

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO IgG THỎ KHÁNG VI RÚT BANNA CHỦNG 05VN255 GẮN ENZYME HORSERADISH PEROXIDASE

NGUYỄN THỊ TUẤN - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
PHAN THỊ NGÀ - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

TÓM TẮT

Vi rút Banna một vi rút Colti nhóm B thuộc họ Reoviridae mới được phát hiện tại Việt Nam năm 2005, cho đến nay chưa có sinh phẩm cho các phương pháp ELISA để chẩn đoán. Mục tiêu của nhóm nghiên cứu là tinh chế IgG thỏ kháng vi rút Banna chủng 05VN255 từ huyết thanh thỏ toàn phần và chế tạo cộng hợp IgG thỏ kháng vi rút Banna chủng 05VN255 gắn enzyme HRPO

Từ 40ml huyết thanh thỏ toàn phần kháng vi rút Banna được sử dụng để tinh chế IgG thỏ bằng bộ kit Mab Trap, sử dụng IgG thỏ tinh chế để gắn enzyme HRPO. Kết quả đã tinh chế được 4ml IgG thỏ kháng vi rút Banna, hàm lượng protein ~10mg/ml. Tạo được 2ml cộng hợp từ 1ml IgG thỏ kháng vi rút Banna, cộng hợp IgG thỏ kháng vi rút Banna rất tinh khiết với giá trị OD blank và mẫu chứng âm <0,05 (tiêu chuẩn cho phép ≤ 0,02), rất đặc hiệu với vi rút Banna.

Từ khoá: Vi rút Banna, IgG.

SUMMARY

Banna virus belongs to Reoviridae, which has just discovered in Viet nam of patient in 2005, so reagents for diagnosis by ELISA techniques is not available. Objective: Purification of rabbit IgG anti Banna virus and preparation of conjugate label HRPO enzyme. From 40ml of rabbit whole molecular sera anti Banna was used for purification of rabbit IgG by Mab Trap kit, using purified rabbit IgG anti Banna for labeling HRPO enzyme. Results: produced 4ml of rabbit IgG anti Banna virus were purified with protein contain ~18.74mg/ml. 2ml of conjugate were prepared from 1ml of rabbit IgG anti Banna virus. The conjugate is purity OD of negative control and blank < 0.050 (criteria < 0.200) and specific with Banna virus.

Keywords: Banna virus, rabbit IgG.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Năm 2005, có một chủng vi rút mới được phân lập từ dịch não tủy một bé gái bị hội chứng não cấp ở Gia Lai. Đây là chủng vi rút lần đầu tiên gây bệnh ở Việt Nam, chủng vi rút có ký hiệu 05VN255 và có vật liệu di truyền tương tự vi rút Banna, vi rút đã gây bệnh ở Trung Quốc và Indonesia những năm 80 của thế kỷ trước. Cho đến nay đã phát hiện ra 12 chủng vi rút Banna ở Việt Nam từ dịch não tủy và muỗi ở một số tỉnh miền Bắc, miền Trung, miền Nam và Tây Nguyên [3]. Để xác định vai trò gây bệnh của vi rút Banna bằng các kỹ thuật chẩn đoán miễn dịch, phục vụ giám sát huyết thanh học cần có sinh phẩm. Do vậy nghiên cứu chế tạo sinh phẩm cho chẩn đoán và giám sát sự lưu hành của vi rút Banna là một vấn đề cấp thiết. Chính vì vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

Tinh chế IgG thỏ kháng vi rút Banna chủng 05VN255 từ huyết thanh thỏ toàn phần.

Chế tạo cộng hợp IgG thỏ kháng vi rút Banna chủng 05VN255 gắn enzyme HRPO.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu huyết thanh: 40ml huyết thanh thỏ toàn phần kháng vi rút Banna chủng 05VN255

Dung dịch: 10mM sodium carbonate, 0,2M sodium carbonate, 1mM sodium acetate, PBS (-) và các dung dịch cần thiết khác cho kỹ thuật ELISA.

Hoá chất: HRPO, NaIO₄, NaBH₄, BSA, cơ chất TMB và các hoá chất cần thiết khác.

Trang thiết bị và dụng cụ: Bộ kit tách chiết IgG từ huyết thanh toàn phần (Mab-Trap kit) của Amersham Biocience AB, Thụy Điển, hộp thẩm tích (dialysis cassette) của Perbio, bơm nhu động, giá đỡ cột tách chiết, máy quay điện tử, máy quang phổ, máy đọc ELISA và các dụng cụ cần thiết khác.

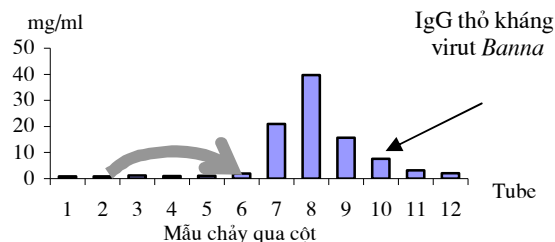
Phương pháp

Tinh chế IgG từ huyết thanh thỏ toàn phần: huyết thanh thỏ toàn phần được bất hoạt 56°C/30 phút. IgG kháng vi rút Banna được tinh chế từ huyết thanh thỏ toàn phần bằng bộ kit tách chiết Mab-Trap. Quá trình tinh chế IgG từ huyết thanh thỏ toàn phần được thực hiện theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm. Hàm lượng protein (mg/ml) của IgG thỏ kháng vi rút Banna được đo bằng máy quang phổ Eppendorf (Pháp), tính theo công thức: giá trị OD₂₈₀ x 1,45 - giá trị OD₂₆₀ x 0,75.

Gắn HRPO với IgG thỏ kháng vi rút Banna theo phương pháp của Wilson và Nakane [6],[7]. Kiểm tra IgG thỏ kháng vi rút Banna và cộng hợp theo nguyên kỹ thuật ELISA Sandwich [2]. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA với bước sóng 492nm/620nm. Hiệu giá kháng nguyên vi rút được xác định gián tiếp bằng giá trị mật độ quang học với điều kiện OD của chứng âm, OD của blank ≤ 0,02, tỷ số của OD mẫu chứng dương/ OD chứng âm ≥ 3 [1].

KẾT QUẢ

Sử dụng bộ kit Mab-Trap để tinh chế IgG, thu hồi mẫu trong quá trình tách chiết 1ml/tube, nồng độ protein trong quá trình tinh chế được biểu thị như sau:



Hình 1. Tinh chế IgG thỏ kháng virus Banna bằng bộ kit MAb Trap

Tube 1, 2, 3, 4, 5, 6, là mẫu thu hồi trong giai đoạn cho mẫu huyết thanh chảy qua cột, IgG thô của huyết thanh sẽ gắn vào protein G còn albumin và các thành phần khác của huyết thanh sẽ bị loại ra. Các tube số 7, số 8, số 9, số 10 là mẫu thu hồi trong giai đoạn sử dụng dung dịch tách chiết IgG ra khỏi protein G, ở các tube này protein đo được là IgG thô kháng vi rút Banna được tinh chế bằng cột Hi Trap với nồng độ protein (mg/ml) ở các tube lần lượt như sau: 20,921; 39,668; 15,644; 7,563. Trộn các tube số 7, 8, 9, 10 được 4ml IgG thô kháng vi rút Banna chủng 05VN255, hàm lượng protein ~ 18,74mg/ml.

Pha loãng IgG thô kháng vi rút Banna có hàm lượng protein 18,74mg/ml thành dung dịch IgG có hàm lượng ~ 10mg/ml. Dùng 1ml IgG thô đã pha loãng này để gắn enzyme HRPO để tạo thành 2ml cộng hợp IgG thô kháng vi rút Banna. Kiểm tra độ đặc hiệu và độ tinh khiết của cộng hợp bằng kỹ thuật ELISA Sandwich để phát hiện kháng nguyên vi rút Banna, cho thấy IgG thô kháng vi rút Banna và cộng hợp gắn HRPO không có phản ứng chéo với vi rút viêm não Nhật Bản, thể hiện qua giá trị OD là: 0,155; 0,123; 0,067 tương ứng với các nồng độ cộng hợp 1/1000, 1/2000, 1/4000; ngược lại rất đặc hiệu với mẫu chứng dương vi rút Banna với giá trị OD là: 3,754; 2,766; 1,807 tương ứng với các nồng độ cộng hợp 1/1000, 1/2000, 1/4000.

Bảng 1. OD của các mẫu kiểm tra với cộng hợp IgG thô kháng virut Banna

Hiệu giá cộng hợp	OD mẫu vi rút VNNB	OD mẫu vi rút Banna	OD mẫu tế bào không gây nhiễm	OD của blank
1000	0,155	3,754	0,054	0,032
2000	0,123	2,766	0,045	0,037
4000	0,067	1,807	0,053	0,045
8000	0,064	0,897	0,047	0,041
16000	0,056	0,456	0,034	0,044
32000	0,044	0,280	0,034	0,049

Độ tinh khiết của cộng hợp được xác định gián tiếp qua giá trị OD của mẫu chứng âm (Mẫu nước nổi tế C6/36 không gây nhiễm vi rút) và các giếng Blank, ở những mẫu này giá trị OD rất thấp từ 0,032 đến 0,049 với các nồng độ cộng hợp từ 1/1000 đến 1/32000. Theo kết quả chuẩn độ, xác định IgG thô kháng vi rút Banna dùng để gắn bản là 2mg/ml, cộng hợp IgG thô kháng vi rút Banna gắn HRPO có thể sử dụng cho kỹ thuật ELISA Sandwich để phát hiện kháng nguyên vi rút ở độ pha loãng 1/2000, đây là cộng hợp sử dụng cho kỹ thuật MAC-ELISA để phát hiện kháng thể IgM kháng vi rút Banna và kỹ thuật INDIRECT- ELISA phát hiện IgG kháng vi rút Banna trong chẩn đoán huyết thanh học.

BÀN LUẬN

Có rất nhiều phương pháp tinh chế IgG từ huyết thanh. Trước đây các phòng xét nghiệm trên thế giới hay dùng phương pháp cổ điển: IgG trong huyết thanh được tủa bằng ammonium sulfate bão hòa trong đệm photphate pH=7,4; tách chiết và tinh chế

IgG từ huyết thanh theo phương pháp này phức tạp, mất nhiều thời gian khoảng 2 ngày và sử dụng nhiều dung dịch, hoá chất trong quá trình thực hiện [5],[6].

Những năm gần đây có nhiều bộ kit tách chiết được thương mại hoá trên thị trường với việc sử dụng protein A hoặc protein G làm cột Hi Trap để tóm bắt IgG từ huyết thanh và thu hồi IgG tinh khiết. Trong nghiên cứu này sử dụng bộ kit Mab-Trap đã tinh chế được 4ml IgG thô kháng vi rút Banna có nồng độ protein ~18,74 mg/ml, cột Hi Trap được đóng gói sẵn với 1ml protein G đã tinh chế được hàm lượng protein tối đa như hiệu suất tinh chế đã ghi nhận từ nhà sản xuất bộ kit.

Các enzyme thường sử dụng để làm cộng hợp như biotin, alalin photphat, HRPO... nhưng HRPO thường được sử dụng vì HRPO có nguồn gốc thực vật, giá thành không cao, mặt khác đây là enzyme đã thương mại hoá [4]. Việc sử dụng HRPO để gắn IgG thô kháng vi rút Banna để chế tạo cộng hợp có độ nhạy, độ tinh khiết cao và độ đặc hiệu cao. Sử dụng sinh phẩm chế tạo được cho kỹ thuật ELISA Sandwich ở độ pha loãng 1/2000 là tốt nhất vì mật độ quang cao và ổn định giúp ứng dụng để phát hiện nhanh vi rút Banna [4].

Việc chế tạo thành công IgG thô và cộng hợp kháng vi rút Banna là cơ sở cho việc xây dựng kỹ thuật MAC- ELISA để phát hiện IgM và INDIRECT-ELISA phát hiện IgG kháng vi rút Banna giúp cho chẩn đoán và giám sát huyết thanh học sự nhiễm vi rút được nhanh chóng và chính xác.

KẾT LUẬN

1. Từ 40ml huyết thanh thô toàn phần đã tinh chế được 4ml IgG thô kháng vi rút Banna chủng 05VN255 có nồng độ protein ~18,74mg/ml bằng bộ kit Mab Trap. IgG thô kháng vi rút Banna tinh khiết dùng cho kỹ thuật ELISA Sandwich 2µg/ml.

2. Chế tạo thành công 2ml cộng hợp IgG thô kháng vi rút Banna gắn HRPO có hiệu giá cao, đặc hiệu sử dụng cho kỹ thuật ELISA Sandwich ở độ pha loãng 1/2000, đây cũng là cộng hợp sử dụng cho kỹ thuật MAC- ELISA và INDIRECT- ELISA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phan Thị Ngà, Nguyễn Hạnh Phúc (2006), Nghiên cứu chế tạo IgG thô kháng chủng vi rút Nam Định gắn enzyme Horseradish peroxidase, Tạp chí nghiên cứu Y học, số 42(3), trang: 20-22.
- Phan Thị Ngà, Đỗ Phương Loan, Nguyễn Viết Hoàng, Bùi Minh Trang, Lê Thị Hiền Thu, Tomohiko Takasaki (2008), Đánh giá chất lượng bộ sinh phẩm MAC-ELISA chẩn đoán viêm não Nhật Bản do viện vệ sinh dịch tễ sản xuất, tạp chí Y học dự phòng, số 4(96), trang 55-59.
- Phan Thị Ngà, Đoàn Hải Yến, Phạm Đỗ Quyên, Kouichi Morita (2005), Chế tạo kháng nguyên vi rút Nam Định góp phần chẩn đoán căn nguyên vi rút gây hội chứng não cấp, 1998-2004, tạp chí y học dự phòng, số 5(76), trang 62-66.
- Chang-HC., Takashima-I., Arikawa-J., Hashimoto-N.,(1984), Biotin-labeled protein A enzyme linked

immunosorbent assay for the detection of Japanese encephalitis antibody in sera from human, swine and several animal species, *Journal Virology Method*, No9(2), p:143-15.

5. Martin D. A., Muth D A., Brown T. Johnson A. J., Karabatsos N and Roehrig J. T, Standardization of immunoglobulin M capture enzyme linked immunosorbent assay for routine diagnosis of Arbovirus infection, *Journal of Clinical Microbiology*, p: 1823-1826.

6. Roodbari F., Roustai M. H., Mostafaie A., Soleimanjdahi H., Foroshani R. S. and Sabahi F., Development of an enzyme- linked immunoglobulin M antibodies against measles virus, *Clinical and Diagnosis laboratory Immunology*, Vol.10, No3, p: 439-442.

7. Bundo K., Igarashi A. (1985): Antibody capture ELISA for detection of immunology M antibodies in sera from JE and Dengue hemorrhagic fever patients. *Journal Virol Methods*, p:11(1),15-22.