



(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)



2-0003116

(51) **G01N 33/574**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00374

(22) 07/08/2020

(45) 27/03/2023 420

(43) 26/10/2020 391A1

(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); Bùi Kiều Trang (VN); Nguyễn Huy Hoàng (VN).

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KIT ELISA DÙNG ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG HCG- β CHẨN
ĐOÁN BỆNH UNG THƯ TINH HOÀN**

(57) Sáng chế đề cập đến sản xuất kit ELISA dùng để định lượng HCG- β chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn. Xét nghiệm xác định nồng độ HCG- β trong mẫu huyết tương được thực hiện ở hầu hết các cơ sở y tế khám chữa bệnh để chẩn đoán sớm bệnh ung thư tinh hoàn. 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 mọi người dân 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 enzym (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- ELISA) để định lượng HCG- β trong huyết tương của bệnh nhân ung thư tinh hoàn và cho phép chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có nhiều kỹ thuật khác nhau để chẩn đoán ung thư tinh hoàn bao gồm các xét nghiệm lâm sàng và cận lâm sàng. Trong số đó, định lượng nồng độ HCG- β bằng kỹ thuật ELISA là một phương pháp hiện nay nhiều cơ sở y tế sử dụng để kết hợp với các xét nghiệm khác chẩn đoán sớm bệnh cũng như theo dõi tiến trình của bệnh. Nam giới có thể xét nghiệm nồng độ HCG- β định kì 6 tháng/lần để sàng lọc bệnh ung thư tinh hoàn. Kỹ thuật này thao tác đơn giản, không tốn kém và thời gian thực hiện tương đối nhanh phục vụ nhu cầu cần thiết của người dân và kết quả có thể được cung cấp ngay trong ngày.

Ung thư tinh hoàn là một bệnh với khối u ác tính xuất hiện ở một hay cả hai tinh hoàn. Bệnh ảnh hưởng rất lớn tới khả năng sinh sản ở nam do tinh hoàn không những có nhiệm vụ sản xuất ra tinh trùng mà còn là nơi hormon sinh dục testosterone được tạo ra. Ở nam giới ung thư tinh hoàn hiện đang chiếm khoảng 1% tổng số các loại ung thư và thường gặp nam giới có độ tuổi từ 20 đến 34. Ở Việt Nam, việc chẩn đoán bệnh thường xảy ra khi bệnh đã có những triệu chứng khá rõ rệt và đã ở giai đoạn muộn, vì vậy kết quả điều trị còn hạn chế. Chính vì vậy mà việc chẩn đoán bệnh sớm là rất quan trọng để có thể chữa bệnh hiệu quả. Nam giới khỏe mạnh có nồng độ HCG- β trong máu nhỏ hơn 1ng/ml và những người mắc bệnh có lượng HCG- β trong máu cao hơn 1ng/ml.

Có một số sáng chế đã công bố các kỹ thuật khác nhau để định lượng nồng độ HCG- β phục vụ công tác chẩn đoán bệnh như sáng chế của Công ty Bioscience Tianjin Diagnostic Technology Co. LTD (CN 102749461 A và CN 102998467 A). Tuy nhiên, các kit chẩn đoán này sử dụng kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch định lượng hóa phát quang là kỹ thuật đòi hỏi các thiết bị đắt tiền, giá thành cao, do đó việc ứng dụng trong thực tế tại Việt Nam còn hạn chế.

Do đó, có nhu cầu kit chẩn đoán ung thư tinh hoàn có độ nhạy cao, thực hiện đơn giản, thiết bị có giá thành phù hợp để có thể ứng dụng trên phạm vi rộng, góp phần thực hiện việc chẩn đoán sớm, và có thể thực hiện việc điều trị một cách hiệu quả hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất kit ELISA dùng định lượng HCG- β chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn, từ đó có thể tiến tới cung cấp một phân loại kit ELISA này đáp ứng nhu cầu lớn hiện nay ở thị trường trong nước và thị trường thế giới.

Kit ELISA theo sáng chế sử dụng kháng thể bắt là kháng thể đa dòng được tạo ra từ quá trình gây đáp ứng miễn dịch thỏ và kháng thể phát hiện được tạo ra từ dòng tế bào lai sau đó cộng hợp với biotin, cuối cùng sử dụng dung dịch streptavidin liên hợp với HRP để định lượng nồng độ HCG- β .

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kit ELISA định lượng HCG- β chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị đĩa ELISA 96 giếng;
- (ii) chuẩn bị lọ kháng thể bắt HCG- β ;
- (iii) chuẩn bị lọ kháng thể HCG- β chuẩn;
- (iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện HCG- β ;
- (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 cơ chất tạo màu TMB;

(ix) chuẩn bị lọ dung dịch H_2SO_4 2N; và

(x) đóng gói thu kit thành phẩm.

Kit ELISA thu được gồm: 01 đĩa ELISA 96 giếng, kháng thể bắt HCG- β : 1 lọ 25 μl (1mg/mL), protein HCG- β chuẩn: 1 lọ 10 μl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kháng thể phát hiện HCG- β : 1 lọ 25 μl (0,5mg/mL), dung dịch đệm bắt: 1 lọ (15ml), dung dịch đệm khóa: 1 lọ (30ml, 2X), dung dịch rửa: 1 lọ (60ml, 10X), cơ chất tetramethylbenzidin tạo màu (TMB): 1 lọ (12ml) và dung dịch H_2SO_4 2N: 1 lọ (10ml).

Theo một phương án, kit ELISA theo sáng chế còn bao gồm hướng dẫn sử dụng.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện Biểu đồ đường chuẩn của protein HCG- β

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 nồng độ HCG- β để chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn bao gồm: Đĩa ELISA 96 giếng, kháng thể bắt HCG- β , protein HCG- β chuẩn, kháng thể phát hiện HCG- β , 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 HCG- β chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị đĩa ELISA 96 giếng;
- (ii) chuẩn bị lọ kháng thể bắt HCG- β ;
- (iii) chuẩn bị lọ kháng thể HCG- β chuẩn;
- (iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện HCG- β ;
- (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 cơ chất 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: 86 x 128mm, 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 HCG- β : 1 lọ (1 mg/mL)

Kháng thể bắt HCG- β có nguồn gốc protein được tổng hợp từ gen dưới đơn vị beta 5 gonadotropin màng đệm (*chorionic gonadotropin subunit beta 5 - CGB5*) trên nhiễm sắc thể 19 ở vị trí NC_000019.10 (49043845....49045311). Protein này được tiêm vào thỏ gây đáp ứng miễn dịch bằng cách hòa protein HCG- β thu được với dung dịch đệm phosphat (PBS) và tá dược Freund's rồi tiêm dưới da bụng thỏ, việc gây đáp ứng miễn dịch thỏ 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, thỏ sau tiêm nhắc lần 2 được lấy máu ở rìa tai thu huyết thanh chứa kháng thể đa dòng. 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 bắt được bảo quản bằng dung dịch muối phosphat không chứa ion Mg^{2+} và Ca^{2+} và hỗn hợp chất bảo quản 0,02% NaN₃ và 50% glycerol. Dán nhãn, bảo quản ở -20°C.

Bảng 1: Thành phần và hàm lượng trong một lọ kháng thể bắt HCG- β

Thành phần	Số lượng
Kháng thể bắt HCG- β (1 mg/mL)	25 μ l

Protein HCG- β chuẩn: 1 lọ (20 μ g/mL)

Protein HCG- β thu được bằng cách tinh sạch từ nước tiểu của phụ nữ mang thai. Protein HCG- β có trọng lượng phân tử là 18kDa (20 μ g/mL). Dán nhãn, bảo quản bằng dung dịch 50 mM $\text{NH}_4(\text{C}(=\text{O})\text{OHO})$, ở -20°C . Protein HCG- β cũng có thể là protein thương mại, ví dụ protein thương mại của hãng Abcam.

Bảng 2: Thành phần và hàm lượng trong một lọ protein HCG- β chuẩn

Thành phần	Hàm lượng
Protein HCG- β chuẩn (20 μ g/mL)	10 μ l

Kháng thể phát hiện HCG- β cộng hợp với HRP: 1 lọ (0,5 mg/mL)

Kháng thể phát hiện HCG- β được chế tạo từ công nghệ tế bào lai giữa tế bào lách chuột (được gây miễn dịch với protein HCG- β như trên) và tế bào myeloma P3X63-Ag 8.653 tạo ra tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng HCG- β có isotyp là IgG. Kháng thể này sau đó được cộng hợp với enzym horseradish peroxidaza (HRP) và được bảo quản bằng dung dịch PBS chứa 0,02 % thimerosal. Dán nhãn, bảo quản ở -20°C và tránh ánh sáng.

Lai tế bào Myeloma P3X63-Ag 8.653 với tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên HCG- β , có mặt polyethylene glycol (PEG), nuôi cấy trên môi trường chọn lọc HAT, sau 7 ngày, thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường nuôi cấy HT, toàn bộ số giếng nuôi cấy được kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10 x 20 và được đánh dấu những giếng có tế bào lai.

Thu nhận dịch nuôi cấy tế bào của các giếng có tế bào lai, giếng được chọn lọc được thu nhận và kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA để xác định các tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng, tiếp tục pha loãng và nuôi cấy các dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng và xác định dòng tế bào ổn định nhất, tiếp tục nuôi cấy dòng tế bào lai ổn định nhất để thu dịch nổi tế bào, thực hiện phương pháp tủa muối ammonium sulfat dịch nổi tế bào để thu nhận kháng thể HCG- β , tinh sạch kháng thể HCG- β thu được bằng sắc ký ái lực với protein A thông qua cột tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare), kháng thể thu được sau tính sạch được cộng hợp với enzym HRP sử dụng bộ kit cộng hợp sinh học (Pierce) như sau: kháng thể HCG- β được thêm vào dung dịch chứa HRP 1 mg/ml, ủ 1-2 giờ, sau đó cộng

hợp được cho qua cột tinh chế nhằm phân tách các enzym tự do ra khỏi cộng hợp HRP, thu kháng thể phát hiện HCG- β ; kháng thể phát hiện HCG- β thu được được bảo quản bằng dung dịch PBS chứa 0,02 % thimerosal với hàm lượng kháng thể phát hiện HCG- β gắn với HRP là 0,5 mg/ml; chia kháng thể phát hiện HCG- β thu được vào các lọ chứa, mỗi lọ 25 μ l, dán nhãn, bảo quản ở -20°C và tránh ánh sáng. Bảng 3: Thành phần và hàm lượng trong một lọ kháng thể phát hiện HCG-B

Thành phần	Hàm lượng
Kháng thể phát hiện HCG- β (0,5 mg/mL)	25 μ l

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

Dung dịch đệm bắt dùng để pha kháng thể bắt. Dung dịch sau khi pha xong được thanh trùng và kiểm tra đạt độ pH 6,5. Dung dịch đệm bắt trong suốt, không màu. 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 ₂ HPO ₄	0,188 g
NaH ₂ PO ₄	0,232 g
Dung dịch H ₂ O 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.

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

Thành phần	Hàm lượng
PBS (2X)	30 ml
FBS (Fetal bovine serum)	10% 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.

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 cộng hợp với enzym HRP phản ứng và tương đương với nồng độ kháng nguyên HCG- β 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 H_2SO_4 2N: 1 lọ (10 ml)

Dung dịch H_2SO_4 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 sự đo chính xác tại cường độ 450 nm sử dụng đầu đọc đĩa (ELISA reader).

Dung dịch H_2SO_4 2N được pha chế bằng cách lấy 49 ml dung dịch H_2SO_4 40% và bổ sung nước deion vừa đủ để tạo ra 200mL dung dịch H_2SO_4 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 2N	2,45 ml
Dung dịch H ₂ O deion	7,55 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 HCG-β: 1 lọ 25 µl (1mg/mL)
- Protein HCG-β chuẩn: 1 lọ 10 µl (20µg/mL)
- Kháng thể phát hiện HCG-β: 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 03 lọ hóa chất bao gồm: kháng thể bắt HCG-β, protein HCG-β chuẩn, kháng thể phát hiện HCG-β trong túi nilon, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Sáu thành phần còn lại bao gồm: đĩa ELISA 96 giếng, 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, người có hiểu biết trung bình 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 HCG-β

Protein HCG- β thu được bằng cách tinh sạch từ nước tiểu của phụ nữ mang thai. Protein HCG- β có trọng lượng phân tử là 18 kDa. Protein này có thể là protein thương mại, ví dụ protein thương mại của hãng Abcam. Chia ra thành các lọ đựng 10 μ L (20 μ g/mL). Dán nhãn, bảo quản bằng dung dịch 50 mM $\text{NH}_4(\text{C}(=\text{O})\text{OHO})$ ở -20°C .

Ví dụ 2: Sản xuất kháng thể bắt HCG- β

Kháng thể bắt HCG- β được tạo ra bằng cách như sau: protein HCG- β được hòa với đệm PBS và tá dược Freund's (toàn phần và không toàn phần) rồi tiêm dưới da bụng thỏ. Việc gây đáp ứng miễn dịch thỏ 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. Thỏ sau tiêm nhắc lần 2 được lấy máu rìa tai thu huyết thanh và để xác định hiệu giá kháng thể bằng phương pháp ELISA. Kháng thể thu nhận bằng phương pháp tủa muối amoni sulfat 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 595 nm. Dung dịch kháng thể bắt HCG- β được bảo quản bằng dung dịch muối phosphat không chứa ion Mg^{2+} và Ca^{2+} và hỗn hợp chất bảo quản 0,02% NaN_3 và 50% glycerol. Chia ra thành các lọ 25 μ L/lọ (1mg/mL). Dán nhãn, bảo quản ở -20°C .

Ví dụ 3: Sản xuất kháng thể phát hiện HCG- β

Để tạo được dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng HCG- β , chúng tôi tiến hành lai tế bào Myeloma P3X63-Ag 8.653 với tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên HCG- β , có mặt polyethylene glycol (PEG). Sau khi tiến hành dung hợp 2 loại tế bào này, nuôi cấy trên môi trường chọn lọc HAT. Sau 7 ngày, thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường nuôi cấy HT. Toàn bộ số giếng nuôi cấy được kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10 x 20 và được đánh dấu những giếng có tế bào lai. Kết quả cho thấy, tỷ lệ các giếng nuôi cấy có tế bào lai là 280/600 (46,67%). Để sàng lọc được các dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng HCG- β mong muốn, dịch nuôi cấy tế bào của 280 giếng được chọn lọc được thu nhận và kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA. Kết quả sàng lọc tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng cho thấy, có 7/600 giếng (1,16%) cho kết quả

mật độ quang OD $\geq 1,47$. Các dòng tế bào lai tiếp tục được pha loãng và nuôi cấy tiếp để xác định dòng tế bào ổn định nhất. Trong số 07 dòng tế bào lai trên có một dòng tế bào (ký hiệu là 7H3) đạt được 93,8% có phản dịch nổi dương tính với kháng thể kháng HCG- β , các dòng còn lại chỉ đạt được 25-58,3% dương tính với kháng thể HCG- β . Dòng tế bào lai 7H3 thu được tiếp tục được nuôi cấy để thu dịch nổi tế bào. Kháng thể thu nhận bằng phương pháp rửa muối ammonium sulfat được tinh sạch tinh sạch bằng sắc ký ái lực với protein A thông qua cột tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare). Sau đó, protein được xử lý và phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE kết hợp nhuộm Coomassie Brilliant Blue và tiến hành xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford.

Kháng thể này sau đó được cộng hợp với enzym HRP sử dụng bộ kit cộng hợp sinh học (Pierce) như sau: Kháng thể HCG- β được thêm vào dung dịch chứa HRP (1 mg/ml), enzym này sẽ tương tác với gốc amin của phân tử IgG để hình thành liên kết Schiff base (liên kết imin). Sau thời gian ủ 1-2 giờ, liên kết cộng hợp IgG-HRP giảm đi và các vị trí aldehyde không phản ứng của enzym HRP bất hoạt với ethanolamin. Sau đó cộng hợp được cho qua cột tinh chế nhằm phân tách các enzym tự do ra khỏi cộng hợp. Cộng hợp HRP này được hiệu giá bằng phương pháp ELISA.

Kháng thể phát hiện HCG- β gắn với HRP thu được bảo quản bằng dung dịch PBS chứa 0,02 % thimerosal. Chia ra thành các lọ 25 μ l/lọ (0,5 mg/mL). Dán nhãn, bảo quản ở -20°C và tránh ánh sáng.

Ví dụ 3: 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 μ M. 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 4: Sản xuất dung dịch đệm khóa

Dung dịch đệm khóa đậm đặc pha theo công thức 500 ml dung dịch gồm PBS (2X) bổ sung 20% dung dịch FBS. Dung dịch đệm khóa gồm PBS và 10% FBS. Chia ra thành các lọ 30 ml/lọ (2X). Lọc dung dịch đệm khóa qua màng lọc 0,22 μ M. Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 5: Sản xuất dung dịch rửa

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, lắc lên có bọt. Lọc dung dịch rửa qua màng lọc 0,22 μ M. Dán nhãn, bảo quản dung dịch rửa ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 6: 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 7: Sản xuất dung dịch H₂SO₄ 2N

Dung dịch 200 ml dung dịch H₂SO₄ 2N được pha chế bằng cách lấy 49 ml dung dịch H₂SO₄ 40% và bổ sung nước deion vừa đủ. Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 8: Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của kit định lượng HCG- β theo sáng chế

Sử dụng kit định lượng HCG- β để chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn theo sáng chế và tiến hành xét nghiệm trên 50 mẫu huyết tương của bệnh nhân ung thư tinh hoàn đã được chẩn đoán lâm sàng mang bệnh ung thư tinh hoàn và 50 mẫu người khỏe mạnh. Sử dụng kit thương mại (Human Chorionic Gonadotropin beta ELISA Kit, Catalog Number ab108638, Abcam) để đối chứng với kết quả của kit chế tạo. Nếu là mẫu người bệnh mà cho kết quả âm tính (nồng độ của HCG- β $\leq$ 1 ng/mL) hoặc mẫu người khỏe mà cho kết quả dương tính (nồng độ của HCG- β $>$ 1 ng/mL) thì mẫu đó là mẫu Không Đạt và ngược lại.

Các bước thực hiện xét nghiệm ELISA định lượng HCG- β :

Dùng pipet hút và nhỏ 100 μ l dung dịch bắt chứa kháng thể bắt HCG- β 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 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 200 μ l 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 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. Mẫu protein chuẩn được pha loãng trong dung dịch đệm khóa thành 7 nồng độ khác nhau: 20000 pg/ml, 10000 pg/ml, 5000 pg/ml, 1650 pg/ml, 550 pg/ml, 180 pg/ml, 60 pg/ml. Bổ sung 100 μ l protein chuẩn vào 08 giếng của dải đầu tiên và 100 μ l mẫu huyết tương đã pha loãng 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 chứa kháng thể phát hiện HCG- β cộng hợp với enzym 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 HCG- β của sáng chế như sau:

Phân tích kết quả OD của các mẫu protein chuẩn có dải nồng độ từ 20000 pg/ml, 10000 pg/ml, 5000 pg/ml, 1650 pg/ml, 550 pg/ml, 180 pg/ml, 60 pg/ml với việc sử dụng các thành phần tối ưu như: Kháng thể bắt HCG- β có nồng độ 2 μ g/ml; dung dịch đệm khóa FBS 10%; và kháng thể phát hiện HCG- β gắn với HRP có nồng độ 1 μ g/ml, kết quả có sự tương quan tuyến tính giữa protein chuẩn và diện tích píc tương ứng, thể hiện qua đường thẳng hồi quy và hệ số tương quan $R = 0,9908$, các giá trị đo đều nằm trên đường hồi quy (Hình 1).

Bảng 7: Giá trị OD₄₅₀ của protein HCG- β

Nồng độ protein HCG- β chuẩn (pg/mL)	20,000	10,000	5,000	1,650	550	180	60	0
Giá trị OD	3,2	1,85	1,15	0,58	0,46	0,41	0,24	0,12

Số liệu kết quả xét nghiệm của kit như sau:

Bảng 8: Kết quả đo nồng độ HCG- β của 50 bệnh nhân ung thư tinh hoàn (BN) và 50 người khỏe (NK) có đối chứng với kit thương mại của hãng Abcam.

Tên mẫu	Nồng độ HCG- β (ng/mL)	Kit theo sáng chế	Kit Abcam	Kết quả
BN1	26,013	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN2	26,093	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN3	6,393	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN4	8,193	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN5	35,665	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN6	26,073	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN7	7,993	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN8	45,665	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN9	45,665	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN10	0,893	Âm tính	Âm tính	Không Đạt
BN11	26,003	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN12	9,993	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN13	6,993	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN14	8,393	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN15	26,043	Dương tính	Dương tính	Đạt

BN16	26,043	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN17	109,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN18	109,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN19	65,965	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN20	0,393	Âm tính	Âm tính	Không Đạt
BN21	37,365	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN22	82,265	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN23	62,165	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN24	82,265	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN25	45,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN26	40,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN27	25,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN28	50,265	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN29	45,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN30	37,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN31	9,193	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN32	8,093	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN33	9,193	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN34	10,393	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN35	7,193	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN36	37,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN37	41,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN38	19,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN39	51,565	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN40	51,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN41	41,465	Dương tính	Dương tính	Đạt

BN42	82,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN43	54,565	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN44	45,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN45	6,793	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN46	124,715	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN47	72,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN48	32,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN49	2,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
BN50	95,465	Dương tính	Dương tính	Đạt
NK1	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK2	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK3	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK4	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK5	0,893	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK6	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK7	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK8	0,12	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK9	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK10	0,14	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK11	0,24	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK12	0,41	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK13	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK14	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK15	0,18	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK16	0,256	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK17	0,185	Âm tính	Âm tính	Đạt

NK18	0,123	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK19	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK20	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK21	0,31	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK22	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK23	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK24	6,393	Dương tính	Dương tính	Không Đạt
NK25	0,893	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK26	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK27	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK28	0	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK29	0,293	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK30	0,09	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK31	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK32	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK33	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK34	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK35	1,12	Dương tính	Dương tính	Không Đạt
NK36	0,89	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK37	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK38	0,6	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK39	0,07	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK40	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK41	0,12	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK42	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK43	0,13	Âm tính	Âm tính	Đạt

NK44	0,18	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK45	0,11	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK46	0,12	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK47	0,81	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK48	0,1	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK49	0,12	Âm tính	Âm tính	Đạt
NK50	0,71	Âm tính	Âm tính	Đạt

Từ kết quả thu được ở trên ta tính được độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ sinh phẩm tự sản xuất như sau:

Dương tính thực: 48	Dương tính giả: 2	Tổng số dương tính (NB): 50
Âm tính giả: 2	Âm tính thực: 48	Tổng số âm tính (NK): 50
Độ nhạy của Kit theo sáng chế: $\text{Độ nhạy (\%)} = \frac{\text{Số dương tính thực}}{(\text{Số dương tính thực} + \text{Số âm tính giả})} \times 100\%$ $= \frac{48}{(48+2)} \times 100\% = 96\%$		
Độ đặc hiệu của Kit = $\text{Độ đặc hiệu (\%)} = \frac{\text{Số âm tính thực}}{(\text{Số âm tính thực} + \text{Số dương tính giả})} \times 100\%$ $= \frac{48}{(48+2)} \times 100\% = 96\%$		

Độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ kit đều đạt 96% cho thấy bộ kit ELISA theo sáng chế có độ chính xác cao tương đương về chất lượng so với bộ kit của hãng Abcam. Chính vì vậy, bộ kit theo sáng chế có thể được ứng dụng trong xét nghiệm sàng lọc bệnh ung thư tinh hoàn.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Xét nghiệm xác định nồng độ HCG- β trong mẫu huyết thanh được thực hiện ở hầu hết các cơ sở y tế khám chữa bệnh để chẩn đoán sớm bệnh ung thư tinh hoàn. 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 mọi người dân đều được xét nghiệm sàng lọc bệnh.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất kit ELISA dùng để định lượng HCG- β chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn 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 86mm và chiều dài 128mm, 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 HCG- β :

tổng hợp protein HCG- β từ gen dưới đơn vị beta 5 gonadotropin màng đệm (*chorionic gonadotropin subunit beta 5 - CGB5*) trên nhiễm sắc thể 19 ở vị trí NC_000019.10 (49043845....49045311);

hòa protein HCG- β thu được với dung dịch đệm phosphat (PBS) và tá được Freund's rồi tiêm dưới da bụng thỏ, việc gây đáp ứng miễn dịch thỏ được thực hiện với hai lần tiêm, trong đó lần tiêm đầu tiên sử dụng tá được Freund's toàn phần, lần tiêm nhắc lại sử dụng với tá được Freund's không toàn phần, khoảng cách giữa các lần tiêm là 2 tuần, thỏ sau tiêm nhắc lần 2 được lấy máu ở rìa tai thu huyết thanh, thực hiện rửa muối amoni sulfat để thu nhận kháng thể;

tinh sạch kháng thể thu được bằng sắc ký ái lực với protein A thông qua cột tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare), thu được kháng thể bắt HCG- β và bảo quản bằng dung dịch muối phosphat không chứa ion Mg^{2+} và Ca^{2+} và hỗn hợp chất bảo quản 0,02% NaN_3 và 50% glycerol theo hàm lượng kháng thể bắt HCG- β là 1mg/ml;

chia dung dịch thu được vào các lọ chứa, mỗi lọ 25 μ l, dán nhãn, bảo quản ở $-20^{\circ}C$;

(iii) chuẩn bị lọ kháng thể HCG- β chuẩn:

cho 10 μ l kháng thể HCG- β chuẩn vào lọ chứa và bảo quản bằng dung dịch $NH_4(C(=O)OHO)$ 50 mM theo hàm lượng kháng thể HCG- β chuẩn là 20 μ g/mL;

dán nhãn và bảo quản ở $-20^{\circ}C$

(iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện HCG- β :

lai tế bào Myeloma P3X63-Ag 8.653 với tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên HCG- β , có mặt polyethylene glycol (PEG), nuôi cấy trên môi trường chọn lọc HAT;

sau 7 ngày, thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường nuôi cấy HT, toàn bộ số giếng nuôi cấy được kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10 x 20 và được đánh dấu những giếng có tế bào lai;

thu nhận dịch nuôi cấy tế bào của các giếng có tế bào lai, giếng được chọn lọc được thu nhận và kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA để xác định các tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng;

tiếp tục pha loãng và nuôi cấy các dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng và xác định dòng tế bào ổn định nhất;

tiếp tục nuôi cấy dòng tế bào lai ổn định nhất để thu dịch nổi tế bào;

thực hiện phương pháp tủa muối ammonium sulfat dịch nổi tế bào để thu nhận kháng thể HCG- β , tinh sạch kháng thể HCG- β thu được bằng sắc ký ái lực với protein A thông qua cột tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare);

kháng thể thu được sau tinh sạch được cộng hợp với enzym HRP sử dụng bộ kit cộng hợp sinh học (Pierce) như sau: kháng thể HCG- β được thêm vào dung dịch chứa HRP 1 mg/ml, ủ 1-2 giờ, sau đó cộng hợp được cho qua cột tinh chế nhằm phân tách các enzym tự do ra khỏi cộng hợp HRP, thu kháng thể phát hiện HCG- β ;

kháng thể phát hiện HCG- β thu được được bảo quản bằng dung dịch PBS chứa 0,02 % thimerosal với hàm lượng kháng thể phát hiện HCG- β gắn với HRP là 0,5 mg/ml;

chia kháng thể phát hiện HCG- β thu được vào các lọ chứa, mỗi lọ 25 μ l, dán nhãn, bảo quản ở -20°C và tránh ánh sáng;

(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 μ M;

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 20% dung dịch huyết thanh thai bò (FBS);

lọc qua màng lọc 0,22 μM , chia vào các lọ 30ml/lọ (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 và để trong thời gian ít nhất 24 giờ;

lọc qua màng lọc 0,22 μM , chia thành các lọ 60 ml/lọ (10X), dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C;

(viii) chuẩn bị lọ cơ chất tạo màu TMB:

chia dung dịch chất tạo màu tetramethylbenzidin vào các lọ chứa, mỗi lọ 12 ml, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C;

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

pha dung dịch H_2SO_4 2N theo công thức 200ml dung dịch gồm 49 ml dung dịch H_2SO_4 40% và bổ sung nước deion vừa đủ;

chia dung dịch H_2SO_4 2N vào các lọ chứa, mỗi lọ 10 ml, 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 03 lọ hóa chất bao gồm kháng thể bắt HCG- β , protein HCG- β chuẩn, kháng thể phát hiện HCG- β thu được từ các bước (ii), (iii) và (iv) trong túi nilon, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ -20°C, và sáu thành phần còn lại bao gồm đĩa ELISA 96 giếng, dung dịch đệm bắt, dung dịch đệm khóa, dung dịch rửa, dung dịch tạo màu TMB và dung dịch H_2SO_4 2N được bảo quản trong hộp ở nhiệt độ 4°C, thu được kit ELISA dùng để định lượng HCG- β chẩn đoán bệnh ung thư tinh hoàn gồm các thành phần:

01 đĩa ELISA 96 giếng;

Kháng thể bắt HCG- β : 1 lọ 25 μL , 1 mg/mL;

Protein HCG- β chuẩn: 1 lọ 20 μL , 0,1 IU/mL;

Kháng thể phát hiện HCG- β : 1 lọ 25 μL , 0,5 mg/mL;

Dung dịch đệm bắt: 1 lọ, 15 ml;

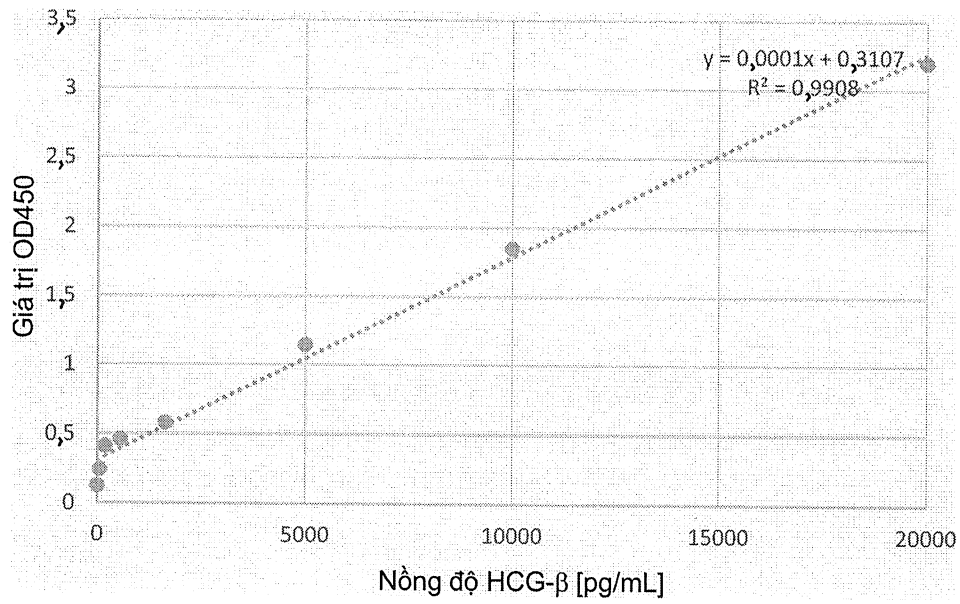
Dung dịch đệm khóa: 1 lọ, 30 ml, 2X;

Dung dịch rửa: 1 lọ, 60 ml, 10X;

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