

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ KHÁNG PROGESTERON TRÊN THỎ ĐỂ CHẨN ĐOÁN CÓ THAI SỚM VÀ BỆNH SINH SẢN CỦA BÒ SỮA

Nguyễn Đức Hùng^{1*}, Nguyễn Mạnh Hà², Nguyễn Thị Huế²

¹Đại học Thái Nguyên,

²Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

4 thỏ khỏe mạnh, có khối lượng từ 2,5 kg trở lên, không tiêm vaccine phòng bệnh, được dùng gây miễn dịch cơ sở bằng cách tiêm kháng nguyên P3 - BSA vào dưới da với liều 200 µg vào các ngày 1, 21, 31 và lấy mẫu máu vào các ngày 1, 15, 21, 28, 31, 38 và 45 để kiểm tra đáp ứng miễn dịch bằng phản ứng Elisa. Đã có 3 thỏ có đáp ứng miễn dịch với P3 - BSA. 2 trong 3 thỏ có đáp ứng tốt trong gây miễn dịch cơ sở nêu trên được chọn để gây tối miễn dịch bằng cách tiêm P3 - BSA vào các ngày 60, 74, 88 kể từ khi bắt đầu gây miễn dịch cơ sở và lấy mẫu máu vào các ngày 60, 65, 70, 74, 79, 83, 88, 90, 95 để kiểm tra đáp ứng miễn dịch. Kết quả cho thấy, nồng độ kháng thể kháng progesteron trong mẫu máu của thỏ được gây tối miễn dịch có xu hướng tăng với sự gia tăng của số ngày gây nhiễm và giảm với sự gia tăng của nồng độ pha loãng huyết thanh, và sự có mặt của kháng thể kháng progesteron vẫn có thể xác định được khi mẫu được pha loãng 1000 lần. Điều đó chứng tỏ kháng nguyên P3 - BSA được tạo ra từ thí nghiệm đã gây được đáp ứng miễn dịch cho thỏ, những thỏ có đáp ứng miễn dịch cơ sở thì cũng có đáp ứng trong gây tối miễn dịch.

Sử dụng phương pháp tách chiết kháng thể qua cột tgel đã tách chiết được kháng thể kháng progesteron từ mẫu huyết thanh thỏ được gây tối miễn dịch. Tất cả mẫu huyết thanh thỏ được gây tối miễn dịch bằng P3 - BSA đều chứa kháng thể kháng progesteron.

Từ khóa:

TÍNH CẤP THIẾT CỦA NGHIÊN CỨU

Chẩn đoán có thai sớm và bệnh sinh sản ở bò là một làm hết sức quan trọng, góp phần quyết định nâng cao năng suất sữa và khả năng sinh sản của bò sữa. Một trong các kỹ thuật đã và đang được áp dụng đó là kỹ thuật ELISA. Phương pháp miễn dịch enzym (EIA - P4) là một kỹ thuật ELISA dùng để định lượng hormon progesteron để chẩn đoán có thai sớm và chẩn đoán các bệnh ở buồng trứng như buồng trứng có thể vàng tồn lưu, u nang buồng trứng, buồng trứng kém phát triển...

Progesteron (P4) là hormon steroid chủ yếu do thể vàng của buồng trứng và một phần do nhau thai tiết ra (khi mang thai), là hormon có vai trò rất lớn trong việc điều hoà chức năng sinh dục và mang thai của gia súc cái. Marcus G J và cs (1986) [2] cho biết hàm lượng Progesteron trong máu (huyết thanh) hoặc trong sữa là bức tranh phản ánh tình trạng mang thai và hoạt động của buồng trứng. Vì thế, các nước tiên tiến trên thế giới đã chế ra được bộ Kít để chẩn đoán có thai sớm cũng

như các bệnh của buồng trứng, nhưng trên thực tế nước ta vẫn phải nhập bộ Kít này với giá thành cao, luôn bị động trong nghiên cứu.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chế ra một trong các thành phần cấu thành nên bộ Kít này để chẩn đoán có thai sớm hoặc các rối loạn về sinh sản trên bò sữa tại Việt Nam, trong đó thành phần quan trọng không thể thiếu được là tạo kháng thể kháng Progesteron.

ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

- Thỏ khỏe mạnh, khối lượng từ 2,5 kg trở lên, không tiêm vaccin phòng bệnh

Mẫu nghiên cứu

- Huyết thanh thỏ sau khi gây miễn dịch và tối miễn dịch

- Kháng thể sau khi chạy cột tgel

Hóa chất và dụng cụ nghiên cứu

Hóa chất dùng để chạy cột tgel

- Dung dịch rửa: binding buffer gồm (potassium sulphate + sodium phosphate)

* Tel: 0912 004885

- Dung dịch tách kháng thể: Elution gồm sodium photphat
- Dung dịch phục hồi: Regeneration solution là Guanidin
- Dung dịch bảo quản tgel: (Storage buffer) gồm tris HCl

Hóa chất cho phản ứng Elisa

- Dung dịch gắn kháng nguyên – Coating buffer (Carbonate buffer) gồm: NaHCO_3 + Na_2CO_3 .
- PBS – (Phosphate Buffer Saline) gồm NaCl , KCl , Na_2HPO_4 (hoặc $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hoặc $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), KH_2PO_4 .
- Dung dịch phủ đệm: 2% sữa (sữa bột tách bơ) trong PBS.
- Antirabbit – (HRP conjugate; HRP: Horse Radish Peroxydase).
- TMB (3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine) dung dịch chất nền (cơ chất), gồm TMB + DMSO (Dimethyl Sulphoxide) + H_2O_2 + Citrate buffer (Citric acid, NaCH_3COO).
- Chất dừng phản ứng: H_2SO_4 2N.

Một số dung dịch khác

- Nước cất 2 lần.
- K_2SO_4 dùng để bảo quản mẫu.

Dụng cụ

- Đĩa Elisa và miếng dán mặt đĩa
- Máng đựng dung dịch
- Micropipet các loại
- Ống eppendorf các loại
- Ống falcol: 12ml, 50ml
- Tủ lạnh dương, tủ lạnh âm và tủ lạnh sâu – 20°C
- Syringe 5ml, 10ml, bông sạch
- Chai, cổ thủy tin các loại
- Máy đo pH, máy đảo, máy lắc, máy ly tâm, máy đọc protein
- Máy sấy, máy cất nước 2 lần
- Cột tinh chế kháng thể (cột tgel)

Địa điểm nghiên cứu

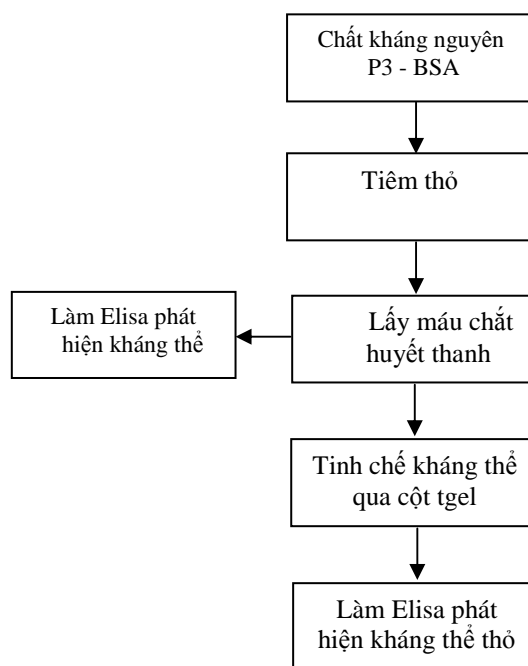
- Bộ môn Sinh sản và Thụ tinh nhân tạo – Viện chăn nuôi Quốc gia.

Nội dung nghiên cứu

- Gây đáp ứng miễn dịch và tối miễn dịch cho thỏ bằng P3 - BSA
- Lấy máu thỏ ly tâm, chiết lấy huyết thanh
- Tách kháng thể qua cột tgel (tách kháng thể ra khỏi huyết thanh)
- Đánh giá hàm lượng kháng thể sau khi gây miễn dịch, gây tối miễn dịch và tách kháng thể qua cột tgel bằng phản ứng Elisa.

Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ điều chế kháng thể thỏ



Sơ đồ 1. Sơ đồ điều chế kháng thể thỏ

Phương pháp tạo kháng nguyên P3 – BSA để tiêm thỏ

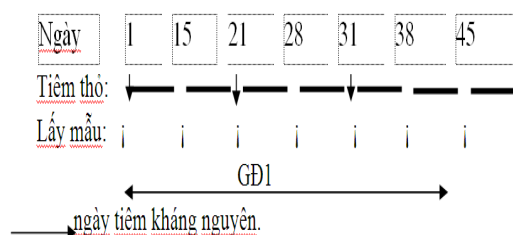
- Phức hợp P3 - BSA được nhũ hóa với một chất bổ trợ (oil adjuvant) với tỷ lệ 1 ml kháng nguyên/2ml oil adjuvant.

- Mỗi thỏ tiêm 200 μg P3 - BSA: Lấy 200 μl từ dung dịch gốc 1mg/ml P3 - BSA, thêm PBS đến 1ml, sau đó cho thêm 2ml oil adjuvant và trộn đều trong vòng 2 giờ. Nếu không sử dụng ngay thì bảo quản ở 4°C .

Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch và gây tối miễn dịch cho thỏ bằng P3 - BSA

- Thỏ được tiêm kháng nguyên P3 - BSA để gây đáp ứng miễn dịch (giai đoạn 1), sau khi đã có đáp ứng miễn dịch với P3 - BSA, thỏ

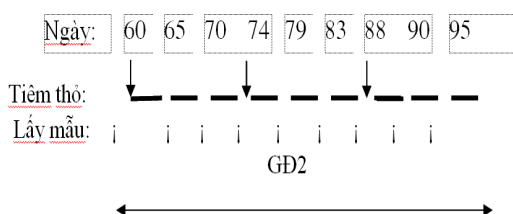
tiếp tục được tiêm P3 - BSA để gây tối miễn dịch (giai đoạn 2). Trước khi tiêm, phải cắt lông thỏ ở phần lưng với diện tích khoảng 10 - 15cm², sát trùng vùng da đó và tiến hành tiêm kháng nguyên thành nhiều điểm ở dưới da. Sau khi tiêm gây đáp ứng miễn dịch 2 tuần, tiến hành lấy mẫu xác định kháng thể theo sơ đồ 2.



Sơ đồ 2. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch cho thỏ

- Lấy mẫu ngay trước thời điểm tiêm và các ngày 15, 28, 38, 45, mỗi lần 4 - 6 ml.

Những thỏ có khả năng đáp ứng miễn dịch cao được dùng để gây tối miễn dịch bằng cách tiêm P3 - BSA. Sau khi gây tối miễn dịch 5 - 7 ngày, tiến hành lấy mẫu, tiếp tục lấy mẫu vào khoảng cách như trên ở các ngày sau đó. Cứ sau 2 tuần, tiến hành tiêm nhắc lại và lấy mẫu như trên (tiêm nhắc lại 3 lần). Quá trình gây tối miễn dịch và lấy mẫu được tiến hành theo sơ đồ 3.



Sơ đồ 3. Sơ đồ gây tối miễn dịch cho thỏ

- Gây tối miễn dịch vào ngày 60, 74, 88

- Lấy mẫu cách nhật mỗi lần lấy 10 ml / thỏ

Mẫu thỏ sau mỗi lần lấy được đem ly tâm, chiết lấy huyết thanh rồi pha với K₂SO₄ (nồng độ 87mg K₂SO₄/ml huyết thanh), lắc tan rồi lọc qua màng lọc 0,45μm và bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng.

Phương pháp tinh chế kháng thể qua cột tgel, được tiến hành qua 2 bước: Làm cột tgel và tinh chế kháng thể qua cột tgel

Phương pháp phát hiện kháng thể và khả năng đáp ứng miễn dịch của thỏ

Dùng phản ứng Elisa để phát hiện kháng thể có trong huyết thanh của thỏ được gây miễn dịch. Phản ứng Elisa gồm các bước:

- **Bước 1:** Gắn kháng nguyên vào các giếng của đĩa Elisa (Coat đĩa)

- **Bước 2:** Blocking (phủ đĩa) .

- **Bước 3:** Pha huyết thanh.

Pha loãng các mẫu theo các độ pha loãng là: 1/10; 1/100; 1/1000

Pha loãng	huyết thanh thỏ	cách pha
1/10	1μl huyết thanh thỏ	+ 9 μl sữa tách bơ trong PBS
1/100	1μl huyết thanh thỏ 1/10	+ 9 μl sữa tách bơ trong PBS
1/1000	1μl huyết thanh thỏ 1/100	+ 9 μl sữa tách bơ trong PBS

- **Bước 4:** Conjugate

- **Bước 5:** Substrate (cơ chất). Cho 100 ml TMB đã pha sẵn vào các giếng.

- **Bước 6:** Dùng phản ứng bằng H₂SO₄ 2N

- **Bước 7:** Đọc kết quả bằng máy Elisa (Opsys MR- Dynex) với bước sóng 450 nm.

Phương pháp xử lý số liệu: Toàn bộ số liệu thu được trong quá trình làm thí nghiệm được xử lý trên chương trình Microsoft excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả lấy mẫu và tách huyết thanh thỏ

Mẫu máu thỏ được lấy theo sơ đồ 2.2, 2.3 và được ly tâm ở 3000 vòng/phút/15 phút, tách huyết thanh cho vào ống falcol và bảo quản ở -20°C. Kết quả tách huyết thanh cho thấy, tổng số huyết thanh/mẫu thu được của các thỏ 1, 2, 3, 4 tương ứng là: 58/125,5 ml, 10,5/38 ml, 59/131 ml, 11/38 ml. Các thỏ khác nhau cho tổng lượng huyết thanh/mẫu khác nhau là do trạng thái của từng thỏ tại thời điểm lấy mẫu và do kỹ thuật thu huyết thanh của từng đợt.

Kiểm tra khả năng đáp ứng miễn dịch trên thỏ được gây miễn dịch

Sau khi gây miễn dịch cho 4 thỏ, chúng tôi thấy các thỏ 1, 2 và 3 cho đáp ứng miễn dịch tốt. Kết quả đáp ứng miễn dịch của 1, 2 và 3 thỏ khi kiểm tra bằng phản ứng Elisa thông qua đo mật độ quang học (OD) được trình bày ở bảng 1, 2 và 3.

Bảng 1. Kết quả đáp ứng miễn dịch của thỏ 1 với P3 – BSA

Ngày	Nồng độ pha loãng			
	0	1/10	1/100	1/1000
1	0,075 ± 0,002	0,079 ± 0,010	0,088 ± 0,010	0,071 ± 0,002
15	0,069 ± 0,003	0,182 ± 0,004	0,101 ± 0,016	0,082 ± 0,004
21	0,070 ± 0,010	0,340 ± 0,040	0,208 ± 0,006	0,108 ± 0,010
28	0,079 ± 0,005	0,447 ± 0,050	0,317 ± 0,002	0,120 ± 0,020
31	0,098 ± 0,004	0,542 ± 0,020	0,411 ± 0,005	0,134 ± 0,003
38	0,101 ± 0,020	0,596 ± 0,030	0,481 ± 0,028	0,140 ± 0,030
45	0,111 ± 0,002	0,480 ± 0,050	0,392 ± 0,025	0,126 ± 0,005

Bảng 2. Kết quả đáp ứng miễn dịch của thỏ 2 với P3 – BSA

Ngày	Nồng độ pha loãng			
	0	1/10	1/100	1/1000
1	0,087 ± 0,002	0,070 ± 0,002	0,070 ± 0,004	0,066 ± 0,002
15	0,075 ± 0,001	0,121 ± 0,020	0,092 ± 0,001	0,080 ± 0,001
21	0,094 ± 0,020	0,200 ± 0,010	0,111 ± 0,005	0,085 ± 0,010
28	0,089 ± 0,010	0,268 ± 0,005	0,136 ± 0,003	0,099 ± 0,006
31	0,078 ± 0,010	0,282 ± 0,013	0,161 ± 0,010	0,103 ± 0,020
38	0,110 ± 0,005	0,312 ± 0,006	0,201 ± 0,010	0,112 ± 0,003
45	0,101 ± 0,003	0,285 ± 0,004	0,141 ± 0,030	0,094 ± 0,004

Bảng 3. Kết quả đáp ứng miễn dịch của thỏ 3 với P3 – BSA

Ngày	Nồng độ pha loãng			
	0	1/10	1/100	1/1000
1	0,073 ± 0,002	0,101 ± 0,010	0,097 ± 0,003	0,074 ± 0,003
15	0,095 ± 0,001	0,200 ± 0,005	0,109 ± 0,020	0,078 ± 0,004
21	0,103 ± 0,010	0,475 ± 0,030	0,350 ± 0,030	0,109 ± 0,004
28	0,071 ± 0,003	0,490 ± 0,040	0,380 ± 0,040	0,114 ± 0,010
31	0,097 ± 0,010	0,586 ± 0,002	0,447 ± 0,010	0,141 ± 0,002
38	0,084 ± 0,003	0,600 ± 0,004	0,487 ± 0,004	0,183 ± 0,020
45	0,096 ± 0,005	0,565 ± 0,050	0,320 ± 0,005	0,126 ± 0,030

Số liệu ở các bảng 1, 2, 3 cho thấy, ở ngày đầu tiên, giá trị OD của các nồng độ pha loãng không có sự sai khác đáng kể, nhưng từ ngày thứ 15 trở đi, các giá trị OD có sự chênh lệch nhau rõ ràng giữa các ngày sau khi tiêm kháng nguyên và giữa các nồng độ pha loãng của huyết thanh, cụ thể:

- Nếu xét trong cùng một nồng độ pha loãng (giá sử nồng độ 1/10), ở ngày đầu tiên, giá trị OD là thấp nhất, lần lượt là 0,079 - 0,070 và 0,101, tương ứng với các thỏ 1 - 2 và 3. Điều đó cho thấy, trước khi gây miễn dịch, trong huyết thanh của thỏ không có kháng thể đặc hiệu với progesteron. Đến ngày thứ 15 sau khi tiêm, giá trị OD tăng lên lần lượt là 0,182 -

0,121 và 0,200, tương ứng với các thỏ 1 - 2 và 3. Sự tăng lên rõ rệt của giá trị OD ở ngày thứ 15 so với ngày đầu tiên, chứng tỏ trong huyết thanh lúc này đã xuất hiện kháng thể, tuy lượng kháng thể ở ngày này vẫn còn thấp.

Giá trị OD tiếp tục tăng cao vào các ngày tiếp theo, cụ thể ở các ngày 21 - 28 - 31 - 38 - 45, tương ứng ở thỏ 1 là 0,340 - 0,447 - 0,542 - 0,596 - 0,480; Thỏ 2 là 0,200 - 0,268 - 0,282 - 0,312 - 0,286; Thỏ 3 là 0,475 - 0,490 - 0,586 - 0,600 - 0,565. Sự tăng lên nhanh chóng của giá trị OD theo sự tăng lên của ngày lấy mẫu cho thấy, khi đưa kháng nguyên vào nhiều lần, tế bào plasma được sản sinh ra nhiều hơn và đã sản sinh kháng thể với lượng lớn hơn.

- Xét ở các nồng độ pha loãng khác nhau (giả sử ngày 28), chúng tôi thấy giá trị OD có xu hướng giảm dần theo nồng độ pha loãng tăng dần. Cụ thể là giá trị OD ở các nồng độ 1/10 - 1/100 - 1/1000 tương ứng với Thỏ 1 là 0,447 - 0,317 - 0,120; Thỏ 2 là 0,286 - 0,136 - 0,099; Thỏ 3 là 0,490 - 0,380 - 0,114. Sự biến động này cũng xảy ra tương tự ở các lần lấy mẫu trước và sau thời điểm 28 ngày.

Giá trị OD giảm theo sự tăng lên của nồng độ pha loãng huyết thanh và tăng lên theo sự tăng lên của ngày lấy mẫu, kết hợp với sự lên màu xanh khi cho cơ chất vào và chuyển từ màu xanh sang màu vàng khi dùng phản ứng bằng H₂SO₄ 2N trong phản ứng Elisa, chứng tỏ thỏ 1, 2, 3 có đáp ứng miễn dịch với P3 - BSA.

Kết quả gây tối miễn dịch cho thỏ

Sau khi gây miễn dịch cơ sở cho thỏ, chúng tôi chọn thỏ 1 và thỏ 3 (là 2 thỏ có đáp ứng miễn dịch tốt nhất) để gây tối miễn dịch theo quy trình được trình bày tại sơ đồ 3.

Kết quả gây tối miễn dịch cho thỏ 1 và thỏ 3

Kết quả gây tối miễn dịch cho thỏ 1 và thỏ 3 được trình bày tại bảng 4 và 5.

Số liệu bảng 4 và 5 cho thấy, vào ngày 60 (bắt đầu gây tối miễn dịch), giá trị OD thấp hơn so với ngày cuối của quá trình gây miễn dịch cơ sở (ngày 45) ở tất cả các nồng độ pha loãng. Hiện tượng này là do sau hơn 2 tuần chúng tôi mới tiếp tục lấy mẫu, cơ thể thỏ tự đào thải kháng thể đã được sinh ra, đồng thời một số tế bào plasma tự phân giải không còn khả năng sinh thêm kháng thể. Nhưng lượng kháng thể này chỉ giảm đi chứ không phải mất hẳn.

Những ngày lấy mẫu tiếp theo cho thấy, có sự khác nhau về giá trị OD ở các nồng độ pha loãng khác nhau. Tại nồng độ pha loãng 1/10, ở thỏ 1, đến ngày 65 giá trị OD tăng lên (0,391) và bắt đầu tăng lên nhanh chóng ở ngày 70 (0,589). Sau 2 tuần gây tối miễn dịch, đến ngày 74 nồng độ kháng thể cao hơn ngày 60 là 2,28 lần và cao hơn ngày 45 khoảng 1,3 lần. Giá trị OD này tiếp tục tăng vào ngày 79 - 83 - 88 - 90 - 95 tương ứng là 0,799 - 0,790 - 0,737 - 0,831 - 0,810. Như vậy, giá trị OD ở những ngày 90 - 95 tăng gấp 3 lần so với ngày 60 và cao hơn so với ngày gây tối miễn dịch lần 2 (ngày 74). Giá trị OD ở lúc gây tối miễn dịch lần 2 (ngày 74) cũng cao hơn khoảng 2 lần so với giá trị OD ở lúc gây miễn dịch cơ sở lần 2 (ngày 21) (0,627 so với 0,340). Điều này cho thấy rõ sự khác nhau về khả năng hình thành kháng thể giữa các lần gây miễn dịch.

Tương tự như vậy, ở nồng độ 1/10, đối với ở thỏ 3, giá trị OD vào ngày 60 là 0,286, thấp hơn so với ngày cuối cùng gây miễn dịch cơ sở (ngày 45). Khi tiêm kháng nguyên vào thì giá trị OD tăng lên vào ngày 70 là 0,770 (gấp 2,69 lần so với ngày 60) và giá trị OD ở ngày 74 cũng cao gấp khoảng 2 lần so với ngày 21 (0,817 so với 0,457). Nồng độ kháng thể tiếp tục tăng vào ngày 79 - 83 - 88 - 90 - 95 với giá trị OD tương ứng là 0,828 - 0,819 - 0,786 - 0,868 - 0,842.

Sự tăng cao của giá trị OD sau khi gây tối miễn dịch có thể liên quan đến tế bào "nhớ" khi làm nhiệm vụ tạo kháng thể. Trí nhớ miễn dịch này là đáp ứng thứ phát dẫn tới việc sản xuất kháng thể một cách nhanh chóng, kịp thời với số lượng lớn (Đỗ Ngọc Liên, 1999)[1].

Bảng 4. Kết quả gây tối miễn dịch cho thỏ 1 bằng P3 - BSA

Ngày	Nồng độ pha loãng			
	0	1/10	1/100	1/1000
60	0,089 ± 0,005	0,275 ± 0,015	0,135 ± 0,001	0,104 ± 0,001
65	0,083 ± 0,007	0,391 ± 0,040	0,234 ± 0,050	0,147 ± 0,050
70	0,084 ± 0,003	0,589 ± 0,020	0,450 ± 0,004	0,241 ± 0,040
74	0,079 ± 0,020	0,627 ± 0,003	0,549 ± 0,020	0,256 ± 0,006
79	0,077 ± 0,010	0,799 ± 0,001	0,598 ± 0,050	0,264 ± 0,003
83	0,094 ± 0,001	0,790 ± 0,006	0,586 ± 0,040	0,251 ± 0,040
88	0,091 ± 0,002	0,737 ± 0,050	0,429 ± 0,006	0,246 ± 0,005
90	0,086 ± 0,004	0,831 ± 0,020	0,655 ± 0,010	0,326 ± 0,030
95	0,092 ± 0,030	0,810 ± 0,030	0,612 ± 0,020	0,306 ± 0,020

Bảng 5. Kết quả gây tối miễn dịch cho thỏ 3 bằng P3 - BSA

Ngày	Nồng độ pha loãng			
	0	1/10	1/100	1/1000
60	0,091 ± 0,002	0,286 ± 0,040	0,161 ± 0,010	0,096 ± 0,010
65	0,095 ± 0,006	0,409 ± 0,001	0,200 ± 0,020	0,148 ± 0,020
70	0,083 ± 0,004	0,770 ± 0,030	0,489 ± 0,007	0,263 ± 0,010
74	0,084 ± 0,002	0,817 ± 0,020	0,638 ± 0,040	0,340 ± 0,020
79	0,081 ± 0,002	0,828 ± 0,010	0,682 ± 0,030	0,364 ± 0,012
83	0,078 ± 0,003	0,819 ± 0,030	0,640 ± 0,004	0,325 ± 0,031
88	0,076 ± 0,005	0,786 ± 0,002	0,549 ± 0,006	0,253 ± 0,002
90	0,089 ± 0,010	0,868 ± 0,050	0,705 ± 0,002	0,438 ± 0,006
95	0,097 ± 0,004	0,842 ± 0,040	0,687 ± 0,020	0,400 ± 0,050

Bảng 6. Kết quả tách chiết kháng thể qua tgel

Ngày lấy mẫu (ngày thứ)	60	65	70	74	79	83	88	90	95
Huyết thanh (ml)	10	13	9,5	11	12	10	7,5	10	12
Lần tách chiết	Thể tích dung dịch sau khi tách có chứa kháng thể (ml)								
lần 1	18	20	18	14	16	18	14	18	20
lần 2	12	16	12	6	7	14	11	16	12
lần 3	7	6	7	4	4	7	8	8	6
Tổng	37	42	37	24	27	39	33	42	38

Bảng 7. Độ hấp phụ OD trung bình của các mẫu sau khi tách qua tgel lần 1

Ngày	Nồng độ pha loãng			
	0	1/10	1/100	1/1000
60	0,078 ± 0,024	0,260 ± 0,010	0,107 ± 0,005	0,067 ± 0,003
65	0,081 ± 0,010	0,478 ± 0,002	0,212 ± 0,010	0,133 ± 0,006
70	0,076 ± 0,003	0,596 ± 0,010	0,357 ± 0,006	0,135 ± 0,020
74	0,090 ± 0,020	0,612 ± 0,003	0,377 ± 0,030	0,156 ± 0,010
79	0,085 ± 0,004	0,667 ± 0,003	0,415 ± 0,010	0,210 ± 0,005
83	0,083 ± 0,010	0,686 ± 0,014	0,451 ± 0,004	0,223 ± 0,006
88	0,079 ± 0,003	0,637 ± 0,030	0,442 ± 0,005	0,212 ± 0,040
90	0,075 ± 0,005	0,775 ± 0,050	0,610 ± 0,003	0,232 ± 0,030
95	0,068 ± 0,006	0,764 ± 0,020	0,513 ± 0,020	0,224 ± 0,001

Trong cùng một ngày lấy mẫu, nồng độ kháng thể có xu hướng giảm dần với sự tăng lên của nồng độ pha loãng huyết thanh sau khi gây tối miễn dịch. Điều đó cho thấy khi nồng độ huyết thanh trong mẫu càng thấp thì nồng độ kháng thể trong mẫu càng giảm, chứng tỏ trong mẫu có kháng thể và sự có mặt của kháng thể vẫn có thể xác định được khi mẫu được pha loãng 1000 lần.

Kết quả của tách chiết kháng thể

Kết quả tách chiết kháng thể qua tgel

Số liệu ở bảng 3.6 cho thấy, thể tích huyết thanh ở ngày 60 của thỏ là 10 ml, khi đem chiết tách, thu được bình quân là 37 ml dung

dịch chứa kháng thể; và ở ngày 74 là 11 ml huyết thanh, thu được 24 ml dung dịch có chứa kháng thể. Số dung dịch chứa kháng thể tăng lên là do trong dung dịch sau khi chiết tách có chứa cả huyết thanh và dung dịch tách chiết. Thể tích huyết thanh và dung dịch thu được sau khi tách chiết ở các ngày tiếp theo cũng được giải thích tương tự.

Trong phạm vi đề tài này, chúng tôi chỉ mới tiến hành tách chiết kháng thể, chưa làm được bước tiếp theo là tinh khiết kháng thể đặc hiệu với progesterone (tức tinh khiết IgG) và cô đặc xác định nồng độ kháng thể này.

Kết quả kiểm tra nồng độ kháng thể sau khi tách

Sau khi tách chiết, chúng tôi tiến hành kiểm tra nồng độ kháng thể bằng phản ứng Elisa. Kết quả kiểm tra nồng độ kháng thể được trình bày ở bảng 3.7.

Xét trong cùng một nồng độ pha loãng (giả sử nồng độ 1/10), giá trị OD tăng liên tục với sự tăng lên của các ngày lấy mẫu và đạt giá trị cao nhất ở ngày thứ 95 (0,764).

Xét trong cùng một ngày, ở các độ pha loãng khác nhau (giả sử ngày 65), khi mức pha loãng tăng dần từ 1/10 đến 1/1000, thì giá trị OD có xu hướng giảm dần từ 0,478 xuống 0,133. Điều đó chứng tỏ trong dung dịch thu được có sự xuất hiện của kháng thể thô.

Thông thường, sau khi tách qua cột tgel, kháng thể được tách ra khỏi cột đi xuống cùng với dung dịch tách Elution. Khi chúng tôi kiểm tra kết quả bằng máy đo mật độ quang học cho thấy, giá trị OD sau khi tách qua tgel bị giảm đi so với giá trị OD của huyết thanh chưa tách. Điều này có thể được giải thích là do sau khi kháng thể tách qua tgel thì chúng được pha loãng trong dung dịch Elution, mặt khác kháng thể trong huyết thanh thô không được tách hết hoàn toàn. Mỗi huyết thanh chúng tôi phải tiến hành tách nhiều lần

qua cột (3 lần) mới chỉ thu được 90% kháng thể trong mẫu huyết thanh.

KẾT LUẬN

- Sử dụng kháng nguyên P - 3 - BSA tạo được để gây miễn dịch cho 4 thỏ, đã 2 thỏ đáp ứng tốt với kháng nguyên P - 3 - BSA.

- Những thỏ có đáp ứng miễn dịch cơ sở tốt đối với kháng nguyên P- 3 - BSA thì có đáp ứng tốt trong gây tối miễn dịch.

- Sau khi gây tối miễn dịch, nồng độ kháng thể kháng progesteron trong huyết thanh thỏ có xu hướng tăng dần với sự tăng lên của ngày lấy mẫu và giảm dần với mức pha loãng của huyết thanh thỏ.

- Sử dụng phương pháp tách chiết kháng thể qua cột tgel đã tách chiết được kháng thể kháng progesteron từ mẫu huyết thanh thỏ được gây tối miễn dịch. 100% mẫu huyết thanh thỏ được gây tối miễn dịch đều chứa kháng thể kháng progesteron.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đỗ Ngọc Liên (1999), *Miễn dịch học cơ sở*, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [2]. Marcus G J, Hackett A J (1986), *Use of Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay for measurement of bovin serum and milk progesterone without extraction*, Dairy Sci.

SUMMARY

CREATION RESEARCH ANTIBODIES TO PROGESTERONE IN RABBITS FOR EARLY DIAGNOSIS PREGNANT AND REPRODUCTIVE DISEASES OF DAIRY COWS

Nguyen Duc Hung^{1*}, Nguyen Manh Ha², Nguyen Thi Hue²
¹Thai Nguyen University, ²College of Agriculture and Forestry - TNU

4 healthy rabbits which weighed more than 2.5kg each, without vaccination against diseases, were used to create the basic immune response by subcutaneous injection of P3-BSA antigen with dose of 200µg on day 1, 21, 31 and blood sampling on day 1, 15, 21, 28, 31, 38 and 45 to investigate the immune response by ELISA reaction. There were 3 rabbits showed immune response to P3-BSA. Amongst those, 2 rabbits which showed the best response to P3-BAS were selected to optimize immuno response by infusion of P3-BSA on day 60, 74, 88 from the starting point of the basic immuno response induction and blood sampling on day 60, 65, 70, 74, 79, 83, 88, 90, 95 to evaluate the immuno response. The results revealed that, the concentration of antibody against progesterone in blood sample from optimal immuno response induction rabbit tend to increase in correlation with the day collecting samples and reduced in correlation with dilution of serum, and the present of antibody against progesteron still can be determined when samples were 1000 times diluted. This is clear that P3-BSA antigen which produced from the experiment had induced immuno response in rabbit, those rabbit showed basic immuno response also response in optimal immuno response induction.

Using the method of extraction of antibodies through the extraction column tgel progesterone antibody from rabbit serum samples induce optimal immuno response. All rabbit serum samples which optimal immuno response induced by P3 - BSA contain antibodies against progesterone.

Keyword: *P3-BSA, progesterone, ELISA, immune response*

Ngày nhận bài: 09/1/2013, ngày phản biện: 31/1/2013, ngày duyệt đăng: 26/3/2013

* Tel: 0912 004885