

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



Nguyễn Thị Hằng

**TẠO DÒNG TẾ BÀO LAI SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐƠN
DÒNG KHÁNG KHÁNG NGUYÊN A (NHÓM MÁU A)
TRÊN MÀNG TẾ BÀO HỒNG CẦU NGƯỜI**

Chuyên ngành sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

**LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC
NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

TS. Nguyễn Thị Trung

HÀ NỘI, 12/2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các số liệu và kết quả được công bố trong luận văn là hoàn toàn trung thực, chính xác và chưa được công bố ở bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Học viên

Nguyễn Thị Hằng

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới **TS. Nguyễn Thị Trung** chủ nhiệm đề tài KC04.13/11-15 đã hết lòng giúp đỡ, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Tiếp theo, tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn tới các thầy, cô của trường Đại học Thái Nguyên, Viện Sinh thái và Tài Nguyên sinh vật và các thầy, cô của Viện Công nghệ sinh học đã nhiệt tình giảng dạy cho tôi trong suốt thời gian tham gia khóa học.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn **TS. Lê Văn Phan, ThS. Vũ Thị Thu Hằng, BSTY. Thân Đức Dương** và các cán bộ phòng kiểm nghiệm – Công ty cổ phần phát triển công nghệ nông thôn đã tạo mọi điều kiện để tôi thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến **GS. TS. Trương Nam Hải** và các cán bộ phòng Kỹ thuật di truyền, những người thân trong gia đình cùng bạn bè đã luôn hỗ trợ, động viên, khuyến khích tôi trong suốt quá trình học tập.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Học viên

Nguyễn Thị Hằng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
DANH MỤC HÌNH.....	vi
DANH MỤC BẢNG	viii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	ix
MỞ ĐẦU	1
NỘI DUNG.....	3
Chương 1. Tổng quan	3
1.1. Tổng quan về miễn dịch	3
1.1.1. Hệ miễn dịch.....	3
1.1.2. Hệ thống miễn dịch bẩm sinh.....	4
1.1.3. Hệ thống miễn dịch thích ứng	5
1.1.3.1. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào.....	7
1.1.3.2. Đáp ứng miễn dịch dịch thể.....	8
1.1.4. Kháng nguyên.....	9
1.1.5. Kháng thể.....	10
1.2. Khái quát về hệ thống nhóm máu người	12
1.2.1. Phân loại hệ thống nhóm máu ở người.....	12
1.2.2. Hệ thống nhóm máu ABO	13
1.2.3. Vai trò của máu trong y học	14
1.2.4. Truyền máu và nguyên tắc truyền máu	14
1.2.5. Phương pháp xác định nhóm máu hệ ABO.....	15
1.3. Kháng thể đơn dòng.....	16
1.3.1. Công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng.....	16
1.3.2. Sản xuất kháng thể đơn dòng bằng công nghệ tế bào lai	19
1.3.3. Vai trò của kháng thể đơn dòng.....	20
1.3.4. Tình hình sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên nhóm máu hệ ABO	21
1.4. Động lực học sinh trưởng và sản xuất của tế bào động vật.....	21
Chương 2. Vật liệu và phương pháp.....	25

2.1. Vật liệu	25
2.1.1. Động vật	25
2.1.2. Hồng cầu mẫu	25
2.1.3. Dòng tế bào myeloma.....	25
2.1.3. Hóa chất.....	25
2.1.4. Máy móc thiết bị.....	26
2.2. Phương pháp	26
2.2.1. Gây miễn dịch.....	26
2.2.2. Chuẩn bị tế bào nền	27
2.2.3. Nuôi cấy tế bào myeloma	28
2.2.4. Dung hợp và tạo dòng tế bào lai.....	29
2.2.5. Tách dòng tế bào lai.....	31
2.2.6. Phản ứng ngưng kết hồng cầu trên đĩa 96 giếng	32
2.2.7. Phản ứng ngưng kết hồng cầu trên phiến kính	33
2.2.8. Phương pháp đếm tế bào	33
2.2.9. Xây dựng đường cong sinh trưởng để nghiên cứu sự sinh trưởng và sản xuất kháng thể của các dòng tế bào lai	33
2.2.10. Xác định loại globulin miễn dịch	34
2.2.11. Loại bỏ phenol bằng ammonium sulfate	35
2.2.12. Tạo sinh phẩm xác định nhóm máu A.....	36
2.2.13. Xác định độ đặc hiệu	36
2.2.14. Xác định hiệu giá.....	36
2.2.15. Xác định cường độ và ái tính.....	36
Chương 3. Kết quả.....	38
3.1. Đánh giá hiệu quả gây miễn dịch của hồng cầu mẫu A ⁺	38
3.2. Dung hợp tạo tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên A	39
3.3. Sàng lọc hỗn hợp tế bào lai sản xuất kháng thể kháng kháng nguyên A	41
3.4. Tạo dòng tế bào lai đơn sản xuất kháng thể đơn dòng kháng lại kháng nguyên A....	43
3.5. Xác định phân lớp kháng thể do dòng tế bào A6G11C9 sản xuất	44
3.6. Sự sinh trưởng và sản xuất kháng thể của dòng tế bào lai A6G11C9 tiết kháng thể kháng kháng nguyên A	45

3.7. Hiệu giá kháng thể trong dịch nuôi cấy tế bào lai A6G11C9.....	49
3.8. Độ nhạy và độ đặc hiệu của kháng thể do dòng tế bào lai A6G11C9 sản xuất	50
3.9. Loại bỏ phenol đổ ra khỏi dịch nuôi cấy tế bào lai A6G11C9 bằng phương pháp tủa ammonium sulfate	52
3.10. Tạo sinh phẩm xác định nhóm máu A.....	55
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	57
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	58

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Thành phần của đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu	3
Hình 1.2. Quá trình thực bào	4
Hình 1.3. Cách tế bào NK và protein bổ thể tạo lỗ trên màng để tiêu diệt tế bào lây nhiễm tác nhân gây bệnh	5
Hình 1.4. Tế bào T bám vào kháng nguyên lạ liên kết với protein MHC	6
Hình 1.5. Kháng nguyên được hiện diện cùng protein MHC	7
Hình 1.6. Hàng rào miễn dịch tế bào T	8
Hình 1.7. Hàng rào miễn dịch tế bào B	9
Hình 1.8. Cấu trúc của phân tử kháng thể	11
Hình 1.9. Kháng nguyên nhóm máu của người.....	13
Hình 1.10. Sơ đồ truyền máu.....	15
Hình 1.11. Các phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng.....	19
Hình 1.12. Công nghệ tế bào lai	20
Hình 1.13. Phản ứng ngưng kết giữa kháng nguyên - kháng thể	21
Hình 1.14. Đường cong sinh trưởng của tế bào	24
Hình 2.1. Tế bào đại thực bào khi nuôi cấy tĩnh.....	28
Hình 2.2. Sơ đồ pha loãng tới hạn	31
Hình 2.3. Phản ứng ngưng kết hồng cầu trên đĩa đáy chữ V.....	32
Hình 2.4. Cách đọc kết quả của phản ứng ngưng kết hồng cầu trên đĩa 96 đáy chữ V.....	32
Hình 2.5. Buồng đếm tế bào	33
Hình 2.6. Cơ chế và cách đọc kết quả của phản ứng ELISA xác định phân lớp kháng thể	35
Hình 3.1. Phản ứng ngưng kết giữa huyết thanh của chuột được gây miễn dịch với hồng cầu mẫu A ⁺ , B ⁺ , O ⁺ 38	38
Hình 3.2. Lách và hạch vùng kheo thu được từ chuột được gây miễn dịch với hồng cầu mẫu A ⁺	39
Hình 3.3. Tế bào sau dung hợp.....	40
Hình 3.4. Tế bào lai hình thành sau 6 ngày dung hợp.....	40
Hình 3.5. Tế bào lai sau 2 ngày dung hợp ở các giếng khác nhau	41

Hình 3.6. Sự phát triển của tế bào lai	42
Hình 3.7. Sàng lọc giếng chứa hỗn hợp tế bào lai sản xuất kháng thể kháng kháng nguyên A.....	43
Hình 3.8. Sàng lọc dòng tế bào lai đơn sản xuất kháng thể kháng kháng nguyên A	44
Hình 3.9. Chọn dòng tế bào lai sản xuất kháng thể kháng kháng nguyên A tốt nhất	44
Hình 3.10. Phản ứng ELISA xác định isotyp e kháng thể.....	45
Hình 3.11. Đường cong sinh trưởng của dòng tế bào lai A6G11C9 trong môi trường DMEM + 10% FBS	47
Hình 3.12. Đường cong sinh trưởng của dòng tế bào lai A6G11C9 khi nuôi cấy trong môi trường có nồng độ huyết thanh thấp DMEM + 1%FBS	48
Hình 3.13. Đồ thị biểu thị sự hình thành kháng thể của dòng tế bào A6G11C9 khi nuôi cấy trong môi trường DMEM + 10% FBS	49
Hình 3.14. Đồ thị biểu thị sự hình thành kháng thể của dòng tế bào A6G11C9 khi nuôi cấy trong môi trường DMEM + 1% FBS	49
Hình 3.15. Xác định hiệu giá kháng thể bằng phương pháp ngưng kết hồng cầu	50
Hình 3.16. Phản ứng ngưng kết hồng cầu trên đĩa 96 giếng đáy chữ V xác định độ đặc hiệu của kháng thể	51
Hình 3.17. Phản ứng ngưng kết hồng cầu trên phiến kính xác định ái tính kháng thể và cường độ của phản ứng ngưng kết.....	52
Hình 3.18. Dịch nuôi cấy trước và sau khi rửa ammonium sulphate	53
Hình 3.19. Độ đặc hiệu của kháng thể trước và sau khi rửa.....	54
Hình 3.20. Hiệu giá kháng thể trước và sau khi rửa ammonium sulfate	54
Hình 3.21. Sinh phẩm A và phản ứng ngưng kết hồng cầu của sinh phẩm với panel hồng cầu hệ ABO	56

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. 1. Hướng dẫn đọc kết quả của phương pháp huyết thanh mẫu.....	16
Bảng 1. 2. Hướng dẫn đọc kết quả của phương pháp hồng cầu mẫu	16
Bảng 2. 1. Môi trường sử dụng.....	25
Bảng 2. 2. Một số dung dịch.....	26

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ
MHC	Major histocompatibility complex
APC	Antigen presenting cell
ISBT	International society of blood transfusion
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EBV	Epstein – Barr virus
scFv	Single chain fragment variable
VH	Variable domains of the heavy
VL	Variable domains of the light
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
hmAb	Human monoclonal antibody
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
PEG	Polyethylene glycol
HAT	Hypoxanthyl aminopterin thymidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Fetal bovine serum
FCA	Freund's complete adjuvant
FIA	Freund's incomplete adjuvant
HT	Hypoxanthine thymine
DMSO	Dimethylsulfoxide