



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003052

(51) **C12Q 1/68; G01N 33/574**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00534

(22) 26/10/2020

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/01/2021 394

(73) Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Phường Nghĩa Đô, Quận Cầu Giấy, Thành Phố Hà
Nội

(72) Nguyễn Thị Xuân (VN); Quách Đức Tín (VN); Nguyễn Huy Hoàng (VN).

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KIT ELISA DÙNG ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG NGUYÊN
UNG THƯ CA125 CHẨN ĐOÁN BỆNH UNG THƯ BUỒNG TRỨNG**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất bộ kit ELISA dùng để định lượng kháng nguyên ung thư 125 (Cancer antigen— CA125) chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng. Kit thu được từ phương pháp theo sáng chế có ưu điểm là giá thành thấp, chất lượng cao và góp phần hạ giá thành xét nghiệm đảm bảo hầu hết phụ nữ trung niên đều được xét nghiệm sàng lọc bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và thiết bị y tế, cụ thể là sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kit dùng để xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- ELISA) để định lượng kháng nguyên ung thư CA125 (Cancer antigen 125) trong huyết tương ở người nghi ngờ mắc bệnh, cho phép chẩn đoán và theo dõi sự tiến triển của bệnh ung thư buồng trứng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Định lượng nồng độ CA125 bằng kỹ thuật ELISA là phương pháp hiện nay nhiều cơ sở y tế sử dụng để chẩn đoán sớm hoặc theo dõi tiến trình của bệnh ung thư buồng trứng phục vụ công tác chữa trị bệnh đạt hiệu quả cao khi được phát hiện kịp thời sớm nhất có thể. Chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng bằng kỹ thuật này có độ chính xác khoảng 70-80% so với tiêu chuẩn vàng là xét nghiệm lâm sàng, cận lâm sàng, chụp X quang và chụp cắt lớp vi tính. Ung thư buồng trứng là bệnh ung thư hình thành trong buồng trứng, có thể lây lan đến các vùng khác như: niêm mạc vùng bụng, hạch bạch huyết, phổi và gan. Nguyên nhân gây bệnh chiếm khoảng 50% là do đột biến gen gen *BRCA1* và gen *BRCA2* làm chức năng tế bào buồng trứng bất thường và mất kiểm soát trong quá trình phát triển. Ung thư buồng trứng ở giai đoạn đầu không gây đau đớn và có thể không có triệu chứng nên bệnh nhân không phát hiện ra hoặc bỏ qua.

Kháng nguyên ung thư 125 (CA125) là phân tử glycoprotein nặng 220-kDa, được mã hóa bởi gen MUC16 nằm trên NST 19p13.2. Phân tử này gồm 3 domain: domain trong màng, domain xuyên màng và domain ngoài màng. CA125 được xác định như một marker quan trọng trong chẩn đoán ung thư buồng trứng với khoảng 50% phụ nữ mắc giai đoạn sớm và 80% mắc giai đoạn muộn có nồng độ CA125 trong máu cao.

Nhiều nghiên cứu chế tạo kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng kháng lại protein CA125 đã được công bố trước đó như (Công bố số EP3515946A1,

JP2015025006A, CN110526974A và WO2019213747A1). Những kháng thể này là nguyên liệu cần thiết cho các loại xét nghiệm như xét nghiệm ELISA, western blotting, hóa mô miễn dịch và miễn dịch huỳnh quang. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu chế tạo kit ELISA định lượng kháng nguyên CA125 được công bố cho đến nay, mặc dù trên thị trường có rất nhiều kit thương mại đang lưu hành. Việc định lượng nồng độ CA125 trong huyết tương rất quan trọng để chẩn đoán sớm và theo dõi điều trị bệnh ung thư buồng trứng. Ở Việt Nam hiện nay thường nhập khẩu kit ELISA này với giá thành cao và không chủ động được nguồn cung cấp kit. Do đó, chúng tôi đề xuất phương pháp sản xuất bộ kit này để đáp ứng nhu cầu về bộ kit ELISA để chủ động nguồn cung cấp, đồng thời đảm bảo được giá thành hợp lý với điều kiện trong nước.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất kit ELISA dùng để định lượng kháng nguyên CA125 chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng, từ đó có thể tiến tới cung cấp một phần kit chẩn đoán bệnh trên phục vụ nhu cầu rất lớn hiện nay ở thị trường trong nước và thị trường thế giới.

Kit ELISA này đặc trưng và khác biệt với các loại kit ELISA định lượng CA125 khác ở chỗ là kháng thể bắt của kit được nhóm nghiên cứu chế tạo và tinh sạch từ kháng thể đa dòng thu được từ huyết thanh của chuột được gây miễn dịch với kháng nguyên CA125. Kháng thể đa dòng kháng CA125 tự sản xuất bắt cặp đặc hiệu với kháng nguyên CA125 và kháng thể đơn dòng kháng CA125 gắn HRP của hãng Antidodies-online trong phản ứng ELISA. Kháng thể đa dòng CA125 có thể chế tạo được với số lượng lớn có chất lượng cao và không mất phí vận chuyển, phí nhập khẩu, v.v.. Khi sử dụng kháng thể này kết hợp với kháng thể phát hiện thương mại và kháng nguyên CA125, chúng tôi đã chế tạo được bộ kit ELISA có chất lượng tương đương so với các loại kit thương mại đang có trên thị trường và giá thành rẻ hơn nhiều (3-5 lần).

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất bộ kit ELISA định lượng CA125 chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng bao gồm: 01 đĩa ELISA 96 giếng- Kháng thể bắt CA125: 1 lọ 25 μ l (1mg/mL)- Protein CA125 chuẩn: 1 lọ 20 μ l (0,1

IU/mL)- Kháng thể phát hiện CA125: 1 lọ 25 μ l (0,5 mg/mL)- Dung dịch đệm bắt: 1 lọ (15 ml)- Dung dịch đệm khóa: 1 lọ (30 ml, 2X)- Dung dịch rửa: 1 lọ (60 ml, 10X)- Cơ chất tetramethylbenzidin tạo màu (TMB): 1 lọ (12 ml)- Dung dịch H_2SO_4 2N: 1 lọ (10 ml), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị đĩa ELISA 96 giếng;
- (ii) chuẩn bị lọ kháng thể bắt CA125;
- (iii) chuẩn bị lọ protein CA125 chuẩn;
- (iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện CA125;
- (v) chuẩn bị lọ dung dịch đệm bắt;
- (vi) chuẩn bị lọ dung dịch đệm khóa;
- (vii) chuẩn bị lọ dung dịch rửa;
- (viii) chuẩn bị lọ dung dịch tạo màu TMB;
- (ix) chuẩn bị lọ dung dịch H_2SO_4 2N; và
- (x) đóng gói thu kit thành phẩm.

Theo một phương án, bộ kit được sản xuất còn bao gồm hướng dẫn sử dụng.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện Biểu đồ đường chuẩn của protein CA125

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, các phương án này chỉ nhằm mục đích bộc lộ sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế này đề cập đến phương pháp sản xuất kit ELISA định lượng CA125 chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng bao gồm: Đĩa ELISA 96 giếng, kháng thể bắt CA125, protein CA125 chuẩn, kháng thể phát hiện CA125, dung dịch đệm bắt, dung dịch đệm khóa, dung dịch rửa, dung dịch tạo màu TMB và dung dịch H_2SO_4 2N.

Phương pháp sản xuất kit ELISA định lượng CA125 chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị đĩa ELISA 96 giếng;
- (ii) chuẩn bị lọ kháng thể bắt CA125;
- (iii) chuẩn bị lọ protein CA125 chuẩn;
- (iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện CA125;
- (v) chuẩn bị lọ dung dịch đệm bắt;
- (vi) chuẩn bị lọ dung dịch đệm khóa;
- (vii) chuẩn bị lọ dung dịch rửa;
- (viii) chuẩn bị lọ dung dịch tạo màu TMB;
- (ix) chuẩn bị lọ dung dịch H_2SO_4 2N; và
- (x) đóng gói thu kit thành phẩm.

Các bước sản xuất các thành phần sẽ được mô tả cụ thể dưới đây:

Đĩa ELISA 96 giếng: 01 đĩa (12 dải với 8 giếng/dải)

Đĩa ELISA đáy phẳng có chất liệu nhựa polystyren, kích thước: 86x128mm, tổng số giếng là 96, 12 dải với 8 giếng/dải, đĩa màu trong suốt và được đánh số thứ tự các vị trí trên đĩa.

Kháng thể bắt CA125: 1 lọ (1 mg/mL)

Kháng thể bắt CA125 được chế tạo và tinh sạch từ huyết thanh của chuột được gây miễn dịch với kháng nguyên CA125 và hiệu giá kháng thể đạt 6400 được kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA. Kháng thể được bảo quản bằng dung dịch NaN_3 0,05% ở 4°C.

Protein CA125 được tách chiết và tinh sạch từ dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư buồng trứng dương tính với dấu (marker) CA125. Protein này được tiêm vào chuột gây đáp ứng miễn dịch bằng cách hòa tan protein CA125 trong tá dược Freund's rồi tiêm dưới da bụng chuột, việc gây đáp ứng miễn dịch chuột được thực hiện với hai lần tiêm, trong đó lần tiêm đầu tiên sử dụng tá dược Freund's toàn phần, lần tiêm nhắc lại sử dụng với tá dược Freund's không toàn phần, khoảng cách giữa các lần tiêm là 2 tuần, chuột sau tiêm nhắc lần 2 được lấy máu tĩnh mạch đuôi thu huyết thanh chứa kháng thể. Kháng thể này sau đó được tinh sạch bằng cách sử dụng sắc ký ái lực với protein A thông qua cột

tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare). Kháng thể bất được bảo quản bằng dung dịch NaN_3 0,05%. Dán nhãn, bảo quản ở 4°C.

Bảng 1: Thành phần và hàm lượng trong một lọ kháng thể bất CA125

Thành phần	Số lượng
Kháng thể bất CA125 (1 mg/mL)	25 μl

Protein CA125 chuẩn: 1 lọ (100 KU/mL)

Protein CA125 được tinh sạch từ dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư buồng trứng dương tính với dấu (marker) CA125. Protein CA125 có thể là protein thương mại, ví dụ protein thương mại của hãng Fitzgerald. Chia thành các lọ đựng 20 μl (100 KU/mL). Dán nhãn, bảo quản bằng dung dịch sucroza 3% và NaN_3 0,05%, ở -20°C.

Bảng 2: Thành phần và hàm lượng trong một lọ protein CA125 chuẩn

Thành phần	Hàm lượng
Protein CA125 chuẩn (100 KU/mL)	20 μl

Kháng thể phát hiện CA125: 1 lọ (0,5 mg/mL)

Kháng thể phát hiện là kháng thể đơn dòng CA125 gắn với HRP, có thể là kháng thể thương mại, ví dụ kháng thể thương mại của hãng Antibodies-online. Kháng thể này là kháng thể IgG1 dùng để phát hiện protein CA125 có trong mẫu xét nghiệm. Dung dịch kháng thể phát hiện CA125 (0,5 mg/mL) được chia vào các lọ chứa mỗi lọ 25 μl , bảo quản bằng dung dịch ProClin 0,05% ở 4°C và tránh ánh sáng.

Bảng 3: Thành phần và hàm lượng trong một lọ kháng thể phát hiện CA125

Thành phần	Hàm lượng
Kháng thể phát hiện CA125 (0,5 mg/mL)	25 μl

Dung dịch đệm bất: 1 lọ (15 ml), pH 6,5

Dung dịch đệm bất được pha theo công thức 500 ml dung dịch bao gồm: 6,245 g Na_2HPO_4 , 7,735g NaH_2PO_4 , và nước deion. Chuẩn pH dung dịch bằng 6,5. Lọc dung dịch

đệm bắt qua màng lọc 0,22 μM . Chia ra thành các lọ 15 ml/lọ. Dán nhãn, bảo quản dung dịch đệm bắt ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Bảng 4: Thành phần và hàm lượng trong một lọ dung dịch đệm bắt

Thành phần	Hàm lượng
Na_2HPO_4	0,188 g
NaH_2PO_4	0,232 g
Dung dịch H_2O deion	15 ml

Dung dịch đệm khóa: 1 lọ (30 ml, 2X)

Dung dịch đệm khóa dùng để khóa tất cả những vị trí gắn kết không đặc hiệu trên bề mặt của đĩa ELISA, pha loãng kháng thể bắt, protein chuẩn, kháng thể phát hiện. Dung dịch sau khi pha xong được dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Pha dung dịch đệm khóa theo công thức 500 ml dung dịch gồm PBS (2X) bổ sung 4% sữa tách béo (skim milk) và lọc dung dịch đệm khóa qua màng lọc 0,22 μM . Chia ra thành các lọ 30 ml (2X). Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Bảng 5: Thành phần và hàm lượng trong một lọ dung dịch đệm khóa

Thành phần	Hàm lượng
PBS (2X)	30 ml
Sữa tách béo	4% thể tích

Dung dịch rửa: 1 lọ (60 ml, 10X)

Dung dịch rửa dùng để rửa, loại bỏ các thành phần thừa trong quá trình phản ứng gồm protein, dung dịch đệm khóa và kháng thể không gắn. Dung dịch rửa trong suốt, không màu, lắc lên có bọt. Dán nhãn, bảo quản dung dịch rửa ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Pha dung dịch rửa theo công thức 1000 ml dung dịch PBS (10X) bổ sung 0,5% Tween-20, lắc hỗn hợp này và để trong thời gian ít nhất 24 giờ. Chia ra thành các lọ 60 ml (10X). Lọc dung dịch rửa qua màng lọc 0,22 μM . Dán nhãn, bảo quản dung dịch rửa ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Bảng 6: Thành phần và hàm lượng trong một lọ dung dịch rửa

Thành phần	Hàm lượng
PBS (10X)	60 ml
Tween-20	0,05% thể tích

Dung dịch tạo màu TMB: 1 lọ (12 ml)

Cơ chất TMB kết hợp với enzym HRP tạo ra sản phẩm có màu xanh lục. Cường độ màu tỉ lệ thuận với lượng kháng thể gắn kết với enzym HRP phản ứng và tương đương với nồng độ kháng nguyên CA125 trong mẫu. Cơ chất dùng cho kit ELISA theo sáng chế có thể là cơ chất thương mại, ví dụ cơ chất TMB của hãng Thermo Fisher Scientific. Nhận dạng dung dịch cơ chất TMB không màu. Chia vào mỗi lọ 12 ml bằng pipet. Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C và tránh ánh sáng.

Dung dịch H₂SO₄ 2N: 1 lọ (10 ml)

Dung dịch H₂SO₄ 2N dùng để dừng phản ứng vì enzym HRP và cơ chất là phản ứng oxy hóa khử hai chiều nên phải dừng phản ứng để tránh gây nhiễu kết quả. Thêm vào axit sulfuric để đổi màu xanh lục sang màu vàng, cho phép đo chính xác mật độ quang học tại cường độ 450 nm sử dụng đầu đọc đĩa (ELISA reader).

Dung dịch H₂SO₄ 2N được pha chế bằng cách lấy 10,86 ml dung dịch H₂SO₄ 98% và bổ sung nước deion vừa đủ để tạo ra 200ml dung dịch H₂SO₄ 2N. Chia vào mỗi lọ 10 ml bằng pipet. Dung dịch sau khi pha xong được dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Bảng 7: Thành phần và hàm lượng trong một lọ dung dịch H₂SO₄ 2N

Thành phần	Hàm lượng
Dung dịch H ₂ SO ₄ 98%	0,543 ml
Dung dịch H ₂ O deion	9,5 ml

Kit bao gồm các sinh phẩm, dung dịch và hóa chất khác cần thiết cho kỹ thuật ELISA được pha chế và đóng gói như sau:

- 01 đĩa ELISA 96 giếng

- Kháng thể bắt CA125: 1 lọ 25 µl (1mg/mL)
- Protein CA125 chuẩn: 1 lọ 20 µl (100 KU/mL)
- Kháng thể phát hiện CA125: 1 lọ 25 µl (0,5 mg/mL)
- Dung dịch đệm bắt: 1 lọ (15 ml)
- Dung dịch đệm khóa: 1 lọ (30 ml, 2X)
- Dung dịch rửa: 1 lọ (60 ml, 10X)
- Dung dịch tạo màu TMB: 1 lọ (12 ml)
- Dung dịch H₂SO₄ 2N: 1 lọ (10 ml)

Tiến hành đóng gói 01 lọ hóa chất bao gồm: protein CA125 chuẩn trong túi nilon, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tám thành phần còn lại bao gồm: đĩa ELISA 96 giếng, kháng thể bắt, kháng thể phát hiện, dung dịch đệm bắt, dung dịch đệm khóa, dung dịch rửa, dung dịch tạo màu TMB và dung dịch H₂SO₄ 2N được bảo quản trong hộp ở nhiệt độ 4°C. Kit này có thể còn bao gồm hướng dẫn sử dụng đi kèm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ dễ hiểu hơn từ các ví dụ sau. Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng nhận biết được các nguyên liệu cụ thể và các kết quả mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa, và không có dụng ý hoặc không nhằm giới hạn sáng chế như được mô tả đầy đủ hơn trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Điều chế protein chuẩn

Protein CA125 được tinh sạch từ dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư buồng trứng dương tính với marker CA125. Protein CA125 có thể là protein thương mại, ví dụ protein thương mại của hãng Fitzgerald. Chia thành các lọ đựng 20 µl (100 KU/mL). Dán nhãn, bảo quản bằng dung dịch sucrose 3% và NaN₃ 0.05%, ở -20°C.

Ví dụ 2: Sản xuất kháng thể bắt

Kháng thể bắt là kháng thể CA125 đã dòng được sản xuất bởi nhóm nghiên cứu của chúng tôi như sau: protein CA125 được tách chiết và tinh sạch từ dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư buồng trứng dương tính với marker CA125. Sau đó, protein CA125 được hòa với tá dược Freund's (toàn phần và không toàn phần) rồi tiêm dưới da bụng

chuột. Việc gây đáp ứng miễn dịch chuột được thực hiện với hai lần tiêm, trong đó lần tiêm đầu tiên sử dụng tá dược toàn phần, lần tiêm nhắc lại sử dụng với tá dược không toàn phần. Khoảng cách giữa các lần tiêm là 2 tuần. Chuột sau tiêm nhắc lần 2 được lấy máu tĩnh mạch đuôi thu huyết thanh và để xác định hiệu giá kháng thể bằng phương pháp ELISA. Kháng thể thu nhận bằng phương pháp tủa muối ammonium sulfate được tinh sạch tinh sạch bằng sắc ký ái lực với protein A thông qua cột tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare). Kiểm tra độ tinh sạch của kháng thể thu được bằng kỹ thuật điện di biến tính SDS-PAGE 12,5%. Tiến hành xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford khi đo độ hấp phụ ánh sáng ở bước sóng 595nm. Dán nhãn và bảo quản bằng dung dịch NaN_3 0,05% ở 4°C.

Ví dụ 3: Sản xuất kháng thể phát hiện

Kháng thể phát hiện đơn dòng CA125 gắn với HRP có thể là kháng thể thương mại, ví dụ kháng thể thương mại của hãng Antibodies-online. Kháng thể này là kháng thể IgG1 dùng để phát hiện protein CA125 có trong mẫu xét nghiệm. Dán nhãn và bảo quản bằng dung dịch Proclin 0,05% ở 4°C.

Ví dụ 4: Sản xuất dung dịch đệm bắt

Dung dịch đệm bắt được pha theo công thức 500 ml dung dịch bao gồm: 6,245 g Na_2HPO_4 , 7,735g NaH_2PO_4 , và nước deion. Chuẩn pH dung dịch bằng 6,5. Lọc dung dịch đệm bắt qua màng lọc 0,22 μM . Chia ra thành các lọ 15 ml/lọ. Dán nhãn, bảo quản dung dịch đệm bắt ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 5: Sản xuất dung dịch đệm khóa đậm đặc

Dung dịch đệm khóa đậm đặc pha theo công thức 500 ml dung dịch gồm PBS (2X) bổ sung 4% skim milk và lọc dung dịch đệm khóa qua màng lọc 0,22 μM . Chia ra thành các lọ 30 ml/lọ (2X). Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 6: Sản xuất dung dịch rửa cô đặc

Dung dịch rửa cô đặc được pha theo công thức 1000 ml dung dịch PBS (10X) bổ sung 0,5% Tween-20. Lắc hỗn hợp này và để trong thời gian ít nhất 24 giờ. Dung dịch rửa bao gồm PBS và 0,05% Tween-20. Chia ra thành các lọ 60 ml/lọ (10X), dung dịch

rửa trong suốt, không màu, lắng lên có bột. Lọc dung dịch rửa qua màng lọc 0,22 μM . Dán nhãn, bảo quản dung dịch rửa ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 7: Sản xuất cơ chất tạo màu TMB

Dung dịch cơ chất tạo màu là tetramethylbenzidin. Dung dịch cơ chất có thể là hóa chất thương mại, ví dụ hóa chất thương mại của hãng Thermo Scientific. Chia vào mỗi lọ 12 ml/lọ dung dịch TMB. Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 8: Sản xuất dung dịch H_2SO_4 2N

Dung dịch 200 ml dung dịch H_2SO_4 2N được pha chế bằng cách lấy 10,86 ml dung dịch H_2SO_4 98% và bổ sung nước deion vừa đủ. Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 9: Chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng theo kit định lượng CA125 của sáng chế

Sử dụng kit định lượng CA125 để chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng theo sáng chế và tiến hành xét nghiệm trên 10 mẫu huyết tương đã biết trước kết quả xét nghiệm bằng kit thương mại (MUCIN 16/CA125 Human ELISA Kit, Catalog Number EHMUC16, Thermo Fisher Scientific). Nồng độ CA125 trong huyết tương của mẫu bệnh nhân ung thư buồng trứng dương tính là $\geq 35\text{U/mL}$.

Dùng pipet hút và nhỏ 100 μl dung dịch bắt chứa kháng thể bắt CA125 vào mỗi giếng của đĩa ELISA. Dùng nắp của đĩa ELISA đậy kín, bọc bằng parafin và để qua đêm ở 4°C.

Rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa, mỗi lần 300 μl /giếng (mỗi lần rửa giữ khoảng 30 giây). Gõ nhẹ, úp lên trên giấy thấm để loại bỏ hoàn toàn dung dịch đệm rửa. Bổ sung 200 μl dung dịch đệm khóa vào mỗi giếng, ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

Rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa, mỗi lần 300 μl /giếng (mỗi lần rửa giữ khoảng 30 giây). Gõ nhẹ, úp lên trên giấy thấm để loại bỏ hoàn toàn dung dịch đệm rửa. Mẫu protein chuẩn được pha loãng trong dung dịch đệm khóa thành 7 nồng độ khác nhau bao gồm các nồng độ: 324 U/ml, 162 U/ml, 54 U/ml, 18 U/ml, 6 U/ml, 2 U/ml và 0.6 U/ml. Bổ sung 100 μl protein chuẩn vào 08 giếng của dải đầu tiên và 100 μl mẫu huyết tương vào các giếng còn lại, ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

Rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa, mỗi lần 300 μ l/giếng (mỗi lần rửa giữ khoảng 30 giây). Gõ nhẹ, úp lên trên giấy thấm để loại bỏ hoàn toàn dung dịch đệm rửa. Bổ sung 100 μ l dung dịch phát hiện cộng hợp với enzyme HRP vào mỗi giếng, ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

Rửa đĩa 5 lần bằng dung dịch đệm rửa, mỗi lần 300 μ l/giếng (mỗi lần rửa giữ khoảng 30 giây). Gõ nhẹ, úp lên trên giấy thấm để loại bỏ hoàn toàn dung dịch đệm rửa. Bổ sung 100 μ l cơ chất tạo màu TMB vào mỗi giếng, ủ 15 phút trong bóng tối để gắn với các vị trí có HRP làm đổi màu xanh của dung dịch phản ứng.

Thêm 50 μ l dung dịch H_2SO_4 2N vào mỗi giếng để ngừng phản ứng ELISA gây biến đổi màu xanh của dung dịch phản ứng biến thành màu vàng. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm.

Kết quả của xét nghiệm định lượng kháng nguyên CA125 của sáng chế như sau:

Phân tích kết quả OD của các mẫu protein chuẩn có dải nồng độ từ 324 U/ml, 162 U/ml, 54 U/ml, 18 U/ml, 6 U/ml, 2 U/ml và 0.6 U/ml với việc sử dụng các thành phần tối ưu như: Kháng thể bắt CA125 có nồng độ 2 μ g/ml; dung dịch đệm khóa skim milk 2%; và kháng thể phát hiện CA125 gắn với HRP có nồng độ 1 μ g/ml, kết quả có sự tương quan tuyến tính giữa protein chuẩn và diện tích pic tương ứng, thể hiện qua đường thẳng hồi quy và hệ số tương quan $R = 0,9921$, các giá trị đo đều nằm trên đường hồi quy.

Bảng 8: Giá trị OD_{450} của protein CA125

Nồng độ protein CA125 chuẩn (U/mL)	324	162	54	18	6	2	1	0
Giá trị OD	3,04	1,74	0,84	0,53	0,40	0,31	0,21	0,13

Số liệu kết quả xét nghiệm của kit như sau:

Bảng 9: Kết quả đo nồng độ CA125

Số thứ tự	Nồng độ CA125 (U/mL)			Trung bình nồng độ CA125 (U/mL)	Mẫu
	Lần 1	Lần 2	Lần 3		
1	401,89	410,23	401,59	404,57	Chứng dương

2	54,00	53,20	55,20	54,13	Mẫu XN 1
3	448,95	441,60	445,10	445,22	Mẫu XN 2
4	18,20	16,90	17,40	17,50	Mẫu XN 3
5	426,60	419,50	428,40	424,83	Mẫu XN 4
6	0	1,00	2,00	1,00	Mẫu XN 5
7	0	0	0	0	Mẫu XN 6
8	10,00	9,50	9,80	9,77	Mẫu XN 7
9	14,00	12,90	13,50	13,47	Mẫu XN 8
10	4,50	4,60	4,70	4,60	Mẫu XN 9
11	3,80	4,10	3,90	3,93	Mẫu XN 10

Kết quả 10 mẫu bệnh phẩm xét nghiệm như sau:

- Các mẫu xét nghiệm số 1, 2 và 4: dương tính với bệnh ung thư buồng trứng.
- Các mẫu xét nghiệm số 3, 5, 6, 7, 8, 9 và 10: âm tính với bệnh ung thư buồng trứng.

Kết luận: Kết quả của các mẫu dương tính và âm tính với kháng nguyên CA125 như trên được đo bằng kit tự sản xuất theo sáng chế tương tự như kết quả được đo bằng kit thương mại. Chính vì vậy, kit tự chế tạo theo sáng chế đạt tính chính xác cao và có độ nhạy và độ đặc hiệu tương đồng với kit thương mại của hãng Thermo Scientific.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Trong những năm gần đây, việc sản xuất kit ELISA chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng đã được nhiều nơi trên thế giới quan tâm và ứng dụng cho chẩn đoán và theo dõi quá trình điều trị bệnh ung thư buồng trứng dựa vào kỹ thuật ELISA để xác định nồng độ CA125 có trong mẫu huyết tương người bệnh. Bệnh ung thư buồng trứng được khuyến cáo sàng lọc 6 tháng/lần đối với phụ nữ trên 40 tuổi để phát hiện bệnh sớm và kịp thời để có thể chữa khỏi bệnh một cách đơn giản nhất. Nếu bệnh ung thư buồng trứng bị phát hiện muộn sẽ dễ bị di căn sang các cơ quan khác và không chữa được. Vì thế nhu cầu sử dụng kit ELISA này tại các cơ sở y tế rất lớn. Kit tự sản xuất có ưu điểm là giá thành thấp hơn với chất lượng tương đương so với kit nhập ngoại và thời gian sản xuất ngắn không

mất nhiều thời gian cho thủ tục xuất nhập cảnh và vận chuyển, dễ dàng đáp ứng được nhu cầu của người dân. Ở Việt Nam hiện nay, bộ kit này được nhập ngoại và chưa được sản xuất ở trong nước, chính vì thế, việc tự sản xuất được bộ kit ELISA này là rất cần thiết và góp phần hạ giá thành xét nghiệm đảm bảo hầu hết phụ nữ trung niên đều được xét nghiệm sàng lọc bệnh.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất kit ELISA dùng để định lượng kháng nguyên ung thư CA125 (cancer antigen 125) chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng bao gồm các bước:

(i) Chuẩn bị đĩa ELISA 96 giếng:

Chọn đĩa ELISA đáy phẳng có chất liệu nhựa polystyren, kích thước chiều rộng 86 mm và chiều dài 128 mm, tổng số giếng là 96, 12 dải với 8 giếng/dải, đĩa màu trong suốt;

Đánh số thứ tự các vị trí trên đĩa;

(ii) Chuẩn bị lọ kháng thể bắt CA125:

Tách chiết và tinh sạch protein CA125 từ dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư buồng trứng dương tính với dấu (marker) CA125;

Tiêm protein thu được vào chuột gây đáp ứng miễn dịch bằng cách hòa tan protein CA125 trong tá dược Freund's rồi tiêm dưới da bụng chuột, việc gây đáp ứng miễn dịch chuột được thực hiện với hai lần tiêm, trong đó lần tiêm đầu tiên sử dụng tá dược Freund's toàn phần, lần tiêm nhắc lại sử dụng với tá dược Freund's không toàn phần, khoảng cách giữa các lần tiêm là 2 tuần, chuột sau tiêm nhắc lần 2 được lấy máu tĩnh mạch đuôi thu huyết thanh chứa kháng thể;

Tinh sạch kháng thể thu được bằng cách sử dụng sắc ký ái lực với protein A thông qua cột tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare), thu được kháng thể bắt CA125 và bảo quản bằng dung dịch NaN_3 0,05% theo hàm lượng kháng thể bắt CA125 là 1 mg/ml;

Chia dung dịch thu được vào các lọ chứa, mỗi lọ 25 μl , dán nhãn, bảo quản ở 4°C;

(iii) Chuẩn bị lọ protein CA125 chuẩn:

Cho 20 μl protein CA125 chuẩn vào lọ chứa và bảo quản bằng dung dịch sucroza 3% và NaN_3 0,05% theo hàm lượng protein CA125 là 100 KU/ml;

Dán nhãn và bảo quản ở -20°C;

(iv) Chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện CA125:

Cho 25 μl kháng thể phát hiện CA125 là kháng thể đơn dòng IgG1 CA125 gắn với HRP vào lọ chứa và bảo quản bằng dung dịch ProClin 0,05% theo hàm lượng kháng thể phát hiện CA125 là 0,5 mg/ml;

(v) Chuẩn bị lọ dung dịch đệm bắt:

Pha dung dịch đệm bắt theo công thức 500 ml dung dịch bao gồm: 6,245 g Na_2HPO_4 , 7,735g NaH_2PO_4 , và nước deion;

Chuẩn pH dung dịch bằng 6,5, lọc dung dịch qua màng lọc 0,22 μM ;

Chia ra thành các lọ 15 ml/lọ, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C;

(vi) Chuẩn bị lọ dung dịch đệm khóa:

Pha dung dịch đệm khóa theo công thức 500 ml dung dịch gồm PBS (2X) bổ sung 4% sữa tách béo (skim milk);

Lọc dung dịch qua màng lọc 0,22 μM , chia ra thành các lọ 30 ml (2X), dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C;

(vii) Chuẩn bị lọ dung dịch rửa:

Pha dung dịch rửa theo công thức 1000 ml dung dịch PBS (10X) bổ sung 0,5% Tween-20, lắc hỗn hợp này, lọc qua màng lọc 0,22 μM và để trong thời gian ít nhất 24 giờ;

Chia ra thành các lọ 60 ml (10X), dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C;

(viii) Chuẩn bị lọ dung dịch tạo màu TMB:

Chia dung dịch chất tạo màu tetrametylbenzidin vào mỗi lọ 12 ml bằng pipet, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C và tránh ánh sáng;

(ix) Chuẩn bị lọ dung dịch H_2SO_4 2N:

Pha chế dung dịch H_2SO_4 2N bằng cách lấy 10,86 ml dung dịch H_2SO_4 98% và bổ sung nước deion vừa đủ để tạo ra 200mL dung dịch H_2SO_4 2N;

Chia dung dịch H_2SO_4 2N vào mỗi lọ 10 ml bằng pipet, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C; và

(x) Đóng gói thu kit thành phẩm:

Tiến hành đóng gói 01 lọ hóa chất bao gồm lọ protein CA125 chuẩn thu được từ bước (iii) trong túi nylon, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ -20°C, và tám thành phần còn lại bao gồm: đĩa ELISA 96 giếng, lọ kháng thể bắt, lọ kháng thể phát hiện, lọ dung dịch đệm bắt, lọ dung dịch đệm khóa, lọ dung dịch rửa, lọ dung dịch tạo màu TMB và lọ dung dịch H_2SO_4 2N được bảo quản trong hộp ở nhiệt độ 4°C, thu được kit ELISA dùng để định

lượng kháng nguyên ung thư CA125 (cancer antigen 125) chẩn đoán bệnh ung thư buồng trứng bao gồm các thành phần:

01 đĩa ELISA 96 giếng;

Kháng thể bắt CA125: 1 lọ 25 μ l, 1 mg/mL;

Protein CA125 chuẩn: 1 lọ 20 μ l, 100 KU/mL;

Kháng thể phát hiện CA125: 1 lọ 25 μ l, 0,5 mg/mL;

Dung dịch đệm bắt: 1 lọ, 15 ml;

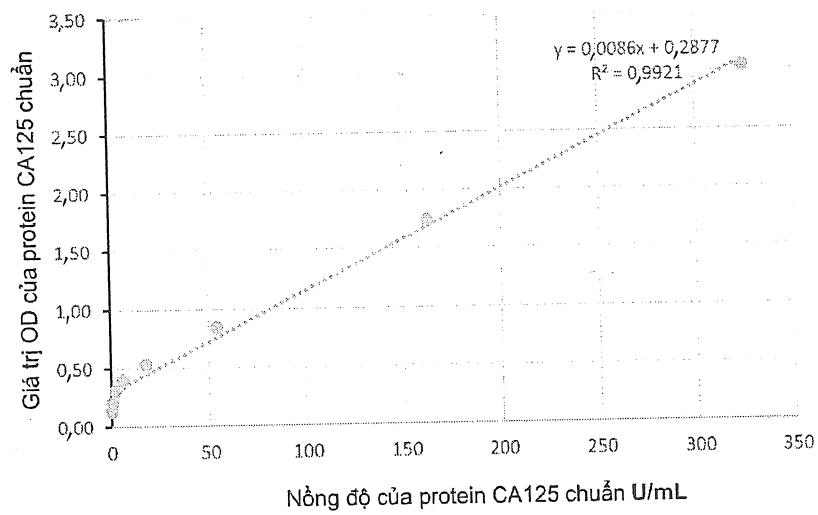
Dung dịch đệm khóa: 1 lọ, 30 ml, 2X;

Dung dịch rửa: 1 lọ, 60 ml, 10X;

Cơ chất tạo màu TMB: 1 lọ, 12 ml; và

Dung dịch H_2SO_4 2N: 1 lọ, 10 ml.

2. Phương pháp sản xuất kit theo điểm 1, trong đó phương pháp này trong bước (x) còn bao gồm thêm hướng dẫn sử dụng đi kèm.



Hình 1