



(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) 
2-0002106

(51)⁷ **G01N 33/53, 33/68**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00242

(22) 14.08.2015

(45) 25.09.2019 378

(43) 26.10.2015 331

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI (VN)**

Số 1, Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) **Trương Quốc Phong (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT QUE THỬ PHÁT HIỆN NHANH VIRUT ROTA**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất que thử phát hiện nhanh virus rota. Quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu huyết thanh từ thỏ và chuột lang đã được gây miễn dịch bởi virus rota toàn phần;

ii) tinh sạch kháng thể đa dòng thỏ và chuột lang kháng virus rota từ huyết thanh thu được ở bước (i) để thu được dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch;

iii) cô đặc dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch thu được ở bước (ii);

iv) điều chế dung dịch nano vàng;

v) tạo dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòng thỏ kháng virus rota và hạt nano vàng;

vi) tạo miếng thấm cộng hợp bằng cách ngâm miếng thấm trong dung dịch cộng hợp thu được ở bước (v) và sấy khô;

vii) cố định kháng thể lên màng nitroxenluloza; và

viii) tạo que thử phát hiện nhanh virus rota.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và y tế, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất que thử phát hiện nhanh virus rota.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Virus rota là nguyên nhân gây tử vong do tiêu chảy lớn nhất ở trẻ em dưới 5 tuổi. Hàng năm virus này đã làm cho khoảng 25 triệu người mắc bệnh trong đó có 2 triệu người phải nhập viện và đã gây tử vong hơn 600.000 trẻ, trong số này hơn 80% là ở các nước đang phát triển. Từ năm 1999, tại Châu Á, hệ thống giám sát bệnh tiêu chảy do virus rota đã được thiết lập trong đó có Việt Nam là một thành viên. Kết quả cho thấy tỷ lệ tiêu chảy do virus rota chiếm 55-60% trường hợp. Mặc dù chưa có số liệu thống kê về tỷ lệ chết nhưng theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới 4-8% trẻ em dưới 5 tuổi tử vong là do virus rota. Tiêu chảy do virus rota ở trẻ em đã thực sự là gánh nặng đối với tất cả các nước trên thế giới. Việc cung cấp nước sạch và cải thiện điều kiện vệ sinh cũng không làm giảm tiêu chảy do virus rota.

Cùng với việc giám sát dịch tễ nhằm tạo ra một vắc xin hiệu quả thì việc chẩn đoán những bệnh nhân tiêu chảy do virus rota gây ra là vô cùng cần thiết để bác sỹ có thể áp dụng phương pháp điều trị thích hợp và hiệu quả nhất. Hiện nay trên thế giới có nhiều phương pháp phát hiện sự có mặt virus rota: kính hiển vi điện tử, phát hiện kháng nguyên (miễn dịch enzyme, ngưng kết latex và sắc ký miễn dịch), phát hiện axit nucleic (điện di polyacrylamit – PAGE, khuếch đại axit nucleic RT-PCR, giải trình tự gen). Phần lớn các phương pháp này tương đối hiệu quả cho xác định virus rota, mỗi phương pháp đều có những ưu, nhược điểm riêng của nó. Các phương pháp này đều được WHO khuyến cáo sử dụng trong những trường hợp nhất định, trong đó 2 phương pháp được khuyến cáo sử dụng trong xét nghiệm tại các cơ sở y tế đó là ELISA và sắc ký miễn dịch (que thử).

ELISA là phương pháp phát hiện kháng nguyên thích hợp nhất cho các nghiên cứu giám sát quy mô lớn. Phương pháp này sử dụng các kháng thể đặc hiệu virus rota để bắt giữ các kháng nguyên (VP6). Kháng nguyên sau đó được phát hiện nhờ phản ứng màu bằng cách sử dụng một kháng thể đặc hiệu virus rota bậc hai được gắn với enzyme. Giới hạn phát hiện của phương pháp là trên 8×10^5 hạt virus/ml. Phương pháp

ELISA có độ nhạy, tính đặc hiệu cao và có thể phân tích một lượng lớn mẫu, thời gian phân tích 2-3 giờ. Kỹ thuật này có thể sử dụng các kháng thể đơn dòng để xác định các phân nhóm dựa vào VP6 và các typ dựa vào VP4, VP7. Phương pháp này cho phép xác định các thông tin typ G và có thể đưa ra thông tin sự khác nhau về mặt kháng nguyên giữa các chủng virus rota của cùng một typ. Tuy nhiên một bất lợi của xác định typ sử dụng các kháng thể đơn dòng đó là đòi hỏi các hạt virus nguyên vẹn. Mặt khác sự biến đổi tính kháng nguyên ở các typ phổ biến làm cho chúng không có hoạt tính với các kháng thể đơn dòng, và các chất ức chế có mặt trong mẫu phân làm thay đổi liên kết của virus với kháng thể. Phương pháp này tương đối khó, mất nhiều thời gian, đòi hỏi các thiết bị chuyên dụng và các nhân viên phải được đào tạo chuyên sâu, nguyên vật liệu tương đối đắt.

Kỹ thuật sắc ký miễn dịch cũng được sử dụng để phát hiện kháng nguyên virus rota. Hiện nay dạng que nhúng đã được thiết kế dựa trên nguyên tắc sắc ký miễn dịch, chẳng hạn như QuickTestTM Rotavirus Strip của hãng Orogenics, que thử Rota-strip của hãng Coris được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng nguyên virus rota trong mẫu phân. Que nhúng này có chứa một kháng thể đơn dòng kháng virus rota được gắn cộng hợp với các hạt vàng dạng keo tụ (phức cộng hợp vàng). Kháng thể kháng virus rota nguồn gốc từ thỏ được cố định tại vị trí kiểm tra của que nhúng (vạch kiểm tra). Một kháng thể khác kháng kháng thể trong phức cộng hợp vàng cố định tại vị trí đối chứng (vạch đối chứng). Nếu dịch chiết mẫu phân có chứa kháng nguyên virus rota thì khi đưa que nhúng vào sẽ tạo thành phức hợp kháng nguyên - kháng thể - hạt vàng. Khi phức hợp này di chuyển dọc theo que nhúng tới vị trí kiểm tra hình thành một vạch màu hồng tím và thể hiện trạng thái dương tính (positive). Phần cộng hợp còn lại không gắn với kháng nguyên di chuyển tới vị trí đối chứng cho vạch màu hồng tím chứng tỏ que nhúng hoạt động bình thường, kết quả có giá trị. Như vậy khi xuất hiện cả 2 vạch hồng tím ở vạch kiểm tra và đối chứng chứng tỏ mẫu dương tính với virus rota, khi chỉ có một vạch hồng tím ở vị trí đối chứng kết luận mẫu âm tính với virus rota. Phương pháp này nhanh, đơn giản. Kỹ thuật này được đánh giá là có độ nhạy và độ đặc hiệu tốt, thời gian phân tích rất nhanh 5-10 phút, độ nhạy và độ đặc hiệu đạt khoảng từ 94-98%. Tuy nhiên, hầu hết các kit chẩn đoán dạng que thử hiện nay đều sử dụng kháng thể đơn dòng. Việc sử dụng kháng thể đơn dòng có ưu điểm là có tính đặc hiệu cao tuy nhiên lại có nhược điểm là độ nhạy thấp, đặc biệt trong trường hợp tác

nhân gây bệnh có sự biến đổi về kháng nguyên. Virus rota là chủng virus rất đa dạng về typ do đó việc sử dụng kit chẩn đoán sử dụng kháng thể đơn dòng sẽ có thể dẫn đến kết quả âm tính giả. Đặc biệt, các kit nhập ngoại có giá thành cao đồng thời có thể không phù hợp trong việc chẩn đoán chủng virus rota lưu hành tại Việt Nam do có sự thay đổi về kháng nguyên.

Bên cạnh đó, hiện nay đã có nhiều quy trình ứng dụng phương pháp sắc kí miễn dịch để tạo que thử phát hiện nhanh các loại virus, trong đó có virus rota. Bằng độc quyền sáng chế Trung Quốc số CN 101339192 B ngày 04.07.2012 mô tả quy trình tạo que thử phát hiện nhanh virus gây tiêu chảy ở lợn bằng cách gây miễn dịch để thu kháng thể đơn dòng kháng virus rota từ chuột, sau đó cộng hợp với dung dịch hạt vàng keo tụ. Quy trình này do cũng sử dụng kháng thể đơn dòng nên độ nhạy của que thử cũng tương đối thấp.

Do đó, vẫn có nhu cầu về việc tạo ra que thử phát hiện nhanh virus rota ở trong nước nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất que thử phát hiện nhanh virus rota có giá thành thấp, độ nhạy và độ đặc hiệu đạt cao, phù hợp với việc chẩn đoán các chủng virus rota lưu hành tại Việt Nam. Quy trình này bao gồm các bước:

- i) chuẩn bị mẫu huyết thanh từ thỏ và chuột lang đã được gây miễn dịch bởi virus rota toàn phần;
- ii) tinh sạch kháng thể đa dòng thỏ và chuột lang từ mẫu huyết thanh thu được ở bước (i) để thu được dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch;
- iii) cô đặc dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch thu được ở bước (ii);
- iv) điều chế dung dịch nano vàng ;
- v) tạo dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòng thỏ kháng virus rota và hạt nano vàng;
- vi) tạo miếng thấm cộng hợp bằng cách ngâm miếng thấm trong dung dịch cộng hợp (v) và sấy khô;
- vii) cố định kháng thể lên màng nitroxenluloza; và

viii) tạo que thử phát hiện nhanh virus rota.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Cấu tạo của que thử phát hiện nhanh virus rota theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất que thử phát hiện nhanh virus rota sẽ được mô tả chi tiết dưới đây lần lượt theo các bước:

- i) chuẩn bị mẫu huyết thanh từ thỏ và chuột lang đã được gây miễn dịch bởi virus rota toàn phần;
- ii) tinh sạch kháng thể đa dòng thỏ và chuột lang kháng virus rota từ mẫu huyết thanh thu được ở bước (i) để thu được dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch;
- iii) cô đặc dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch thu được ở bước (ii);
- iv) điều chế dung dịch nano vàng ;
- v) tạo dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòng thỏ kháng virus rota và hạt nano vàng;
- vi) tạo miếng thấm chứa phức cộng hợp bằng cách ngâm miếng thấm trong dung dịch cộng hợp thu được ở bước (v) và sấy khô;
- vii) cố định kháng thể lên màng nitrocellulose; và
- viii) tạo que thử phát hiện nhanh virus rota.

Các thiết bị và hóa chất gồm protein A-sepharose của Invitrogen - Mỹ, hệ thống tinh sạch tự động AKTA FPLC GE Healthcare - Mỹ. Các hóa chất và vật liệu khác được sử dụng theo giải pháp hữu ích này có bán trên thị trường do hãng Sigma hoặc Merck cung cấp. Virus rota toàn phần được sử dụng để gây miễn dịch do Trung tâm nghiên cứu sản xuất vắc xin và sinh phẩm y tế Polyvac cung cấp.

(i) chuẩn bị mẫu huyết thanh từ thỏ và chuột lang đã được gây miễn dịch bởi virus rota toàn phần

Sử dụng virus rota toàn phần gây miễn dịch trên thỏ bằng 5 mũi tiêm mỗi mũi tiêm cách nhau 14 ngày và trên chuột lang bằng 3 mũi tiêm mỗi mũi tiêm cách nhau 14

ngày. Lấy máu toàn bộ vào ngày 84 đối với thỏ và ngày 56 đối với chuột lang, sau đó trích ly lấy huyết thanh.

(ii) Tinh sạch kháng thể đa dòng thỏ và chuột lang kháng virus rota từ mẫu huyết thanh thu được ở bước (i) để thu được dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch;

Kháng thể đa dòng kháng virus rota từ huyết thanh của thỏ và chuột lang thu được ở bước (i) được tinh sạch bằng cách sử dụng sắc ký ái lực với chất mang là protein A-sepharosa trên hệ thống tinh sạch tự động AKTA FPLC. Quá trình này được tiến hành như sau:

Nạp chất mang Protein A-sepharosa lên cột, cân bằng cột bằng cách bổ sung đệm Tris-HCl nồng độ 50 mM với tỉ lệ chất mang Protein A-sepharosa:đệm Tris-HCl là 1:10 (tính theo thể tích), pH 7,5.

Nạp huyết thanh chứa kháng thể lên cột, trong đó tỉ lệ huyết thanh:protein A-sepharosa là 1:1 (tính theo thể tích), bổ sung đệm Tris-HCl nồng độ 50 mM theo tỉ lệ huyết thanh:đệm Tris-HCl là 1:30 (theo thể tích) ở pH 7,5 để rửa giải thành phần không bám cột.

Tiếp tục bổ sung dung dịch glycin pH 2,7 theo tỉ lệ huyết thanh:dung dịch glycin là 1:1 (theo thể tích) để thôi kháng thể IgG ra khỏi cột, sau đó bổ sung đệm Tris-HCl nồng độ 50mM theo tỉ lệ đệm Tris-HCl:kháng thể là 3:100 (tính theo thể tích), pH 9,0 để trung hòa để thu được dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch.

(iii) Cô đặc dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch thu được ở bước (ii)

Dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch thu được ở bước (ii) được tiến hành cô đặc và đổi đệm bằng cột Amicon 30K (Sigma). Công đoạn cô đặc dung dịch kháng thể được thực hiện nhằm cô đặc IgG để sử dụng cho các công đoạn tiếp theo. Quá trình cô đặc này được thực hiện như mô tả ở dưới đây.

Chuyển dung dịch chứa kháng thể vào cột Amicon 30K, ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C trong 30 phút cho đến khi lượng dung dịch còn lại trên cột bằng 20% so với lượng dung dịch kháng thể ban đầu.

Bổ sung thêm đệm PBS 1X lần thứ nhất với lượng bằng lượng dung dịch kháng thể ban đầu, pH 7,4, sau đó tiếp tục ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C cho đến khi lượng dung dịch còn lại trên cột bằng 20% so với lượng dung dịch kháng thể ban đầu.

Tiếp tục bổ sung thêm đệm PBS 1X lần thứ hai với lượng bằng lượng dung dịch kháng thể ban đầu và lặp lại quá trình ly tâm một lần nữa cho đến khi lượng dung dịch còn lại trên cột bằng 20% so với lượng dung dịch kháng thể ban đầu để thu được dung dịch kháng thể cô đặc có nồng độ 5mg/ml.

Kiểm tra độ sạch của kháng thể bằng điện di trên gel polyacrylamit SDS-PAGE và định lượng hàm lượng kháng thể bằng phương pháp Bradford. Bảo quản dung dịch chứa kháng thể ở -20°C để phục vụ nghiên cứu tạo que thử.

(iv) Điều chế dung dịch nano vàng

Quá trình điều chế hạt nano vàng được tiến hành như sau:

Bổ sung dung dịch HAuCl_4 1% vào nước loại ion với tỷ lệ 1:100 tính theo thể tích sau đó đun đến sôi trên máy khuấy từ có khuấy. Tiếp đó, bổ sung dung dịch trisnatri carbonat 1% với lượng bằng thể tích của dung dịch HAuCl_4 1%. Khi dung dịch xuất hiện màu tím đỏ, tiếp tục đun sôi 15 phút có khuấy. Tiến hành xác định cường độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch nano vàng ở dải sóng 450 - 600 nm. Hạt nano vàng trong dung dịch có kích thước là 40nm.

(v) Tạo dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota với hạt nano vàng

Để tạo dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota với hạt nano vàng cần chuẩn pH của dung dịch nano vàng thu được ở bước (iv) về giá trị 9,0 bằng dung dịch K_2CO_3 0,2M, sau đó bổ sung dung dịch chứa kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota thu được ở bước (iii) vào dung dịch nano vàng theo tỉ lệ kháng thể:dung dịch nano vàng là 3:100 (trọng lượng:thể tích) và ủ ở nhiệt độ phòng 1 giờ để thu được dung dịch chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota - hạt nano vàng. Với điều kiện pH là 9,0 và tỉ lệ kháng thể:dung dịch nano vàng nêu trên, kết quả thực nghiệm cho thấy rằng cường độ tín hiệu hiện lên trên que thử là rõ ràng nhất.

Tiếp đó, bổ sung dung dịch đệm chứa natri borat 20mM và BSA 10% với tỉ lệ dung dịch chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota-hạt nano vàng:dung dịch đệm là 1:10 (tính theo thể tích) và ủ 25°C trong 30 phút, ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C thu cặn chứa phức cộng hợp kháng thể - hạt nano vàng.

Rửa phức cộng hợp kháng thể đa dòng thô kháng virus rota - hạt nano vàng bằng đệm PBS 1X ở pH 7,4, trong đó thể tích đệm PBS 1X gấp 2 lần thể tích dung dịch chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòng thô kháng virus rota - hạt nano vàng, tiếp tục ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C thu cặn chứa phức cộng hợp kháng thể - hạt nano vàng.

Cuối cùng, hòa tan phức cộng hợp kháng thể đa dòng thô kháng virus rota - hạt nano vàng trong dung dịch đệm chứa natri borat 20mM, BSA 2%, sucroza 3%, NaCl 0,6M; Tween-20 0,2% với tỉ lệ phức cộng hợp kháng thể đa dòng thô-nano vàng:dung dịch đệm là 1:1 (theo thể tích) thu được dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòng thô kháng virus rota và hạt nano vàng. Đệm hòa tan phức được bổ sung thêm lực ion từ muối NaCl do đó giảm được các phản ứng không đặc hiệu, do vậy cường độ tín hiệu của que thử hiện lên rõ nhất khi được sử dụng dung dịch đệm nêu trên.

(vi) Tạo miếng thấm chứa phức cộng hợp kháng thể và hạt nano vàng

Chuẩn bị miếng thấm, sau đó ngâm miếng thấm trong dung dịch phức cộng hợp kháng thể đa dòng thô kháng virus rota và hạt nano vàng trong 5 phút. Sấy khô miếng thấm ở 42°C trong 30 phút thu được miếng thấm chứa phức cộng hợp kháng thể và hạt nano vàng.

(vii) Cố định kháng thể lên màng nitrocellulose

Các kháng thể được cố định lên màng nitrocellulose theo các bước được mô tả ở dưới đây.

Đánh dấu vị trí vạch kiểm tra (T) trên màng nitrocellulose và phun dung dịch chứa kháng thể chuột lang kháng virus rota nồng độ 5mg/ml thu được ở bước (iii) lên vị trí vạch kiểm tra của màng.

Chuẩn bị kháng thể dê kháng IgG thô (được mua thương mại trên thị trường) và đánh dấu vị trí vạch kiểm chứng (C) trên màng nitrocellulose, sau đó phun dung dịch kháng thể dê kháng IgG thô nồng độ 5mg/ml lên vị trí vạch kiểm chứng trên màng.

Cuối cùng, sấy khô màng nitrocellulose ở 42°C trong 30 phút.

(viii) Tạo que thử phát hiện nhanh virus rota

Gắn màng nitrocellulose đã được cố định kháng thể lên thanh đỡ. Gắn miếng thấm cộng hợp (vi) vào một đầu của màng nitrocellulose (vii). Gắn miếng thấm mẫu

gắn lên miếng thấm cộng hợp. Gắn miếng thấm hút vào đầu kia của màng nitroxenluloza, đối diện với vị trí gắn miếng thấm cộng mẫu. Lắp toàn bộ thành phần que thử được tạo ra như trên vào hộp chứa kèm theo tờ hướng dẫn sử dụng

Que thử theo giải pháp hữu ích là que thử hoạt động trên nguyên tắc sắc ký miễn dịch chứa hai kháng thể đa dòng kháng virus rota được sản xuất trên hai động vật khác nhau là thỏ và chuột lang và một kháng thể đa dòng dê kháng IgG thỏ.

Nguyên lý như sau: kháng thể thứ nhất (kháng thể thỏ kháng virus rota) được gắn cộng hợp với các hạt vàng dạng keo tụ và được hấp phụ trên miếng cộng hợp. Kháng thể thứ hai (kháng thể chuột lang kháng virus rota) được cố định tại vị trí vạch kiểm tra của que thử. Kháng thể thứ ba kháng kháng thể thứ nhất trong phức hợp cộng hợp vàng được cố định tại vị trí vạch kiểm chứng. Nếu dịch chiết mẫu phân có chứa kháng nguyên virus rota thì khi nhỏ vào que thử sẽ tạo thành phức hợp kháng nguyên - kháng thể 1 (kháng thể đa dòng thỏ kháng virus rota) - hạt nano vàng. Khi phức hợp này di chuyển dọc màng nitroxenluloza nhờ đặc tính mao dẫn tới vạch kiểm tra sẽ tạo thành phức hợp kháng thể 2 (kháng thể đa dòng chuột lang kháng virus rota) - kháng nguyên - kháng thể 1 (kháng thể đa dòng thỏ kháng virus rota) - hạt nano vàng hình thành một vạch màu hồng tía và thể hiện trạng thái dương tính. Phần cộng hợp còn lại không gắn với kháng nguyên di chuyển tới vạch đối chứng và bị bắt lại bởi kháng thể 3 (kháng thể dê kháng IgG thỏ) sẽ cho vạch màu hồng tía chứng tỏ que thử hoạt động bình thường. Như vậy, khi xuất hiện cả 2 vạch hồng tía ở vạch kiểm tra và vạch kiểm chứng chứng tỏ mẫu dương tính với virus rota, khi chỉ có một vạch hồng tía ở vị trí đối chứng kết luận mẫu âm tính với virus rota.

Cách thức sử dụng que thử: đặt que thử nằm ngang, nhỏ 0,1 ml mẫu (3-5 giọt) vào vị trí nạp mẫu được đánh dấu trên que thử, quan sát và đọc kết quả sau 3-5 phút.

Que thử theo giải pháp hữu ích hiện đang được lưu giữ trong túi thiếc tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất 100 que thử phát hiện nhanh virus rota

i) Tạo chuẩn bị mẫu huyết thanh từ thỏ và chuột lang đã được gây miễn dịch bởi virus rota toàn phần

Gây miễn dịch với virus rota toàn phần bằng cách tiêm thỏ bằng 5 mũi tiêm và chuột lang bằng 3 mũi tiêm, mỗi mũi tiêm cách nhau 14 ngày. Lấy máu toàn phần vào ngày 84 đối với thỏ và ngày 56 đối với chuột lang. Trích ly lấy huyết thanh bằng phương pháp ly tâm 500-1000 vòng/phút hoặc để lắng.

ii) Tinh sạch kháng thể đa dòng thỏ và chuột lang từ huyết thanh thu được ở bước i) để thu được dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch

Nạp 1ml chất mang Protein A-sepharosa lên cột, cân bằng cột bằng 10ml đệm Tris-HCl 50mM, pH 7,5. Nạp 1ml huyết thanh chứa kháng thể lên cột. Rửa giải thành phần không bám cột bằng 30ml đệm 50mM Tris-HCl, pH 7,5. Thôi kháng thể IgG ra khỏi cột bằng 1ml dung dịch glycin pH 2,7, sau đó thu được 1ml dung dịch kháng thể.

Trung hòa dung dịch kháng thể bằng 0,03 ml đệm Tris-HCl, pH 9,0 để thu được dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch.

iii) Cô đặc dung dịch chứa kháng thể thu được ở bước (ii)

Chuyển 1ml dung dịch chứa kháng thể vào cột Amicon 30K, ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C trong 30 phút cho đến khi còn lại 0,2ml dung dịch trên cột.

Bổ sung thêm 1ml đệm PBS 1X lần thứ nhất, pH 7,4, sau đó tiếp tục ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C cho đến khi còn lại 0,2ml dung dịch trên cột.

Tiếp tục bổ sung thêm 1ml đệm PBS 1X lần thứ hai và lặp lại quá trình ly tâm một lần nữa cho đến khi còn lại lượng dung dịch còn lại trên cột bằng 0,2ml để thu được dung dịch kháng thể cô đặc.

Kiểm tra độ sạch của kháng thể bằng điện di trên gel polyacrylamide SDS-PAGE. Định lượng hàm lượng kháng thể bằng phương pháp Bradford. Bảo quản kháng thể ở -20°C để phục vụ nghiên cứu tạo que thử.

iv) Điều chế dung dịch nano vàng

Chuẩn bị các dung dịch: HAuCl_4 1% và tris(tributylammonium) carbonate 1%.

Cho 1 ml dung dịch HAuCl_4 1% vào chai Duran dung tích 250 ml chứa 100 ml nước loại ion. Đun đến sôi trên máy khuấy từ có khuấy. Bổ sung 1ml dung dịch tris(tributylammonium) carbonate 1%. Khi dung dịch xuất hiện màu tím đỏ, tiếp tục đun sôi 15 phút có khuấy. Xác định cường độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch nano vàng ở dải sóng 450 – 600 nm. Kích thước hạt nano vàng trong dung dịch là 40nm.

v) Tạo dung dịch cộng hợp kháng thể chống virus rota và hạt nano vàng:

Điều chỉnh 1ml dung dịch nano vàng về pH 9,0 bằng K_2CO_3 . Bổ sung 30 μg kháng thể đa dòng chống virus rota, trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 1 giờ.

Bổ sung 10ml dung dịch đệm chứa natri borat 20mM và BSA 10% đạt nồng độ cuối cùng 1%, ủ ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 30 phút, ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C thu cặn chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòng chống virus rota - hạt nano vàng.

Rửa phức cộng hợp kháng thể đa dòng chống virus rota và hạt nano vàng (Ab-AuNP) bằng 2ml đệm 1X PBS, pH 7,4. Ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C thu được 1ml cặn chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòng chống virus rota - hạt nano vàng.

Hòa tan 1ml phức cộng hợp trong 1ml đệm chứa natri borat 20mM, BSA 2%, sucroza 3%, NaCl 0,6M và Tween-20 0,2% để thu được 2ml dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòng chống virus rota - hạt nano vàng.

vi) Tạo miếng thấm chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòng chống virus rota - hạt nano vàng.

Ngâm miếng thấm có kích thước chiều dài 60cm, chiều rộng 0,3cm trong dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòng chống virus rota - hạt nano vàng trong 5 phút.

Sấy khô ở 42°C , trong 30 phút. Bảo quản trong túi chân không ở điều kiện $4-30^\circ\text{C}$.

vii) Cố định kháng thể lên màng nitrocellulose

Đánh dấu vị trí vạch kiểm tra (T) trên màng nitroxenluloza (kích thước 30x2cm) và phun dung dịch chứa kháng thể chuột lang kháng virus rota nồng độ 5mg/ml thu được ở bước ii) lên vị trí vạch kiểm tra của màng.

Chuẩn bị kháng thể dê kháng IgG thô (được mua thương mại trên thị trường) và đánh dấu vị trí vạch kiểm chứng (C) trên màng nitroxenluloza, sau đó phun kháng thể dê kháng IgG thô nồng độ 5mg/ml lên vị trí vạch kiểm chứng trên màng.

Cuối cùng, sấy khô màng nitroxenluloza ở 42°C trong 30 phút và bảo quản trong túi chân không ở điều kiện 4-30°C.

viii) Tạo que thử phát hiện nhanh virus rota

Gắn miếng thấm chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòng thô kháng virus rota - hạt nano vàng (vi) vào vị trí xác định trên thanh đỡ sao cho miếng thấm chụm lên phần màng nitroxenluloza (vii) 1mm.

Gắn miếng thấm mẫu vào một đầu của thanh đỡ sao cho miếng thấm mẫu chụm lên miếng thấm chứa phức cộng hợp (vi) khoảng 3mm.

Gắn miếng thấm hút đầu còn lại của thanh đỡ sao cho miếng thấm hút chụm lên phần màng nitroxenluloza (vii) 1mm.

Đưa toàn bộ phức hợp trên vào máy cắt, đặt chế độ cắt với kích thước 3 mm theo chiều rộng của que thử để cắt thành 100 que thử.

Gắn que thử vào hộp chứa, đưa vào túi thiếc chứa gói hút ẩm và hàn kín kèm theo tờ hướng dẫn sử dụng.

Bảo quản que thử ở điều kiện 4-30°C.

Ví dụ 2: Phát hiện virus rota trong mẫu chuẩn sử dụng que thử

Cắt túi thiếc đã hàn kín, lấy que thử và đặt nằm ngang lên mặt phẳng. Nhỏ từ từ 3 giọt dung dịch virus chuẩn vào vị trí nạp mẫu trên que thử. Quan sát kết quả trong 3-5 phút.

Kết quả sẽ xuất hiện hai vạch màu hồng tím tại vị trí T (vạch kiểm tra) và C (vạch kiểm chứng) trên que thử. Nếu chỉ xuất hiện vạch màu hồng tím tại vị trí T (vạch kiểm tra) hoặc không xuất hiện vạch nào trên que thử thì que thử là hồng.

Ví dụ 3: Phát hiện virus rota trong mẫu phân bệnh phẩm sử dụng que thử

Chuẩn bị dung dịch đệm chứa PBS 1X, NaCl 0,1M và Tween-20 0,5%.

Cắt túi thiếc đã hàn kín, lấy que thử và đặt nằm ngang lên mặt phẳng. Dùng tăm bông lấy một lượng nhỏ mẫu phân (50-200 mg) nhúng vào ống dung dịch đệm và khuấy đều. Để dung dịch lắng trong 5 phút. Dùng pipet pasteur hút dịch trong nhỏ từ từ 3 giọt vào vị trí nạp mẫu trên que thử.

Đọc kết quả trong 3 - 5 phút.

+ Nếu xuất hiện hai vạch màu hồng tía tại vị trí T (vạch kiểm tra) và C (vạch kiểm chứng) trên que thử thì mẫu là dương tính.

+ Nếu chỉ xuất hiện một vạch màu hồng tía tại vị trí C (vạch kiểm chứng) trên que thử thì mẫu là âm tính.

+ Nếu chỉ xuất hiện một vạch màu hồng tía tại vị trí T (vạch kiểm tra) hoặc không xuất hiện vạch nào trên que thử thì que thử là hỏng.

Ví dụ 4: Kiểm tra phản ứng chéo của que thử

Chuẩn bị dung dịch đệm chứa PBS 1X, NaCl 0,1M và Tween-20 0,5%.

Chuẩn bị các dung dịch vi sinh vật kiểm nghiệm (*Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium sporogenes*, *Candida albicans*, *Vibrio haemolyticus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, Poliovirus I, II, III).

Cắt túi thiếc đã hàn kín, lấy que thử và đặt nằm ngang lên mặt phẳng. Hút dịch vi sinh vật kiểm nghiệm vào ống dung dịch đệm và khuấy đều. Dùng pipet pasteur hút dịch trong nhỏ từ từ 3 giọt vào vị trí nạp mẫu trên thanh que thử

Đọc kết quả trong 3 - 5 phút. Kết quả chỉ thấy xuất hiện vạch màu hồng tía tại vị trí C (vạch kiểm chứng) trên que thử. Điều này chứng tỏ que thử không phản ứng chéo với các vi sinh vật kiểm nghiệm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích nhằm tạo ra được que thử phát hiện nhanh virus rota với các công đoạn đơn giản, sử dụng nguồn kháng thể đa dòng tự sản xuất phù hợp với các typ virus rota hiện đang lưu hành tại Việt Nam. Que thử được tạo ra theo quy trình này có khả năng phát hiện nhanh (3-5 phút) virus rota trong mẫu phân bệnh phẩm. Độ nhạy và độ đặc hiệu đạt 100%, cao hơn so với các kit thương mại hiện

nay (94-98%). Ngưỡng phát hiện là $1,6 \times 10^4$ hạt virus/ml. Do sử dụng nguồn kháng thể tự sản xuất nên có thể chủ động được nguồn sinh phẩm đồng thời giá thành thấp hơn các kit nhập ngoại đang lưu hành trên thị trường nên có thể dễ dàng áp dụng trong thực tế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất que thử phát hiện nhanh virus rota bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu huyết thanh từ thỏ và chuột lang đã được gây miễn dịch bởi virus rota toàn phần;

ii) tinh sạch kháng thể đa dòng thỏ và chuột lang từ mẫu huyết thanh thu được ở bước (i) bằng cách sử dụng sắc ký ái lực với chất mang là Protein A-sepharosa trên hệ thống tinh sạch tự động AKTA FPLC:

 nạp chất mang Protein A-sepharosa lên cột, cân bằng cột bằng cách bổ sung đệm Tris-HCl nồng độ 50 mM với tỉ lệ chất mang Protein A-sepharosa:đệm Tris-HCl là 1:10 (tính theo thể tích), pH 7,5;

 nạp huyết thanh chứa kháng thể lên cột, trong đó tỉ lệ huyết thanh:protein A-sepharosa là 1:1 (tính theo thể tích), bổ sung đệm Tris-HCl nồng độ 50 mM theo tỉ lệ huyết thanh:đệm Tris-HCl là 1:30 (theo thể tích) ở pH 7,5 để rửa giải thành phần không bám cột;

 bổ sung dung dịch glycine pH 2,7 theo tỉ lệ huyết thanh:dung dịch glycine là 1:1 (theo thể tích) để thôi kháng thể IgG ra khỏi cột;

 bổ sung đệm Tris-HCl nồng độ 50mM theo tỉ lệ đệm Tris-HCl:kháng thể là 3:100 (tính theo thể tích), pH 9,0 để thu được dung dịch chứa kháng thể đã được tinh sạch;

iii) cô đặc dung dịch chứa kháng thể đã tinh sạch thu được ở bước ii) bằng cách:

 chuyển dung dịch chứa kháng thể thu được ở bước ii) vào cột Amicon 30K, ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C trong 30 phút cho đến khi lượng dung dịch còn lại trên cột bằng 20% so với lượng dung dịch kháng thể ban đầu;

 bổ sung thêm đệm PBS 1X lần thứ nhất với lượng bằng lượng dung dịch kháng thể ban đầu, pH 7,4, sau đó tiếp tục ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C cho đến khi cho đến khi lượng dung dịch còn lại trên cột bằng 20% so với lượng dung dịch kháng thể ban đầu;

 tiếp tục bổ sung thêm đệm PBS 1X lần thứ hai với lượng bằng lượng dung dịch kháng thể ban đầu và lặp lại quá trình ly tâm một lần nữa cho đến khi cho đến khi lượng dung dịch còn lại trên cột bằng 20% so với lượng dung dịch kháng thể ban đầu

để thu được dung dịch kháng thể cô đặc có nồng độ 5mg/ml, bảo quản dung dịch kháng thể đã cô đặc ở -20°C;

iv) điều chế dung dịch nano vàng bằng cách bổ sung dung dịch HAuCl 1% vào nước loại ion theo tỉ lệ 1:100 (theo thể tích) và đun sôi, sau đó bổ sung dung dịch trisnatri carbonat 1% với lượng bằng thể tích của dung dịch HAuCl 1%, trong đó kích thước hạt nano vàng trong dung dịch là 40nm;

v) tạo dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota và hạt nano vàng bằng cách

bổ sung dung dịch chứa kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota thu được ở bước iii) vào dung dịch nano vàng thu được ở bước iv) theo tỉ lệ 3:100 (trọng lượng:thể tích) ở pH 9,0; ủ phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ thu được dung dịch chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota - hạt nano vàng;

bổ sung dung dịch đệm chứa natri borat 20mM và BSA 10% với tỉ lệ dung dịch chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota-hạt nano vàng:dung dịch đệm là 1:10 (tính theo thể tích) và ủ 25°C trong 30 phút, ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C thu cặn chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota - hạt nano vàng;

rửa phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota - hạt nano vàng bằng đệm PBS 1X ở pH 7,4, trong đó thể tích đệm PBS 1X gấp 2 lần thể tích dung dịch chứa phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota - hạt nano vàng, tiếp tục ly tâm 7500 vòng/phút ở 4°C thu cặn chứa phức cộng hợp kháng thể - hạt nano vàng;

hòa tan phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota-hạt nano vàng trong dung dịch đệm chứa natri borat 20mM, BSA 2%, sucroza 3%, NaCl 0,6M; Tween-20 0,2% với tỉ lệ phức cộng hợp kháng thể đa dòngỏ-thỏ-nano vàng:dung dịch đệm là 1:1 (theo thể tích) thu được dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota và hạt nano vàng;

vi) tạo miếng thấm chứa phức cộng hợp đa dòngỏ kháng virus rota - hạt nano vàng bằng cách ngâm miếng thấm trong dung dịch cộng hợp kháng thể đa dòngỏ kháng virus rota và hạt nano vàng thu được ở bước v) trong 5 phút và sấy khô ở 42°C trong 30 phút;

vii) cố định kháng thể lên màng nitroxenluloza bằng cách:

đánh dấu vị trí vạch kiểm tra (T) trên màng nitroxenluloza và phun dung dịch chứa kháng thể chuột lang kháng virus rota nồng độ 5mg/ml thu được ở bước iii) lên vị trí vạch kiểm tra của màng;

chuẩn bị kháng thể dê kháng IgG thỏ và đánh dấu vị trí vạch kiểm chứng (C) trên màng nitroxenluloza, sau đó phun kháng thể dê kháng IgG thỏ nồng độ 5mg/ml lên vị trí vạch kiểm chứng trên màng;

sấy khô màng nitroxenluloza ở 42°C trong 30 phút; và

viii) tạo que thử phát hiện nhanh virus rota bằng cách gắn miếng thấm cộng hợp thu được ở bước (vi) vào một đầu của màng nitroxenluloza thu được ở bước (vii), sau đó gắn miếng thấm mẫu gói lên miếng thấm cộng hợp (vi) và miếng thấm hút vào đầu kia của màng nitroxenluloza (vii), cuối cùng lắp toàn bộ thành phần que thử đã được tạo ra như trên vào hộp chứa kèm tờ hướng dẫn sử dụng.

Hình 1