



(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)



2-0003126

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

(13) **Y**

(21) 2-2020-00413

(22) 25/08/2020

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/11/2020 392A

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

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

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KIT ELISA ĐỊNH LƯỢNG HORMON 17-
HYDROXYPROGESTERON (17-OHP) DÙNG ĐỂ CHẨN ĐOÁN BỆNH TĂNG SINH
TUYẾN THƯỢNG THẬN**

(57) Sáng chế đề cập đến sản xuất kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) định lượng hormon 17-hydroxyprogesteron (17-OHP) dùng để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận. Xét nghiệm xác định nồng độ 17-OHP trong mẫu huyết tương được thực hiện ở hầu hết các cơ sở y tế khám chữa bệnh để chẩn đoán sớm bệnh tăng sinh tuyến thượng thận. 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 hormon 17-hydroxyprogesteron (17 OHP) trong huyết tương và cho phép chẩn đoán và tiên lượng bệnh tăng sinh tuyến thượng thận.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bao gồm các xét nghiệm lâm sàng và cận lâm sàng. Trong số đó, định lượng nồng độ 17-OHP bằng kỹ thuật ELISA là phương pháp hiện nay nhiều cơ sở y tế sử dụng để chẩn đoán sớm bệnh cũng như phục vụ cho công tác theo dõi tình trạng bệnh.

Bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bẩm sinh là bệnh rối loạn tổng hợp hormon tuyến thượng thận 17-OHP, một chất được cơ thể sử dụng tạo ra cortisol. Sự sản xuất cortisol được xúc tác bởi một số enzym. Nếu một hoặc nhiều các enzym thiếu hoặc rối loạn chức năng, hậu quả là số lượng trung bình cortisol được sản xuất giảm và tiền chất của cortisol là 17-OHP tích tụ trong máu gây nam hóa ở nữ. Qua chương trình sàng lọc sơ sinh, tỷ lệ mắc bệnh này trên thế giới là từ 1/10.000 đến 1/15.000 trẻ sơ sinh. Nếu một trẻ sơ sinh 3-5 ngày tuổi có nồng độ 17-OHP tăng đáng kể ($\geq 10\text{ng/mL}$ huyết tương) là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán xác định bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bẩm sinh. Phát hiện, chẩn đoán và điều trị sớm bệnh lý này trong vòng 2 tuần đầu sau sinh giúp trẻ phát triển khoẻ mạnh bình thường, nhằm nâng cao chất lượng dân số Việt Nam.

Kit ELISA định lượng 17-OHP trong huyết tương đã được công bố năm 1987 bởi Công ty Immunodiagnostic Lab K (Công bố số JPS62119457A). Tuy nhiên, việc ứng dụng các kit này vào thực tế chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận ở Việt Nam gặp

nhiều khó khăn do giá thành cao và không chủ động được nguồn cung cấp kit. Do đó, vẫn có nhu cầu về bộ kit ELISA được sản xuất tại chỗ 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 định lượng 17-OHP dùng để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận, từ đó có thể tiến tới cung cấp một phần các loại kit chẩn đoán các bệnh trên phục vụ nhu cầu rất lớn hiện nay ở thị trường trong nước và thị trường thế giới.

Kit thương mại trên khác kit ELISA được chế tạo bởi chúng tôi là sự khác nhau về kháng thể phát hiện của hai loại kit. Kit của chúng tôi sử dụng kháng thể phát hiện sơ cấp cộng hợp với biotin, sau đó sử dụng dung dịch streptavidin liên hợp với HRP (Horseradish peroxidase) để khóa kháng thể phát hiện sơ cấp. Kit trước đó sử dụng kháng thể phát hiện cộng hợp trực tiếp với enzym HRP. Khi sử dụng kháng thể phát hiện gắn biotin kết hợp với kháng thể bắt, streptavidin liên hợp với HRP và kháng nguyên 17-OHP, 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 (5-7 lần).

Kit ELISA theo sáng chế sử dụng kháng thể bắt là kháng thể đa dòng được tạo ra từ việc gây đáp ứng miễn dịch thỏ bằng cách tiêm protein 17-OHP cộng hợp với BSA dưới da bụng của thỏ. Kháng thể phát hiện được gắn biotin là kháng thể đơn dòng thương mại.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kit ELISA định lượng nồng độ 17-OHP dùng để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị đĩa ELISA 96 giếng;
- (ii) chuẩn bị lọ kháng thể bắt 17-OHP;
- (iii) chuẩn bị lọ kháng thể 17-OHP chuẩn;
- (iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện 17-OHP;
- (v) chuẩn bị lọ dung dịch streptavidin gắn với HRP;

- (vi) chuẩn bị lọ dung dịch đệm bắt;
- (vii) chuẩn bị lọ dung dịch đệm khóa;
- (viii) chuẩn bị lọ dung dịch rửa;
- (ix) chuẩn bị lọ cơ chất tạo màu TMB;
- (x) chuẩn bị lọ dung dịch H_2SO_4 2N; và
- (xi) đóng gói thu kit thành phẩm.

Kit ELISA thu được gồm: 01 đĩa ELISA 96 giếng, Kháng thể bắt 17-OHP: 1 lọ 50 μL (0,5 mg/mL), Protein 17-OHP chuẩn: 1 lọ 20 μL (20 $\mu\text{g/mL}$), kháng thể phát hiện 17-OHP: 1 lọ 25 μL (0,5 mg/mL), dung dịch streptavidin gắn với HRP: 1 lọ 20 μL (0,25 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), dung dịch H_2SO_4 2N: 1 lọ (10 ml).

Theo một phương án, bộ kit 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 17-OHP

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 17-OHP dùng để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bao gồm: Đĩa ELISA 96 giếng, kháng thể bắt 17-OHP, protein 17-OHP chuẩn, kháng thể phát hiện 17-OHP, dung dịch streptavidin gắn với HRP, 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 17-OHP dùng để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị đĩa ELISA 96 giếng;

- (ii) chuẩn bị lọ kháng thể bắt 17-OHP;
- (iii) chuẩn bị lọ kháng thể 17-OHP chuẩn;
- (iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện 17-OHP;
- (v) chuẩn bị lọ dung dịch streptavidin gắn với HRP;
- (vi) chuẩn bị lọ dung dịch đệm bắt;
- (vii) chuẩn bị lọ dung dịch đệm khóa;
- (viii) chuẩn bị lọ dung dịch rửa;
- (ix) chuẩn bị lọ cơ chất tạo màu TMB;
- (x) chuẩn bị lọ dung dịch H_2SO_4 2N; và
- (xi) 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 17-OHP: 1 lọ (0,5 mg/mL)

Kháng thể bắt 17-OHP được tạo ra bằng cách: protein 17-OHP cộng hợp với BSA được hòa với đệm PBS và tá được 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 được toàn phần, lần tiêm nhắc lại sử dụng với tá được 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 chứa kháng thể đa dòng. Kháng thể này sau đó được tinh sạch bằng cách sử dụng cột sắc kí ái lực protein A thông qua cột tinh chế HiTrap Protein A (GE Healthcare). Dung dịch kháng thể bắt được bảo quản bằng hỗn hợp 0,02% NaN_3 và 50% glycerol. Dán nhãn, bảo quản ở $-20^\circ C$.

Bảng 1: Thành phần và hàm lượng trong một lọ kháng thể bắt 17-OHP

Thành phần	Số lượng
Kháng thể bắt 17-OHP (0,5 mg/mL)	50 μ l

Protein 17-OHP chuẩn: 1 lọ (20 µg/mL)

Protein 17-OHP là protein cộng hợp với BSA có khối lượng phân tử là 330,5Da và công thức phân tử là $C_{21}H_{30}O_3$. Protein này được hòa tan trong PBS. Dán nhãn, bảo quản ở -20°C. Protein này có thể là protein thương mại, ví dụ protein thương mại của hãng Mybiosource.

Bảng 2: Thành phần và hàm lượng trong một lọ protein 17-OHP chuẩn

Thành phần	Hàm lượng
Protein 17-OHP chuẩn (20 µg/mL)	20 µl

Kháng thể phát hiện 17-OHP: 1 lọ (0,5 mg/mL)

Kháng thể phát hiện 17-OHP được sản xuất bằng cách: protein 17-OHP cộng hợp với BSA được tiêm vào chuột để tạo đáp ứng miễn dịch, tế bào lai được tạo ra từ tế bào lách chuột với tế bào myeloma Sp2/0 sản xuất kháng thể đơn dòng 17-OHP. Kháng thể này sau đó được gắn với biotin và được bảo quản bằng 50% glycerol và 0.05% proclin-300. Dán nhãn, bảo quản ở -20°C. Kháng thể này có thể là kháng thể thương mại, ví dụ kháng thể thương mại của hãng Mybiosource.

Bảng 3: Thành phần và hàm lượng trong một lọ kháng thể phát hiện 17-OHP

Thành phần	Hàm lượng
Kháng thể phát hiện 17-OHP	25 µl

Dung dịch streptavidin gắn với HRP: 1 lọ (0,25 mg/mL)

Streptavidin đóng vai trò như một kháng thể phát hiện thứ cấp gắn với kháng thể phát hiện sơ cấp đã được gắn biotin. Dung dịch này có thể là hóa chất thương mại, ví dụ hóa chất thương mại của hãng Thermo Scientific. Dung dịch này được bảo quản bằng 0,1% proclin-300 ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Bảng 4: Thành phần và hàm lượng trong một lọ streptavidin gắn với HRP

Thành phần	Hàm lượng
Dung dịch streptavidin gắn với HRP	20 µl

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

Dung dịch đệm bắt có độ pH=6,5 và được dùng để pha chế kháng thể bắt. 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 5: 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 6: Thành phần và hàm lượng trong một lọ dung dịch đệm khóa

Thành phần	Hàm lượng
PBS (2X)	30 ml
FBS (Fetal bovine serum)	20% thể tích

Dung dịch rửa cô đặc: 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 7: 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 17-OHP 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 dùng phản ứng vì enzym HRP và cơ chất là phản ứng oxy hóa khử hai chiều nên phải dùng 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 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 8: 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 17-OHP: 1 lọ 50 µL (0,5 mg/mL)
- Protein 17-OHP chuẩn: 1 lọ 20 µL (20 µg/mL)
- Kháng thể phát hiện 17-OHP: 1 lọ 25 µL (0,5 mg/mL)
- Dung dịch streptavidin gắn với HRP: 1 lọ 20 µL (0,25 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 H_2SO_4 2N: 1 lọ (10 ml)

Tiến hành đóng gói 4 lọ hóa chất bao gồm: kháng thể bắt 17-OHP, protein 17-OHP chuẩn, kháng thể phát hiện 17-OHP và dung dịch streptavidin gắn với HRP trong túi nylon, 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 H_2SO_4 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

Protein 17-OHP là một protein cộng hợp với BSA có khối lượng phân tử là 330,5Da và công thức phân tử là $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$. Protein này có thể là protein thương mại, ví dụ protein thương mại của hãng Mybiosource. Chia ra thành các lọ đựng 20 μl protein 17-OHP (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dán nhãn, bảo quản ở -20°C .

Ví dụ 2: Sản xuất kháng thể bắt

Kháng thể bắt 17-OHP được tạo ra bằng cách: protein 17-OHP cộng hợp với BSA 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 ammoni sulfat được 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. Dung dịch kháng thể bắt 17-OHP được bảo quản bằng hỗn hợp 0.02% NaN₃ và 50% glycerol. Chia ra thành các lọ 50 µl/lọ (0,5 mg/mL). Dán nhãn, bảo quản ở -20°C.

Ví dụ 3: Sản xuất kháng thể phát hiện

Kháng thể phát hiện 17-OHP được sản xuất bằng cách: protein 17-OHP cộng hợp với BSA được tiêm vào chuột, tế bào lai được tạo ra từ tế bào lách chuột với tế bào myeloma Sp2/0 sản xuất kháng thể đơn dòng 17-OHP. Kháng thể này sau đó được gắn với biotin và được bảo quản bằng 50% glycerol và 0.05% proclin-300. Kháng thể này có thể là kháng thể thương mại, ví dụ kháng thể thương mại của hãng Mybiosource. Chia ra thành các lọ 25 µl/lọ (0,5 mg/mL). Dán nhãn, bảo quản ở -20°C.

Ví dụ 4: Sản xuất dung dịch streptavidin gắn với HRP

Streptavidin đóng vai trò như một kháng thể phát hiện thứ cấp gắn với kháng thể phát hiện sơ cấp đã được gắn biotin. Dung dịch này có thể là hóa chất thương mại, ví dụ hóa chất thương mại của hãng Thermo Scientific. Dung dịch này được bảo quản bằng 0,1% proclin-300. Chia ra thành các lọ 20 µl/lọ (0,25 mg/mL). Dán nhãn, bảo quản ở 2°C đến 8°C

Ví dụ 5: Sản xuất dung dịch đệm bắt

Dung dịch đệm bắt được pha theo công thức 500 ml dung dịch bao gồm: 6,245 g Na₂HPO₄, 7,735g NaH₂PO₄, 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 6: 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 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 µM. Dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 7: 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, lắc lên có bọt. 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 8: 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 9: 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 10: Chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bẩm sinh theo kit định lượng 17-OHP của sáng chế

Sử dụng kit ELISA định lượng 17-OHP để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bẩm sinh theo sáng chế và tiến hành xét nghiệm trên 7 mẫu huyết tương đã biết trước kết quả xét nghiệm bằng kit thương mại (7-Hydroxyprogesterone (17-OHP), ELISA Kit, Catalog Number MBS268852, MyBioSource). Huyết tương bệnh nhân pha loãng với tỷ lệ 1/10. Nồng độ 17-OHP trong huyết tương của mẫu bệnh nhân dương tính là $\geq 10\text{ng/mL}$.

Dùng pipet hút và nhỏ 100 μl dung dịch bắt chứa kháng thể bắt 17-OHP 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 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: 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml và 0,312 ng/ml. Bổ sung 100 μ l protein chuẩn vào 08 giếng của dải đầu tiên và 100 μ l 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 kháng thể phát hiện cộng hợp với biotin vào mỗi giếng, ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

Mẫu đã được loại trừ trường hợp cộng hợp giữa biotin nội sinh với streptavidin, bằng cách là không sử dụng kháng thể phát hiện gắn biotin cho mẫu đối chứng âm và chỉ sử dụng dung dịch streptavidin gắn với HRP cho mẫu này để chứng minh rằng biotin nội sinh có trong protein không ảnh hưởng đến nồng độ của mẫu thông qua mật độ quang học OD.

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 dung dịch streptavidin gắn với enzyme HRP vào mỗi giếng, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Rửa đĩa 7 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 HRP 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 17-OHP của sáng chế như sau:

Phân tích kết quả OD của các mẫu protein chuẩn có dải nồng độ từ 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml và 0,312 ng/ml với việc sử dụng các

thành phần tối ưu như: Kháng thể bắt 17-OHP nồng độ 2 µg/ml; dung dịch đệm khóa FBS 10%; kháng thể phát hiện 17-OHP gắn với biotin nồng độ 1 µg/ml; và dung dịch streptavidin gắn HRP nồng độ 0,2 µg/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

Bảng 9: Giá trị OD₄₅₀ của protein 17-OHP

Nồng độ protein 17-OHP chuẩn (ng/ml)	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0
Giá trị OD	3,3	1,81	1,202	0,8	0,451	0,387	0,25	0,113

Số liệu kết quả xét nghiệm của kit như sau:

Bảng 10: Kết quả đo nồng độ 17-OHP

Tiêu chí	Nồng độ 17-OHP (ng/mL)			Trung bình nồng độ 17-OHP (ng/mL)	Mẫu
	Lần 1	Lần 2	Lần 3		
1	57,1	57,3	57,1	57,2	Chứng dương
2	21,4	21,4	21,4	21,4	Mẫu XN 1
3	61,7	61,4	61,5	61,5	Mẫu XN 2
4	0	0	0	0	Mẫu XN 3
5	1,24	1,23	1,23	1,23	Mẫu XN 4
6	3,24	3,21	3,22	3,22	Mẫu XN 5
7	30,3	30,2	30,2	30,2	Mẫu XN 6
8	0	0	0	0	Mẫu XN 7

Kết quả 7 mẫu bệnh phẩm xét nghiệm như sau:

- Các mẫu xét nghiệm số 1, 2 và 6: dương tính với bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bẩm sinh.

- Các mẫu xét nghiệm số 3, 4, 5 và 7: âm tính với bệnh tăng sinh tuyến thượng thận bẩm sinh.

Kết luận: Kết quả của các mẫu dương tính và âm tính với kháng nguyên 17-OHP 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 MyBioSource.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Trong những năm gần đây, việc sản xuất kit ELISA chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận đã được nhiều nơi trên thế giới quan tâm và ứng dụng cho chẩn đoán bệnh cho trẻ sơ sinh và theo dõi tình trạng của bệnh dựa vào kỹ thuật ELISA để xác định nồng độ 17-OHP có trong mẫu huyết tương người bệnh. Bệnh này được khuyến cáo sàng lọc trên tất cả trẻ sơ sinh để phát hiện bệnh sớm và kịp thời để có thể chữa khỏi bệnh một cách đơn giản nhất. Nếu bệnh bị phát hiện muộn sẽ để lại nhiều di chứng khó lường và không chữa khỏi được. Vì thế nhu cầu tại các cơ sở y tế về số lượng kit chẩn bệnh này rất lớn. Kit tự sản xuất có ưu điểm là chất lượng tương đương so với kit nhập ngoại, giá thành thấp hơn và thời gian sản xuất ngắn không mất 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, hai loại kit này đều 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 mọi người dân đều được xét nghiệm sàng lọc bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) định lượng hormon 17-hydroxyprogesteron (17-OHP) dùng để chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận 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 17-OHP:

Protein 17-OHP cộng hợp với BSA được hòa với đệm 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 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, thực hiện tủa 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 17-OHP và bảo quản bằng hỗn hợp 0.02% NaN₃ và 50% glycerol theo hàm lượng kháng thể bắt là 0,5 mg/mL;

chia dung dịch thu được vào các lọ chứa, mỗi lọ 50 µl, dán nhãn, bảo quản ở -20°C;

(iii) chuẩn bị lọ kháng thể 17-OHP chuẩn:

chia kháng thể 17-OHP chuẩn vào các lọ chứa, mỗi lọ 20 µl, với hàm lượng 20 µg/mL, dán nhãn và bảo quản ở -20°C;

(iv) chuẩn bị lọ kháng thể phát hiện 17-OHP:

chia kháng thể phát hiện 17-OHP gắn biotin vào các lọ chứa, mỗi lọ 25 µl, với hàm lượng 0,5 mg/mL, dán nhãn, bảo quản ở -20°C;

(v) chuẩn bị lọ dung dịch streptavidin gắn với HRP (horseradish peroxidase):

chia dung dịch streptavidin gắn với HRP vào các lọ chứa, mỗi lọ 20 μ l, với hàm lượng 0,25 mg/mL dán nhãn, bảo quản ở 2°C đến 8°C;

(vi) 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;

(vii) 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 (Fetal bovine serum - FBS);

lọc qua màng lọc 0,22 μ M, chia vào các lọ 30ml/lọ (2X), dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C

(viii) 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 μ M, chia thành các lọ 60 ml/lọ (10X), dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C;

(ix) chuẩn bị lọ cơ chất tạo màu TMB (tetramethylbenzidin):

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;

(x) 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

(xi) đóng gói thu kit thành phẩm:

tiến hành đóng gói 04 lọ hóa chất bao gồm kháng thể bắt 17-OHP, protein 17-OHP chuẩn, kháng thể phát hiện 17-OHP và dung dịch streptavidin gắn với HRP thu được từ các bước (ii), (iii), (iv) và (v) 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 17-OHP chẩn đoán bệnh tăng sinh tuyến thượng thận gồm các thành phần:

01 đĩa ELISA 96 giếng;

Kháng thể bắt 17-OHP: 1 lọ 50 μL , 0,5 mg/mL;

Protein 17-OHP chuẩn: 1 lọ 20 μL , 20 $\mu\text{g/mL}$;

Kháng thể phát hiện 17-OHP: 1 lọ 25 μL , 0,5 mg/mL;

Dung dịch streptavidin gắn với HRP: 1 lọ 20 μL , 0,25 mg/mL;

Dung dịch đệm bắt: 1 lọ, 15 ml;

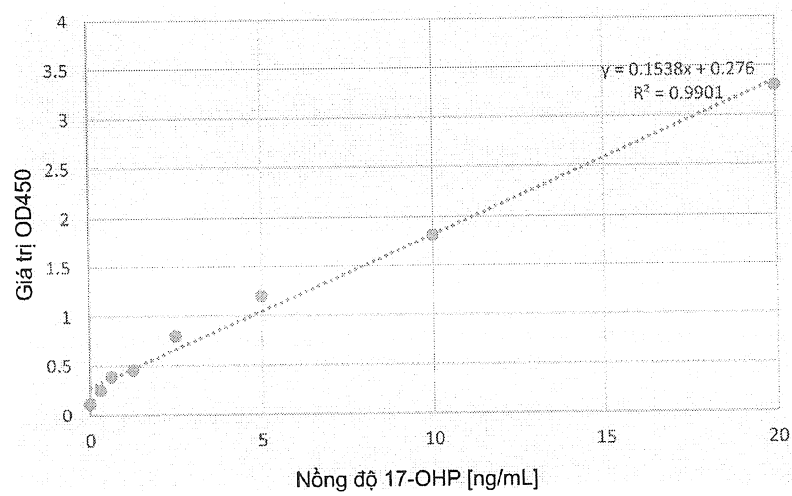
Dung dịch đệm khóa: 1 lọ, 30 ml, 2X;

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 (xi) còn bao gồm thêm hướng dẫn sử dụng đi kèm.



Hình 1