengue được đánh giá bằng phương pháp theo sáng chế và bằng bộ kit Platelia TM Dengue NS1 Ag ELISA có trên thị trường. Trong đó tiêu chuẩn là trung bình cộng $\pm 2SD$ (độ lệch chuẩn) của các giá trị đo được thu được từ huyết thanh của các cá thể khỏe mạnh.

Các kết quả cho thấy rằng, trong huyết thanh của 59 bệnh nhân, xấp xỉ 80% huyết thanh của bệnh nhân bị nhiễm virus dengue có thể được phát hiện bằng phức hợp NS1-thrombin bằng phương pháp theo sáng chế; so với kết quả thu được từ bộ kit có trên thị trường, chỉ phát hiện được khoảng 42% bằng protein NS1 trong huyết thanh thu được từ bệnh nhân bị nhiễm virus dengue. Kết quả này cho thấy rằng phương pháp phát hiện theo sáng chế là nhạy và chính xác hơn so với kỹ thuật thông thường. (***) $P < 0,001$; ** biểu thị $P < 0,01$; * biểu thị $P < 0,05$ trên mỗi Fig.).

Tóm lại, phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae theo sáng chế được thực hiện bằng cách gắn kết kháng thể trong các mẫu sinh học bao gồm phức hợp hai protein NS1 và thrombin, hoặc NS1 và prothrombin. Ngoài việc phát hiện xem đối tượng có bị nhiễm flavivirus hay không, điều quan trọng hơn là so với phương pháp thông thường dùng NS1 làm đích phát hiện, phương pháp phát hiện theo sáng chế có độ nhạy và độ chính xác cao hơn.

Tuy sáng chế đã được mô tả bằng các phương án minh họa cụ thể và các ví dụ, cần hiểu rằng các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và các cải biến và biến đổi khác nhau có thể được chuyên gia trong lĩnh vực tạo ra mà không đi lệch khỏi ý tưởng và phạm vi của sáng chế như được nêu trong phần yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae, bao gồm các bước:

chuẩn bị mẫu sinh học chứa phức hợp, phức hợp này bao gồm ít nhất hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và thrombin, hoặc hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và prothrombin;

chuẩn bị kháng thể bắt giữ gắn kết với một trong hai protein này;

chuẩn bị kháng thể phát hiện gắn kết với protein còn lại trong hai protein này;

và

xác định kết quả phản ứng của kháng thể phát hiện khi cả kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện gắn với phức hợp.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein phi cấu trúc 1 và thrombin hoặc protein phi cấu trúc 1 và prothrombin được gài vào nhau.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó virus Flaviviridae thuộc chi *Flavivirus*.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó virus Flaviviridae là virus dengue.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật có vú.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu sinh học có nguồn gốc từ người.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein phi cấu trúc là protein chế tiết hoặc annexin.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng thể bắt giữ là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng thể phát hiện là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu sinh học là máu, nước tiểu hoặc bạch huyết.

11. Phương pháp phát hiện trường hợp nhiễm virus Flaviviridae, bao gồm các bước:

chuẩn bị mẫu sinh học chứa protein phi cấu trúc 1;

chuẩn bị thrombin hoặc prothrombin để tạo ra phức hợp chứa ít nhất hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và thrombin, hoặc hai protein gồm protein phi cấu trúc 1 và prothrombin;

chuẩn bị kháng thể bắt giữ gắn kết với một trong hai protein này;

chuẩn bị kháng thể phát hiện gắn kết với protein còn lại trong hai protein này;

và

xác định kết quả phản ứng của kháng thể phát hiện khi cả kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện gắn với phức hợp.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó protein phi cấu trúc 1 và thrombin hoặc protein phi cấu trúc 1 và prothrombin được gài vào nhau.
13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó virus Flaviviridae thuộc chi Flavivirus.
14. Phương pháp theo điểm 11, trong đó virus Flaviviridae là virus dengue.
15. Phương pháp theo điểm 11, trong đó mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật có vú.
16. Phương pháp theo điểm 11, trong đó mẫu sinh học có nguồn gốc từ người.
17. Phương pháp theo điểm 11, trong đó protein phi cấu trúc là protein chế tiết hoặc annexin.
18. Phương pháp theo điểm 11, trong đó kháng thể bắt giữ là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.
19. Phương pháp theo điểm 11, trong đó kháng thể phát hiện là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.
20. Phương pháp theo điểm 11, trong đó mẫu sinh học là máu, nước tiểu hoặc bạch huyết.

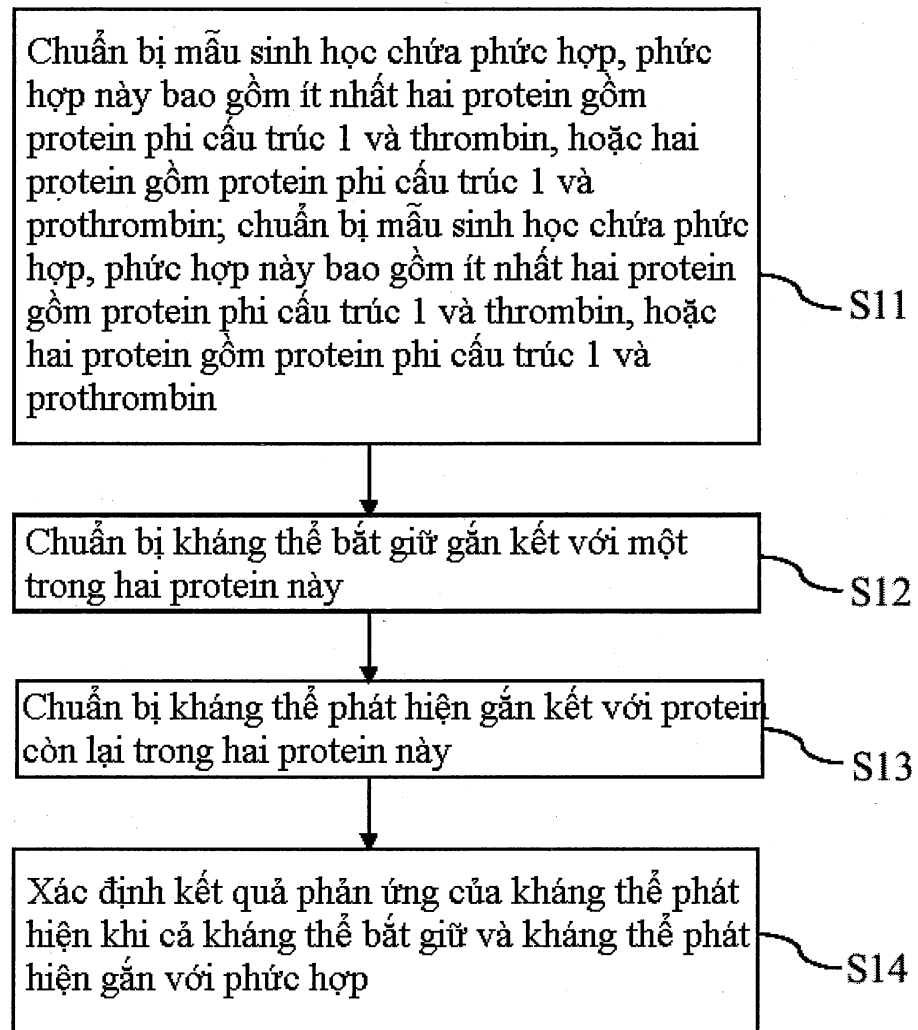


FIG. 1

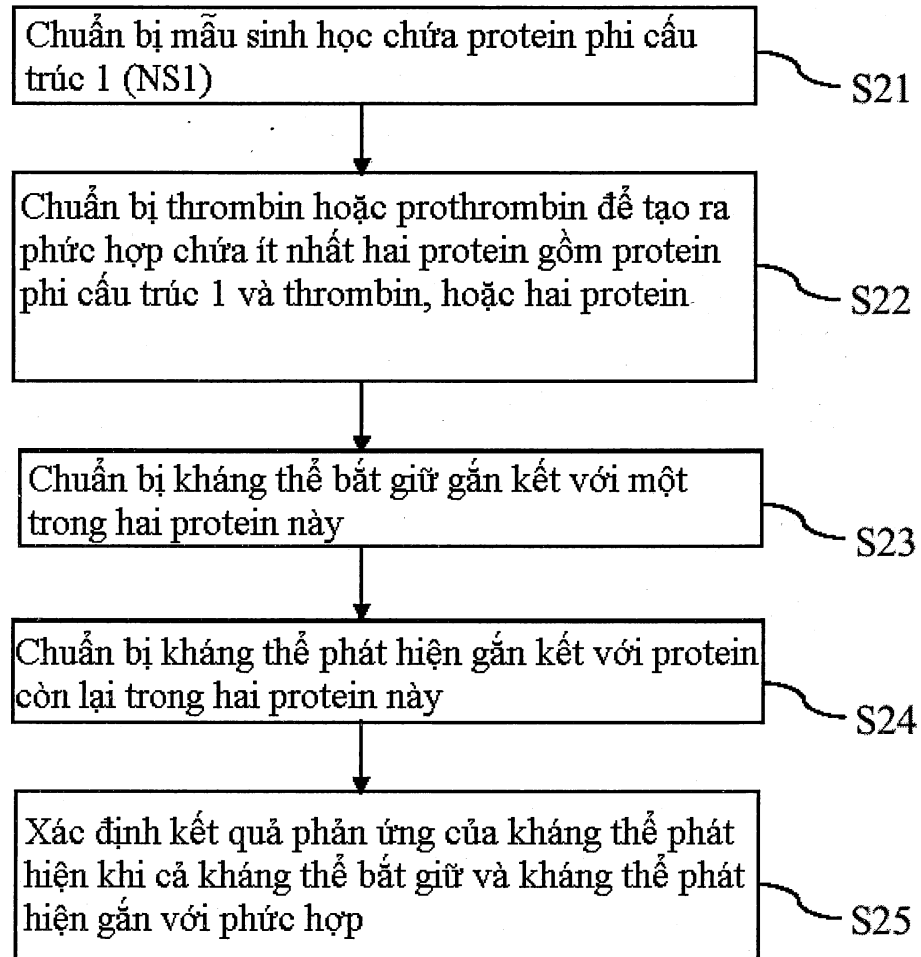


FIG.2

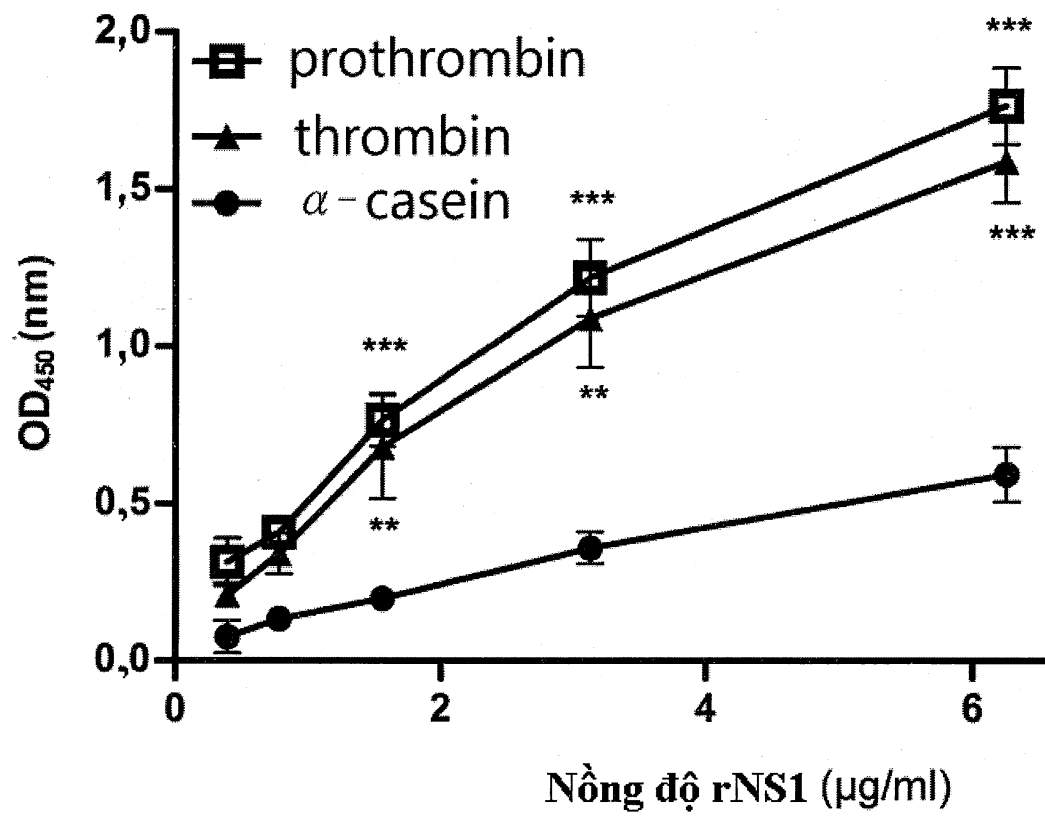


FIG.3

		Phức hợp NS1-thrombin		
		dương tính	âm tính	tổng cộng
NS1	dương tính	21(26,3%)	3 (3,8%)	24 (30%)
	âm tính	42(52,5%)	14 (17,5%)	56 (70%)
	tổng cộng	63(78,8%)	17 (21,3%)	80 (100%)

FIG.4A

Phức hợp NS1-thrombin			
	dương tính	âm tính	tổng cộng
Bộ kit ELISA bắt giữ NS1 có trên thị trường	dương tính 20 (33,90%)	5 (8,47%)	25(42,37%)
	âm tính 28 (47,46%)	6 (10,17%)	34(57,63%)
	tổng cộng 48 (81,36%)	11 (18,64%)	59 (100%)

FIG.4B