

Tạo kháng thể IgG thô kháng protein bài xuất/tiết của sán lá gan lớn *Fasciola gigantica*

Đặng Ngọc Kim Thủy¹, Lê Thị Phương Thảo², Thái Thị Tuyết Trinh²,
Nguyễn Thị Phương², Nguyễn Hữu Hùng²

¹Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM

²Khoa Công nghệ Sinh học và Môi trường, Đại học Nguyễn Tất Thành
nhhung@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bệnh do nhiễm sán lá gan lớn (Fascioliasis) đang trở thành vấn đề sức khỏe toàn cầu. Trong đó, Việt Nam là một trong những quốc gia có sự lưu hành bệnh cao nhất. Ở Việt Nam, bệnh gây ra do loài sán *Fasciola gigantica*. Phương pháp chẩn đoán được sử dụng phổ biến hiện nay là xét nghiệm huyết thanh học phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu với sán. Bởi vì IgG tồn tại trong máu trong thời gian dài nên phương pháp này ít có giá trị trong việc xác định thời điểm bệnh và sau điều trị. Nhằm khắc phục nhược điểm nêu trên của xét nghiệm huyết thanh học, đề tài hướng đến phương pháp phát hiện kháng nguyên protein bài xuất/tiết (protein E/S) của sán trong máu và trong phân bằng cách dùng kháng thể. Mục tiêu đề tài là sử dụng E/S antigen của sán lá gan lớn *F. gigantica* tạo kháng thể IgG thô đặc hiệu cho protein E/S này. Gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ để tạo được IgG. Sau đó, IgG được tinh chế bằng phương pháp tủa muối Ammonium sulfate 45% và sắc kí ái lực qua cột protein G. Kết quả đã thu được IgG thô tinh sạch đặc hiệu cho protein E/S của sán lá gan lớn *F. gigantica*. Sản phẩm IgG thu được là tiền đề để hướng tới việc chế tạo bộ kit chẩn đoán phát hiện nhiễm bệnh do sán lá gan lớn *F. gigantica* trên người và động vật thông qua phát hiện kháng nguyên trong máu và trong phân.

Nhận 12.01.2019
Được duyệt 06.06.2019
Công bố 20.09.2019

Từ khóa
IgG thô, protein G,
Fasciola gigantica,
E/S Ag, chẩn đoán

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

91 triệu người trên toàn thế giới có nguy cơ nhiễm sán lá gan lớn (Fascioliasis) và trong đó có khoảng 17 triệu người nhiễm bệnh[1]. Ở Việt Nam, theo số liệu thống kê của Viện Sốt rét – Kí sinh trùng – Côn trùng Quy Nhơn, số người bệnh do nhiễm sán lá gan lớn tăng đột biến trong những năm gần đây. Trong vòng 5 năm (từ 2006 đến 2010), bằng xét nghiệm huyết thanh miễn dịch, có hơn 15 nghìn ca nhiễm sán lá gan lớn trong cả nước mà trong đó khu vực miền Trung và Tây Nguyên chiếm 93%. Năm 2011, số ca nhiễm sán lá gan lớn là gần 10 nghìn ca (~30 ca/ngày) chỉ tính riêng ở khu vực miền Trung và Tây Nguyên. Con số này xấp xỉ 70% của con số 5 năm trước cộng lại (từ 2006 đến 2010). Điều này cho thấy rằng nhiễm sán lá gan lớn là bệnh mới nổi và cần được quan tâm.

Sán lá gan lớn cư trú trong gan và túi mật. Từ đó, các protein bài xuất/tiết (E/S-Ag) của sán có thể được đưa vào máu và/hoặc đường tiêu hóa rồi theo phân ra ngoài (trong trường

hợp này E/S-Ag được gọi là coproantigen). Do đó, ngoài chẩn đoán huyết thanh tìm kháng thể thì chẩn đoán tìm E/S-Ag của sán mang lại giá trị chẩn đoán sớm và chẩn đoán điều trị quan trọng trên cả người và động vật[2-4]. Thời gian sớm sau khi bị nhiễm sán, kháng thể có thể ở mức thấp và khó phát hiện. Tuy nhiên, sán có thể tiết/bài xuất các kháng nguyên vào hệ tuần hoàn và đường tiêu hóa trong giai đoạn sớm này và kéo dài suốt thời gian kí sinh của sán[5]. Ở người, trong giai đoạn nhiễm cấp tính (60 ngày đầu sau nhiễm), E/S-Ag có thể được tìm thấy cả trong hệ tuần hoàn và trong phân. Sau thời gian này, trứng sán bắt đầu được tìm thấy cùng với sự tăng dần của E/S-Ag trong phân. E/S-Ag trong máu không được tìm thấy ở giai đoạn mạn tính là do chúng có thể bị trung hòa bởi kháng thể của bệnh nhân tự hình thành trong máu. Sau khi dùng thuốc diệt sán (ví dụ: triclabendazole), sán chết và ngừng tiết/bài xuất kháng nguyên[4]. Hai tuần sau điều trị bằng thuốc, E/S-Ag hầu như không còn được tìm thấy. Ngược lại với chẩn đoán huyết thanh tìm kháng thể, hiệu giá kháng thể giảm rất lâu và có thể kéo dài hơn 1 năm sau khi điều trị bằng thuốc

diệt sản. Điều này gây khó khăn trong việc đánh giá hiệu quả điều trị và tốn kém cho bệnh nhân.

Chưa có nghiên cứu nào trong nước tạo kháng thể IgG động vật để ứng dụng tạo kit phát hiện E/S-Ag sán lá gan trong máu và phân của bệnh nhân. Đề tài này bước đầu tạo ra kháng thể đa dòng ở thỏ, thử nghiệm kháng thể có được để hướng tới tạo kit chẩn đoán.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Động vật thí nghiệm

Thỏ có trọng lượng ≥ 2 kg/con mua từ trại thỏ Cù Chi và được nuôi trong nhà động vật của Khoa Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

2.2 Thu nhận sán lá gan lớn

Sán được thu nhận từ lò giết mổ trâu bò ở huyện Đức Hòa, tỉnh Long An. Sán lá nằm trong ống mật trong các gan bị xơ hóa. Rạch ống mật để bắt sán. Sán được rửa nhanh 3 lần trong dung dịch PBS pH 7.4 để loại bỏ dịch mật và máu. Sau đó sán được thu nhận và nuôi giữ trong môi trường RPMI 1640. Sán được đưa về phòng thí nghiệm và được nuôi tiếp ở 37°C. Quá trình nuôi cấy được kết thúc trong thời gian 10 giờ kể từ lúc bắt đầu thu sán tại lò giết mổ. Dịch E/S được thu nhận bằng cách li tâm với gia tốc 1000g trong 10 phút. Dịch E/S sau đó được tủa muối ammonium sulfate 90% và lưu giữ ở 4°C cho đến khi sử dụng.

2.3 Gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ

E/S Ag của sán được dùng gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ theo phác đồ trong Bảng 1. Mỗi lần tiêm 1ml hỗn hợp huyền phù chứa IgG, chia thành 40 mũi tiêm trong da, chia đều hai bên sống lưng (25 μ l/mũi). Riêng lần tiêm gây mẫn cảm dành lại khoảng 200 μ l hỗn hợp huyền phù để tiêm bắp, vị trí phía trong đùi chân sau. Các mũi tiêm cách nhau 30 ngày.

Bảng 1 Phác đồ tiêm thỏ với E/S Ag của sán lá

Mũi tiêm	Liều E/S Ag (μ g)	Tá chất	Thể tích máu (ml)
Mẫn cảm	100	FCA	5*
Tăng cường lần 1	100	FIA	5**
Tăng cường lần 2	50	FIA	5**
Tăng cường lần 3	25	FIA	7,5**
Tăng cường lần 4	20	FIA	50**

* trước khi tiêm ** sau khi tiêm 12 – 14 ngày

Máu thỏ sau khi thu nhận được để qua đêm ở 4°C, sau đó li tâm với gia tốc 3000g trong 15 phút, thu huyết thanh (HT). Bảo quản huyết thanh ở -20°C, có bổ sung 0.05% sodium azide. Kháng thể IgG kháng IgG người được kiểm tra bằng kỹ thuật lai phân tử western blot.

2.4 Khuếch tán kép trên thạch (Ouchterlony)

Tạo khuôn bằng gel agarose 1.5% trong PBS chứa 0,05% sodium azide, sau đó đục lỗ trên khuôn để tạo 6 giếng theo hình lục giác đều và 1 giếng ở giữa trọng tâm. Giếng ở giữa

sẽ cho E/S Ag với nồng độ 0,35mg/ml. Để kiểm tra đáp ứng miễn dịch, cho vào mỗi giếng xung quanh huyết thanh thỏ trước khi gây mẫn cảm hoặc huyết thanh sau lần tiêm tăng cường 1. Để kiểm tra hiệu giá kháng thể, cho vào các giếng xung quanh lần lượt huyết thanh được pha loãng bậc 2 theo tỉ lệ tăng dần từ 1:2 đến 1:64. Để miếng gel trong tủ mát 24-48 giờ và quan sát hiện tượng kết tủa trong thạch giữa giếng trung tâm và các giếng xung quanh.

2.5 Xác định hiệu giá kháng thể

Sử dụng kỹ thuật ELISA gián tiếp để xác định nồng độ IgG (kháng protein E/S) thích hợp trong huyết thanh (thỏ hoặc chuột). Ủ giếng bằng protein E/S với nồng độ 5 μ g/ml trong Na₂CO₃ pH 9,5. Sau khi rửa, khóa giếng bằng dung dịch PBS-T chứa 0,25% BSA. Sau đó ủ huyết thanh (thỏ hoặc chuột) pha loãng theo các tỉ lệ tăng dần 1:10², 1:10³, ... , 1:10⁹. Kháng thể thứ cấp có gắn HRP đã pha loãng 5000 lần được ủ vào giếng sau khi rửa. Cuối cùng phát hiện màu bằng dung dịch TMB và dừng phản ứng bằng dung dịch H₂SO₄, đo độ hấp thụ ở bước sóng 450/620nm.

2.6 Định lượng protein

Lượng IgG thỏ sau tinh chế được xác định bằng phương pháp quang phổ đo độ hấp phụ quang của IgG ở bước sóng 280nm. Nồng độ protein được tính dựa trên hệ số tắt mole $\epsilon_{IgG} = 1.35$ như sau: $C_{IgG} (mg/ml) = A_{280} * D / \epsilon$, trong đó A₂₈₀ là giá trị OD của IgG ở bước sóng 280nm, D là hệ số pha loãng của mẫu, L là chiều dài đường ánh sáng truyền qua mẫu, ϵ là hệ số tắt mole của protein.

E/S Ag được định lượng bằng phương pháp Bradford.

2.7 Tinh chế IgG thỏ

Kháng thể IgG (thỏ hoặc chuột) trong huyết thanh ở lần tiêm cuối cùng được thu nhận bằng phương pháp tủa với ammonium sulfate 45% bão hoà (AS 45%). Kiểm tra kết quả tủa bằng SDS-PAGE.

Trước khi tinh chế, cặn tủa chứa IgG được loại muối bằng thẩm tích với đệm 20mM sodium phosphate và được xác định nồng độ bằng phương pháp quang phổ. Tinh chế IgG bằng sắc kí ái lực qua cột protein G (có ái lực mạnh với phần Fc của IgG). Mẫu được nạp vào cột với tốc độ 1ml/phút. Sử dụng dung dịch đệm gắn 20mM sodium phosphate, đệm rửa giải 0.1M Glycine-HCl, đệm trung hòa 1M Tris-HCl. Các phân đoạn bám cột và không bám cột sau sắc kí được dồn mẫu và được cô đặc bằng phương pháp li tâm sử dụng amicon filter unit 10kDa cut-off. Kiểm tra kết quả tinh chế IgG thỏ hoặc chuột kháng protein E/S bằng SDS-PAGE.

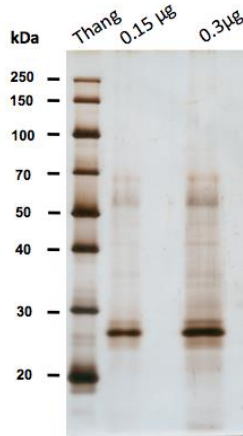
2.8 Điện di biến tính (SDS-PAGE)

SDS-PAGE được dùng để phân tích protein. Gel polyacrylamide 12.5% được sử dụng. Protein sau điện di được phát hiện bằng phương pháp nhuộm với Coomassie blue. Hình ảnh điện di được ghi nhận bằng máy quét hình ảnh HP4050.

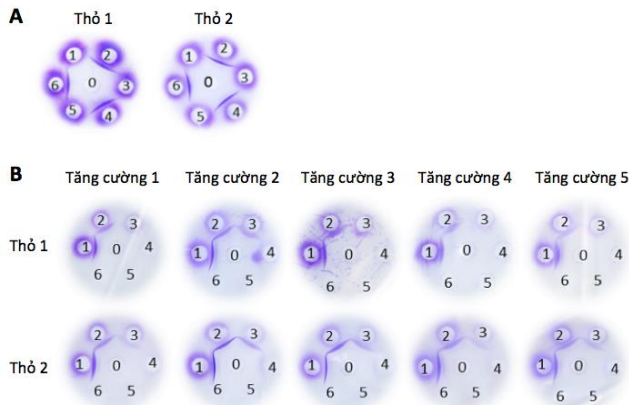
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ

Trước khi gây đáp ứng miễn dịch, thành phần protein trong E/S Ag của sản lá được phân tích bằng điện di SDS-PAGE (Hình 1). Kết quả cho thấy E/S Ag chứa một số thành phần protein, trong đó các protein có kích thước khoảng 27kDa chiếm phần lớn.



Hình 1 Phân tích E/S Ag của sản lá *F. gigantea* bằng SDS-PAGE. Phương pháp nhuộm bạc được sử dụng.



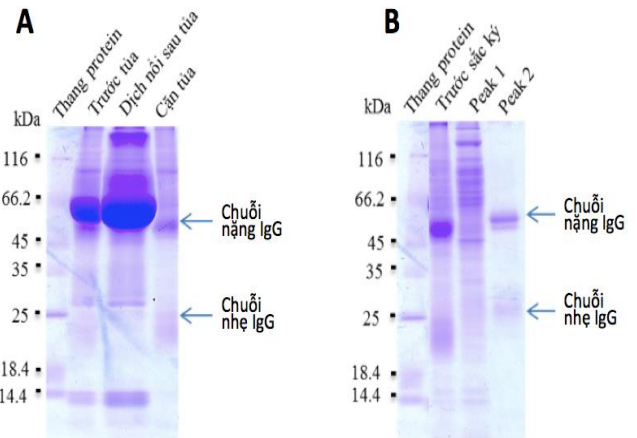
Hình 2 Phát hiện kháng thể đặc hiệu E/S Ag bằng phản ứng Ouchterlony. A: Huyết thanh thỏ trước mẫn cảm (giếng 1, 3, 5) và sau mẫn cảm (giếng 2, 4, 6). B: Huyết thanh thỏ sau các lần tiêm tăng cường pha loãng bậc 2 từ 1:2 đến 1:64 tương ứng ở các giếng 1 đến 6.

Thỏ sau khi được gây đáp ứng miễn dịch theo phác đồ được mô tả ở phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu, kháng thể IgG đặc hiệu được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán

trên thạch Ouchterlony (Hình 2). Kết quả ở Hình 2A cho thấy sau khi gây mẫn cảm, kháng thể đặc hiệu E/S Ag đã được hình thành. Ở các lần tiêm tăng cường (Hình 2B), có sự tăng dần hiệu giá kháng thể, cụ thể ở độ pha loãng huyết thanh 1:8 (giếng 3) xuất hiện vạch tủa từ lần tiêm tăng cường lần 2.

3.2 Tinh chế IgG thỏ kháng protein E/S của *F. gigantea*

Việc tinh chế được thực hiện qua 2 bước gồm tủa IgG với dung dịch AS 45% bão hòa và sắc kí ái lực với protein G. Sau khi tủa IgG, kết quả SDS-PAGE quan sát trên gel cho thấy sự gia tăng tỉ lệ IgG (quan sát chuỗi nặng (~50kDa) và chuỗi nhẹ (~25kDa) của IgG) trong hỗn hợp sau tủa so với huyết thanh ban đầu. IgG sau tủa với AS 45% được đem đi tinh chế bằng sắc kí ái lực qua cột protein G. Phân tích kết quả bằng SDS-PAGE cho thấy IgG có độ tinh sạch ước tính khoảng ~95%. Khối lượng IgG thu được ở thỏ là 26mg/ml huyết thanh.



Hình 3: Phân tích IgG thỏ sau đáp ứng miễn dịch bằng SDS-PAGE dùng gel poly-acrylamide 12.5%. A: Tủa IgG bằng AS 45% bão hòa. B: IgG sau sắc kí ái lực với Protein G.

4 Kết luận

Nghiên cứu này đã tạo thành công IgG thỏ đặc hiệu với kháng nguyên E/S của *F. gigantea* và thu nhận được lượng IgG với độ tinh sạch cao (~95%) được ước tính bằng SDS-PAGE, giữ được hoạt tính sau tinh chế. Đây là kết quả bước đầu quan trọng khi có được IgG thỏ có hoạt tính. Việc biến đổi kháng thể để sử dụng trong phản ứng ELISA phát hiện E/S Ag cần được tiếp tục nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- 1 Tolan, R.W., *Fascioliasis Due to Fasciola hepatica and Fasciola gigantica Infection: An Update on This 'Neglected' Neglected Tropical Disease*. LABMEDICINE, 2011. 42(2): p. 107-116.
- 2 Ubeira, F.M., et al., *MM3-ELISA detection of Fasciola hepatica coproantigens in preserved human stool samples*. Am J Trop Med Hyg, 2009. 81(1): p. 156-62.
- 3 Rabia, I., H. Sabry, and F. Nagy, *Comparison between Different Immunological Techniques for Detection of Circulating Fasciola Antigen in sheep*. New York Science Journal, 2010. 3: p. 34-39.
- 4 Flanagan, A.M., et al., *Standardisation of a coproantigen reduction test (CRT) protocol for the diagnosis of resistance to triclabendazole in Fasciola hepatica*. Vet Parasitol, 2011. 176(1): p. 34-42.
- 5 Espino, A.M., et al., *Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human Fasciola hepatica outbreak*. J Clin Microbiol, 1998. 36(9): p. 2723-6.

Production of rabbit IgG antibodies against excretory/secretory antigenantigen from *Fasciola gigantica*

Dang Ngoc Kim Thuy¹, Le Thi Phuong Thao², Thai Thi tuyet Trinh², Nguyen Thi Phuong², Nguyen Huu Hung^{2,*}

¹ Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University HCM City

² Faculty of Biotechnology and Environment, Nguyen Tat Thanh University

*nhhung@ntt.edu.vn

Abstract Fascioliasis is becoming a global health problem. In particular, Vietnam is one of the countries with the highest circulation. In Vietnam, the disease is caused by the parasite *Fasciola gigantica*. The most commonly used diagnostic method is serological testing for the detection of fluke-specific IgG antibodies. Because IgG exists in the blood for a long time, this method has little value in determining the time of disease development and after treatment. In order to overcome the above-mentioned weakness of serological testing, we aim to detect the excretory/secretory antigen (E/S Ag) in blood and feces by using antibodies. The objective of this study is to use the *F. gigantica* E/S Ag to produce rabbit IgG. IgG was purified using 45% Ammonium sulfate precipitation and G-protein affinity chromatography. The IgG obtained is a prerequisite for the development of a diagnostic kit for the detection of *F. gigantica* infection on human and animal through the detection of antigens in blood and feces.

Keywords Rabbit IgG, protein G, *Fasciola gigantica*, E/S Ag, diagnosis.