

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hồ Trường Giang

**NGHIÊN CỨU TẠO BA KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG (AFP,
DCP, TXN) VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG TRONG
PHÁT HIỆN UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội – 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh – Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy – Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phản biện 1: GS. TS. Trần Huy Thịnh – Trường Đại học Y Hà Nội, Bộ Y tế.

Phản biện 2: PGS. TS. Nguyễn Lai Thành – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phản biện 3: PGS. TS. Nguyễn Trung Nam – Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án:

Ung thư gan hiện đang là một thách thức sức khỏe toàn cầu, với tỷ lệ mắc và tử vong gia tăng nhanh chóng. Bệnh lý này gây gánh nặng lớn cho hệ thống y tế, đặc biệt ở các quốc gia đang phát triển. Trong đó, ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular Carcinoma - HCC) chiếm khoảng 90% các trường hợp ung thư gan nguyên phát. Cơ chế bệnh sinh chủ yếu bao gồm: yếu tố di truyền; nhiễm virus viêm gan B, C; sử dụng đồ uống có cồn trường diễn; do các chất độc hại; và rối loạn trao đổi chất, dẫn đến biến đổi ở cấp độ phân tử và hình thành ung thư.

Việc chọn 3 chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN xuất phát từ yêu cầu cấp bách trong khả năng phát hiện sớm và chính xác HCC, đặc biệt khi AFP đơn lẻ không đủ độ nhạy và độ đặc hiệu. AFP là chỉ thị sinh học được dùng phổ biến nhưng còn hạn chế độ nhạy (chỉ khoảng 70% các trường hợp). Trong khi đó, DCP đã được chứng minh cải thiện đáng kể độ đặc hiệu, hỗ trợ phát hiện bệnh ngay cả khi AFP âm tính hoặc ở mức thấp. TXN là một chỉ thị sinh học mới, gắn liền với tiến triển, apoptosis và sự xâm lấn của khối u, bổ sung giá trị phát hiện sớm HCC mà hai chỉ thị sinh học AFP và DCP có thể bỏ sót. Kết hợp bộ ba AFP-DCP-TXN không chỉ tăng cường độ nhạy, độ đặc hiệu, mà còn tạo cơ sở khoa học và thực tiễn để phát triển bộ kit xét nghiệm đa dấu ấn hiệu quả hơn, góp phần cải thiện chẩn đoán và tiên lượng sớm bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan. Vì vậy, tôi tiến hành thực hiện luận án: ***“Nghiên cứu tạo ba kháng thể đơn dòng (AFP, DCP, TXN) và bước đầu ứng dụng trong phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan”***

Mục tiêu nghiên cứu:

1. Tạo được kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP, và TXN đặc trưng ung thư biểu mô tế bào gan.

2. Tạo được kháng thể đơn dòng của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP, TXN đặc hiệu kháng nguyên ung thư biểu mô tế bào gan từ các kháng nguyên tái tổ hợp đã được tạo thành.

3. Bước đầu ứng dụng các kháng thể đơn dòng tạo thành để phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan.

Đóng góp mới:

- Đã tạo thành công bộ ba kháng thể đơn dòng từ kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP, TXN phục vụ cho chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan.

- Đã sử dụng kháng thể đơn dòng tạo được để bước đầu nghiên cứu phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan. Đồng thời đánh giá hiệu quả kháng thể về độ nhạy, độ đặc hiệu khi kết hợp ba chỉ thị này với nhau.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn:

- Ý nghĩa khoa học: Kết quả của nghiên cứu là minh chứng cho năng lực làm chủ chuỗi công nghệ sinh học khép kín, từ phân tích tin sinh học, thiết kế epitope miễn dịch, biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp, tạo tế bào lai cho đến ứng dụng phát hiện kháng nguyên trong mẫu huyết thanh. Đây là đóng góp quan trọng vào nền tảng nghiên cứu phát triển sinh phẩm chẩn đoán ung thư tại Việt Nam, hướng đến chủ động hóa công nghệ và giảm phụ thuộc nhập khẩu.

- Ý nghĩa thực tiễn: Nghiên cứu mở ra tiềm năng phát triển bộ kit xét nghiệm ELISA đa marker ứng dụng kháng thể đơn dòng nội địa, giúp tăng cường khả năng phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan, đặc biệt khi AFP đơn lẻ không đủ độ nhạy. Sản phẩm nghiên cứu có thể triển khai thử nghiệm tại các bệnh viện tuyến tỉnh, tiến tới ứng dụng rộng rãi trong các chương trình tầm soát cộng đồng, nhất là ở những khu vực có tỷ lệ mắc HCC cao.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

Ung thư gan gồm hai dạng là ung thư gan thứ phát (di căn) và ung thư gan nguyên phát. Ung thư gan thứ phát là do các tế bào ung thư của các cơ quan, bộ phận khác trong cơ thể di chuyển theo dòng máu hoặc mạch bạch huyết tới gan, định khu tại đây và hình thành khối u. Ung thư gan nguyên phát là bệnh lý ác tính của gan xảy ra khi tế bào gan bình thường trở nên bất thường về hình thái và chức năng. Ung thư gan nguyên phát gồm 3 loại chính: ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô đường mật trong gan và u nguyên bào gan. Trong đó ung thư biểu mô tế bào gan (HepatoCellular Carcinoma - HCC) là phổ biến nhất chiếm đến 90% các trường hợp ung thư gan nguyên phát.

1.1.1. Dịch tễ học của bệnh ung thư biểu mô tế bào gan

Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là loại ung thư gan nguyên phát phổ biến nhất, chiếm 80–90% tổng số ca ung thư gan. Trên toàn cầu, HCC đứng thứ 6 về tỷ lệ mắc mới và thứ 4 về tử vong do ung thư, với khoảng 866000 ca mắc và 759000 ca tử vong mỗi năm. Bệnh tập trung chủ yếu ở Đông Á và châu Phi hạ Sahara do tỷ lệ nhiễm virus viêm gan B cao, trong đó Mông Cổ có tỷ lệ mắc HCC cao nhất thế giới. Mặc dù tỷ lệ mắc chuẩn hóa theo tuổi đang giảm nhờ các chương trình tiêm chủng HBV và điều trị HCV, nhưng tổng số ca mắc HCC vẫn gia tăng do dân số già hóa. Một số nước trước đây có tỷ lệ thấp như Hoa Kỳ, Iran, Nepal... đang ghi nhận xu hướng tăng do HCV mạn tính và gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD). Tại Việt Nam, HCC là một trong những loại ung thư phổ biến và gây tử vong nhiều nhất, với hơn 24000 ca mắc mới và 25000 ca tử vong mỗi năm. Tỷ lệ mắc HCC tại Việt Nam cao gấp gần 3 lần trung bình toàn cầu, chủ yếu do viêm gan B mạn tính. Dù đã triển khai tiêm chủng HBV từ lâu, hiệu quả chưa rõ rệt ở nhóm người trưởng thành nhiễm virus từ trước. Việt Nam hiện thuộc nhóm các quốc gia có gánh nặng HCC cao nhất thế giới và được WHO ưu tiên trong chiến lược loại trừ viêm gan virus vào năm 2030.

1.1.2. Các yếu tố liên quan đến cơ chế bệnh sinh của HCC

Cơ chế bệnh sinh của HCC chịu ảnh hưởng từ cả yếu tố di truyền và môi trường. Về di truyền, các đột biến somatic như TERT (44–60%), TP53 (30–50%), CTNNB1 (20–40%) và các gen khác như AXIN1, ARID1A, ARID2, NFE2L2 góp phần thúc đẩy sinh ung thư thông qua các con đường như phiên mã telomerase, Wnt/ β -catenin, sửa chữa DNA và điều hòa stress oxy hóa. Ngoài ra, các biến thể di truyền dòng mầm (germline) như PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 cũng liên quan đến nguy cơ HCC qua cơ chế viêm gan không do rượu và xơ gan. Các yếu tố môi trường quan trọng bao gồm: nhiễm HBV – là nguyên nhân chủ yếu ở châu Á và châu Phi, gây HCC ngay cả khi chưa có xơ gan do khả năng tích hợp vào DNA vật chủ; nhiễm HCV – là nguyên nhân chính ở các nước phát triển, dẫn đến HCC thông qua cơ chế viêm mạn tính và xơ gan; và lạm dụng rượu – làm tăng nguy cơ HCC đặc biệt khi kết hợp với HBV. Ngoài ra, các yếu tố chuyển hóa như gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), đặc biệt là viêm gan nhiễm mỡ (NASH), đái tháo đường typ 2, béo phì và đề kháng insulin cũng ngày càng được công nhận là nguyên nhân nổi bật thúc đẩy HCC, nhất là ở các quốc gia phát triển. Những yếu tố này hoạt động thông qua trục tín hiệu insulin/IGF-1 và viêm mạn tính tại gan.

1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐANG ĐƯỢC SỬ DỤNG VÀ NHU CẦU PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP MỚI TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

1.2.1. Các phương pháp chẩn đoán hình ảnh

Hạn chế trong phát hiện khối u nhỏ ở giai đoạn sớm; Không xác định được tính chất khối u; Chi phí cao và hạn chế tiếp cận; Nguy cơ phơi nhiễm bức xạ và tác dụng phụ; Yêu cầu về thiết bị và kỹ thuật thực hiện.

1.2.2. Phương pháp chẩn đoán mô bệnh học, tế bào học và sinh thiết lỏng

Sinh thiết (lấy mẫu mô hoặc tế bào) là một thủ thuật xâm lấn, có thể gây đau, nhiễm trùng máu, nhiễm trùng hoặc tổn thương các cơ lân cận. Việc lấy mẫu khối u nếu không được xác định chính xác vị trí hoặc không đủ số lượng cần

thiết có thể dẫn đến kết quả tính toán hoặc dự đoán sai. Phân tích mô bệnh học và tế bào học thường mất thời gian, gây chậm trễ trong việc bắt đầu điều trị. Đối với các tổn thương rất nhỏ hoặc sâu, việc lấy mẫu sinh học có thể gặp khó khăn hoặc không khả thi. Một số bệnh nhân có tình trạng sức khỏe yếu, rối loạn đông máu hoặc vị trí khối u khó tiếp cận có thể không thích hợp để thực hiện sinh thiết

1.2.3. Xét nghiệm các chỉ thị sinh học đặc hiệu ung thư biểu mô tế bào gan

1.2.3.1. *Alpha –fetoprotein (AFP)*

AFP là một glycoprotein 70 kDa do gan bào thai và túi ối tiết ra, giảm sau sinh và duy trì mức rất thấp ở người trưởng thành khỏe mạnh. Gen AFP nằm trên nhiễm sắc thể 4 (4q11–q13), được điều hòa bởi các trình tự enhancer/silencer; sự tái hoạt hóa gen này trong HCC gây tăng nồng độ AFP trong huyết thanh. AFP tồn tại dưới ba dạng đồng phân, trong đó AFP-L3 liên quan chặt chẽ với HCC. Ngoài vai trò là dấu ấn sinh học, AFP còn tham gia vào cơ chế bệnh sinh HCC thông qua ức chế miễn dịch bẩm sinh và thích nghi, đặc biệt là tác động lên đại thực bào, tế bào T và NK. AFP được dùng trong chẩn đoán, theo dõi và tiên lượng HCC, nhưng độ nhạy–đặc hiệu còn hạn chế, nhất là ở giai đoạn sớm. Ngưỡng >200 ng/ml được chấp nhận trong chẩn đoán khi có bằng chứng hình ảnh học. Hiệu quả của AFP thay đổi theo khu vực và cơ địa di truyền miễn dịch. Để tăng độ chính xác, AFP thường được kết hợp với AFP-L3 và DCP trong mô hình ba chỉ dấu, giúp nâng cao hiệu suất sàng lọc HCC, đặc biệt tại các quốc gia châu Á có tỷ lệ mắc cao.

1.2.3.2. *DCP (des-gamma-carboxy prothrombin)*

DCP (còn gọi là PIVKA-II) là một protein bất thường do gan sản xuất trong điều kiện thiếu vitamin K, lần đầu được phát hiện tăng ở bệnh nhân HCC vào năm 1984. DCP không chỉ là dấu ấn sinh học có giá trị trong chẩn đoán HCC mà còn tham gia vào quá trình phát triển và di căn của khối u. DCP có độ nhạy và đặc hiệu cao (lần lượt là 87% và 85% ở ngưỡng 25 ng/ml), ít bị ảnh hưởng bởi các bệnh gan lành tính, giúp giảm dương tính giả so với AFP. Nồng độ

DCP phản ánh kích thước khối u, xâm lấn mạch máu và nguy cơ tái phát sau điều trị. Đặc biệt, DCP có thể phát hiện sớm huyết khối tĩnh mạch cửa – yếu tố tiên lượng sống còn. DCP cũng cho kết quả tốt trong phát hiện HCC sớm, kể cả ở bệnh nhân AFP âm tính. Khi kết hợp với AFP và AFP-L3, độ chính xác chẩn đoán tăng rõ rệt, với AUC đạt tới 0.95. Các nghiên cứu đa quốc gia và tại châu Á đã xác nhận DCP là dấu ấn huyết thanh ưu việt, đặc biệt trong HCC liên quan đến HBV. Nhờ hiệu quả vượt trội, DCP đã được đưa vào bộ ba dấu ấn sinh học chuẩn trong sàng lọc HCC hiện đại.

1.2.3.3. TXN (Thioredoxin)

TXN là một protein có kích thước 12 kDa, đóng vai trò thiết yếu trong cân bằng oxy hóa–khử nội bào, tổng hợp DNA, và điều hòa tín hiệu tế bào. TXN cùng TXNRD và NADPH tạo thành hệ thống bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa bằng cách khử các cầu disulfide của protein đích. TXN điều hòa hoạt động của các yếu tố phiên mã như NF- κ B, HIF-1 α , AP-1 và có thể tiết ra ngoài như cytokine điều hòa miễn dịch. Trong ung thư, TXN thường biểu hiện quá mức, góp phần thúc đẩy tăng sinh, chống apoptosis, tạo mạch và di căn. Ở HCC, TXN kích hoạt trực tiếp HIF-1 α /VEGF-A và AKT/mTOR, tương tác BACH1, tăng tính chất tế bào gốc và xâm lấn. Các nghiên cứu cho thấy TXN huyết thanh tăng rõ ở bệnh nhân HCC và giúp phân biệt tốt với xơ gan hoặc người khỏe mạnh. Khi kết hợp TXN với AFP, độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC cải thiện rõ rệt (AUC > 0.97). TXN có hiệu quả đặc biệt trong chẩn đoán HCC giai đoạn sớm và cả ở bệnh nhân AFP âm tính. Do đó, TXN là chỉ thị sinh học tiềm năng, nên được kết hợp cùng AFP và DCP trong sàng lọc và theo dõi HCC.

1.2.3.4. Ưu điểm của ba marker AFP, DCP, TXN trong chẩn đoán HCC

- Tăng độ chính xác và tin cậy: Kết hợp sử dụng ba chỉ thị sinh học giúp tăng độ chính xác và tin cậy của quá trình chẩn đoán, đặc biệt là khi mỗi chỉ thị sinh học có những đặc tính và độ chính xác khác nhau.

- Phản ánh đa dạng biểu hiện bệnh: HCC thường có sự đa dạng trong biểu hiện phân tử và việc kết hợp nhiều chỉ thị sinh học giúp phản ánh chính xác hơn về tình trạng bệnh.
- Giảm sai số và tăng tin cậy: Mỗi chỉ thị sinh học có thể đưa ra kết quả khác nhau trong một số trường hợp. Kết hợp sử dụng giúp giảm sai số và tăng tính tin cậy.

1.3. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ

1.3.1. Khái niệm và một số nghiên cứu kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán ung thư

Kháng thể đơn dòng (mAbs) ngày càng đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán ung thư nhờ khả năng nhận diện đặc hiệu các dấu ấn sinh học. Chúng được ứng dụng để phát hiện HER2 (ung thư vú), GPC3 (HCC), EPCA-2 (tuyến tiền liệt), giúp tăng độ chính xác và phát hiện sớm. mAbs còn được sử dụng trong các kỹ thuật như ELISA, IHC, Flow cytometry để phân tích mẫu huyết thanh, mô và tế bào. Trong chẩn đoán hình ảnh, mAbs kết hợp với chất đánh dấu phóng xạ/huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán qua PET, MRI và SPECT. Công nghệ nano gắn với mAbs cũng giúp tăng độ nhạy hình ảnh hóa. Ngoài ra, mAbs đang thúc đẩy xu hướng cá nhân hóa chẩn đoán và điều trị ung thư. Nghiên cứu và cải tiến liên tục giúp mAbs trở thành công cụ cốt lõi của ung thư học hiện đại. Chúng không chỉ hỗ trợ chẩn đoán chính xác mà còn góp phần định hướng chiến lược điều trị trúng đích.

1.3.2. Các phương pháp tạo kháng thể đơn dòng

1.3.2.1. Phương pháp tạo tế bào lai hybridoma

Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng này bắt nguồn từ việc sản xuất các tế bào lai bằng cách xác định các tế bào plasma đặc hiệu của kháng nguyên và hợp nhất các tế bào này với các tế bào myeloma. Tế bào B của chuột hoặc thỏ có thể được sử dụng để tạo thành tế bào lai hybridoma. Hybridoma được đem nuôi cấy sẽ phân chia liên tục, sản sinh ra một lượng lớn kháng thể đặc hiệu

cho kháng nguyên đã gây miễn dịch và có khả năng tồn tại lâu dài sau nhiều lần phân chia.

1.3.2.2. Công nghệ tái tổ hợp kháng thể và các công nghệ phát triển kháng thể đơn dòng mới

Công nghệ tái tổ hợp kháng thể cho phép nhân bản vùng gen VH, VL để tạo kháng thể ở nhiều định dạng như scFv, Fab, IgG toàn phần. Kháng thể có thể được biểu hiện hiệu quả trong các hệ thống E. coli, HEK293, CHO, đảm bảo số lượng lớn và đồng nhất. Phương pháp “human hóa” giúp giảm miễn dịch và kéo dài thời gian lưu hành trong cơ thể. Ngoài hybridoma, các công nghệ mới như phage display, nuôi cấy tế bào B đơn, phân tích đơn bào đang mở rộng khả năng phát triển mAbs. Những tiến bộ này đóng vai trò nền tảng cho chẩn đoán, điều trị và liệu pháp miễn dịch trúng đích hiện đại.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu tạo kháng nguyên tái tổ hợp ba chỉ thị sinh học AFP, DCP, và TXN

Trình tự 3 protein là: Alpha fetoprotein, Des-gamma-carboxy prothrombin và Thioredoxin được sử dụng để dự đoán epitope được tham khảo trên NCBI.

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu tạo kháng thể đơn dòng từ các kháng nguyên tái tổ hợp đã được tạo thành

- Kháng nguyên (protein tái tổ hợp của AFP, DCP, TXN) đã được tinh sạch được sử dụng để gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm.
- Chuột cái thuần chủng BALB/c 5 tuần tuổi, khỏe mạnh được chọn để gây miễn dịch.

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu bước đầu ứng dụng các kháng thể đơn dòng tạo thành để phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan

- Mẫu máu của 47 bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định là ung thư biểu mô tế bào gan các giai đoạn (giai đoạn sớm, giai đoạn trung gian, tiến triển và muộn), chưa phẫu thuật và/hoặc chưa điều trị bằng các thuốc chống ung thư,

không có bệnh lý ung thư tại cơ quan khác, được thu thập tại Bệnh viện Trung Ương Quân đội 108 từ tháng 6 năm 2023 đến tháng 6 năm 2024.

- Mẫu máu của 15 người không có bệnh lý của gan, không bị các bệnh ung thư khác và 10 người có các bệnh lý về gan (như nhiễm HBV, HCV, xơ gan) nhưng không mắc HCC, được thu thập tại Bệnh viện Trung Ương Quân đội 108 từ tháng 6 năm 2023 đến tháng 6 năm 2024.

Quá trình thu thập mẫu nghiên cứu được sự phê duyệt của Hội đồng Đạo đức số 06-2020/NCHG-HĐĐĐ, ngày 12 tháng 10 năm 2020.

2.2. HOÁ CHẤT, TRANG THIẾT BỊ, DỤNG CỤ

Các hóa chất, máy móc và thiết bị phục vụ cho nghiên cứu này thuộc Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nghiên cứu *in silico* nhằm tìm kiếm các đoạn gen giàu epitope

Nghiên cứu sử dụng công cụ tin sinh học để dự đoán các đoạn peptide giàu epitope từ ba protein AFP, DCP, TXN. BepiPred 2.0 được dùng để xác định epitope liên tục (điểm ≥ 0.5), Discotope 2.0 cho epitope không liên tục (điểm ≥ -3.7). Tính kháng nguyên được đánh giá qua VaxiJen và AntigenPro, trong khi đặc tính lý hóa tính bằng ExPASy. Các peptide đạt yêu cầu được chuyển đổi thành trình tự nucleotide bằng MEGA X, thêm điểm cắt *NdeI* và *XhoI*.

2.3.2. Phương pháp tạo kháng nguyên tái tổ hợp

Nghiên cứu thực hiện tạo vector pET22b+ mang gen mục tiêu (AFP, DCP, TXN) thông qua cắt-gắn bằng enzym giới hạn và T4 ligase, sau đó biến nạp vào *E.coli* BL21 bằng sốc nhiệt. Quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp được tối ưu hóa điều kiện cảm ứng IPTG, nhiệt độ, thời gian và được kiểm tra qua SDS-PAGE. Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột Ni-NTA nhờ thẻ 6xHis, hiệu suất ước lượng theo số phân đoạn rửa giải. Kiểm tra xác nhận bằng Western blot sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu và hệ HRP-TMB phát hiện. Định lượng nồng độ protein thực hiện bằng phương pháp Bradford, so với đường chuẩn BSA trên phổ UV-VIS tại bước sóng 595 nm..

2.3.3. Phương pháp tạo kháng thể đơn dòng

Nghiên cứu sử dụng chuột BALB/c để gây miễn dịch nhanh với kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP, TXN, phối trộn với tá chất FCA/FIA, theo lịch tiêm 0–3–6 ngày. Sau lần tiêm cuối, tế bào lympho B từ lách và hạch bẹn được thu và dung hợp với tế bào myeloma bằng PEG50%, nuôi chọn trong môi trường HAT để tạo hybridoma. Tế bào lai được sàng lọc qua ELISA để xác định khả năng tiết kháng thể đặc hiệu, sau đó tách dòng và kiểm tra tính đặc hiệu bằng tỷ số tín hiệu/nhiều (SNR). Các dòng cho hiệu giá cao, không phản ứng chéo với *E. coli* BL21, được chọn để nhân giống, bảo quản, và gây báng trên chuột. Dịch báng chứa kháng thể được thu, pha loãng, đo OD_{450nm} bằng ELISA, tính SD, CV để xác định hiệu giá kháng thể và đánh giá sơ bộ khả năng trung hòa.

2.3.4. Tinh sạch kháng thể đơn dòng

Kháng thể được tinh sạch dựa trên nguyên tắc sắc ký ái lực với Protein A/G liên kết vùng Fc của IgG. Dịch nuôi cấy từ tế bào lai được ly tâm, lọc 0.22 μ m rồi pha loãng với dung dịch đệm và ủ trên cột Protein A/G. Các bước rửa và rửa giải được thực hiện bằng Binding Buffer và Elution Buffer, mẫu được trung hòa ngay sau rửa giải. Kháng thể thu được được bảo quản ở 4°C (ngắn hạn) hoặc –20°C (dài hạn) để duy trì hoạt tính và độ tinh khiết.

2.3.5. Sử dụng kháng thể đơn dòng trong phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên trong các mẫu huyết thanh bệnh nhân

Nghiên cứu đánh giá phản ứng miễn dịch giữa các kháng thể đơn dòng AFP/DCP/TXN với huyết thanh của ba nhóm: HCC, bệnh gan mạn tính không HCC, và người khỏe mạnh. Mẫu máu được thu thập tại Bệnh viện 108, tách huyết thanh và bảo quản theo quy chuẩn. Kỹ thuật ELISA gián tiếp được tối ưu cho từng kháng thể và kháng nguyên, thực hiện lặp lại ba lần để đảm bảo độ tin cậy. Cut-off value được xác định theo công thức $\bar{X} + 3.SD$ từ các mẫu âm tính độc lập. Đường cong chuẩn được dựng bằng mô hình 4PL

logistic, sử dụng Python để phân tích nồng độ từ OD. AUC được tính nhằm đánh giá độ nhạy tổng thể của kháng thể đơn dòng trong phát hiện HCC.

2.4. PHÂN TÍCH VÀ XỬ LÝ KẾT QUẢ TRONG NGHIÊN CỨU

- Xử lý số liệu bằng phần mềm: SPSS 2.0, Graphpad Prism 9.0.0
- Sử dụng các thuật toán: χ^2 , tính tỷ lệ phần trăm, so sánh giá trị trung bình, hệ số đồng thuận Kappa (K).
- Xây dựng đường cong chuẩn: Python.

2.5. ĐỊA ĐIỂM TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU

- Phòng thí nghiệm Hệ gen học vi sinh - Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Các mẫu nghiên cứu được thu thập tại Khoa Khám bệnh và tại Khoa A3B (Nội Gan, mật, tụy) - Bệnh viện Trung Ương Quân đội 108..

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ TẠO KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP BA CHỈ THỊ SINH HỌC AFP, DCP, TXN

3.1.1. Kết quả dự đoán epitope của các protein AFP, DCP, TXN

3.1.1.1. Dự đoán epitope liên tục

Dựa trên BepiPred 2.0, AFP (609 aa) có 21 đoạn epitope, nổi bật là E11–E14 với điểm ≥ 0.62 , ưu tiên chọn do độ dài và điểm cao. DCP (622 aa) có 16 đoạn, epitope E7 (281–361) dài nhất và có điểm 0.63, tập trung ở vùng trung tâm ổn định về cấu trúc, thuận lợi cho biểu hiện kháng nguyên. TXN (105 aa) có 2 epitope đạt chuẩn (E1, E2) với điểm > 0.65 , nằm ở vùng đầu và giữa chuỗi, giàu acid amin tích điện, dễ nhận diện kháng thể. Kết quả hỗ trợ lựa chọn các đoạn giàu epitope để thiết kế kháng nguyên tái tổ hợp phục vụ tạo kháng thể đơn dòng.

3.1.1.2. Dự đoán epitope không liên tục

AFP được mô hình hóa bằng Phyre2 dựa trên template albumin người (PDB: 1e7bA), kết quả Discotope 2.0 xác định 12 aa thuộc 2 vùng (321–340 và

387–391) là epitope không liên tục có khả năng gắn kết kháng thể. DCP sử dụng cấu trúc tinh thể 6BJR, phát hiện 70 aa vượt ngưỡng -3.7, tạo nên 5 cụm epitope không liên tục trùng với các vùng epitope liên tục đã dự đoán trước đó, tăng độ tin cậy. TXN sử dụng mô hình 1ERT nhưng không có aa nào vượt ngưỡng -3.7, cho thấy không có epitope không liên tục đáng tin cậy. Điều này phù hợp với đặc tính protein nhỏ, cấu trúc gấp chặt của TXN. TXN do đó được ưu tiên khai thác theo hướng epitope liên tục để phát triển kháng thể.

3.1.1.3. Kết quả lựa chọn đoạn peptide giàu epitope

Ba đoạn peptide giàu epitope đã được chọn để biểu hiện protein tái tổ hợp từ AFP, DCP và TXN. Đoạn AFP (aa 319–426, 108 aa) bao phủ cụm epitope liên tục và không liên tục, thuận lợi cho thiết kế kháng nguyên. Đoạn DCP (aa 281–361, 81 aa) là epitope liên tục dài nhất, điểm BepiPred cao, tập trung nhiều vùng miễn dịch mạnh. Đoạn TXN (aa 5–99, 95 aa) bao trọn hai epitope chính, nằm ở vùng ổn định về cấu trúc, thích hợp cho biểu hiện và ứng dụng trong ELISA.

3.1.1.4. Đánh giá tính kháng nguyên của các đoạn protein lựa chọn

Ba đoạn protein P-AFP, P-DCP và P-TXN được đánh giá bằng hai công cụ VaxiJen và AntigenPro với ngưỡng tiêu chuẩn 0.4–0.5. P-TXN cho kết quả cao nhất ở cả hai công cụ, khẳng định đây là kháng nguyên mạnh, lý tưởng cho ELISA và phát triển kháng thể. P-AFP đạt điểm cao ở AntigenPro, cho thấy tiềm năng miễn dịch tốt dù VaxiJen đánh giá thấp hơn. P-DCP có điểm trung bình nhưng lại sở hữu cụm epitope liên tục – không liên tục chồng lấp, giúp tăng hiệu quả sinh miễn dịch khi dùng làm kháng nguyên tái tổ hợp.

3.1.1.5. Đánh giá tính chất vật lý của ba đoạn protein

Ba peptide P-AFP, P-DCP và P-TXN được phân tích bằng ExPASy để đánh giá khả năng biểu hiện và ứng dụng. P-DCP có độ ổn định và thời gian bán hủy cao nhất, lý tưởng cho tái tổ hợp nhưng cần cải thiện khả năng hòa tan. P-TXN có tính cân bằng tốt nhất giữa độ bền, hòa tan và ổn định, là lựa chọn

tối ưu để phát triển kháng nguyên. P-AFP tuy kém ổn định nhưng chứa nhiều epitope, phù hợp nếu tối ưu biểu hiện và tinh sạch. Việc chọn peptide cần đồng thời cân nhắc cả tính kháng nguyên lẫn đặc tính vật lý-sinh học.

* Kết luận về độ tin cậy của quy trình dự đoán epitope: Quy trình dự đoán epitope kết hợp BepiPred 2.0 và Discotope 2.0 cùng mô hình 3D đã đảm bảo tính nhất quán và độ chính xác không gian bề mặt kháng nguyên. Các epitope của AFP và DCP cho thấy sự trùng lặp giữa epitope liên tục và không liên tục, giảm nguy cơ dương tính giả. Đánh giá bằng VaxiJen và AntigenPro khẳng định tính kháng nguyên cao, đặc biệt với P-TXN. Tổng hợp với các đặc tính vật lý từ ExPASy, các peptide được lựa chọn đủ độ tin cậy để làm kháng nguyên tái tổ hợp.

3.1.1.6. Thiết kế và tối ưu hóa trình tự nucleotide cho biểu hiện tái tổ hợp

Trình tự nucleotide của ba đoạn peptide (P-AFP: 348 bp, P-DCP: 267 bp, P-TXN: 309 bp) được thiết kế bằng phần mềm MEGA X dựa trên mã di truyền chuẩn từ trình tự amino acid. Mỗi trình tự được gắn thêm điểm cắt giới hạn NdeI (đầu 5') và XhoI (cuối 3') để thuận tiện cho việc nhân dòng và biểu hiện. Trình tự tối ưu hóa này đảm bảo phù hợp với khung đọc mở và điều kiện biểu hiện trong *E. coli*.

3.1.2. Kết quả biến nạp vào *E.coli*

Gen mục tiêu *AFP* 348 bp, *DCP* 267 bp và *TXN* 309 bp được cắt từ vector pJET1.2 bằng enzym NdeI và XhoI, sau đó chèn vào vector biểu hiện pET22b+. Quá trình nối gen thực hiện bằng T4 ligase và biến nạp vào *E. coli* BL21 bằng sốc nhiệt. Các khuẩn lạc kháng ampicillin được chọn lọc và kiểm tra plasmid tái tổ hợp qua điện di. Kết quả điện di cho thấy băng DNA supercoiled rõ ràng và PCR khuẩn lạc xác nhận kích thước gen đúng như thiết kế. Điều này khẳng định gen mục tiêu đã được chèn chính xác vào vector biểu hiện, sẵn sàng cho giai đoạn biểu hiện protein.

3.1.3. Giải trình tự DNA của AFP/DCP/TXN

Các khuẩn lạc dương tính mang plasmid chứa gen AFP, DCP, TXN được giải trình tự bằng phương pháp Sanger sử dụng môi T7 promoter. Trình tự thu được được căn chỉnh bằng ClustalW (BioEdit) và cho kết quả trùng khớp hoàn toàn với thiết kế ban đầu, không có sai sót về nucleotide hay khung đọc. Vùng gen mã hóa cùng codon khởi đầu và promoter T7 đều chính xác, đảm bảo khả năng phiên mã. Những dòng đạt yêu cầu được bảo quản để phục vụ biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp.

3.1.4. Biểu hiện protein tái tổ hợp

3.1.4.1. Kết quả biểu hiện protein tổng số

Ba khuẩn lạc đại diện mang gen AFP, DCP, TXN được cảm ứng bằng IPTG và phân tích bằng SDS-PAGE. Kết quả cho thấy xuất hiện các băng protein tái tổ hợp với kích thước lần lượt 15 kDa (AFP), 10 kDa (DCP) và 12 kDa (TXN), đúng với thiết kế. Không thấy các băng tương ứng trong mẫu đối chứng, xác nhận biểu hiện thành công.

3.1.4.2. Tối ưu biểu hiện AFP, DCP, TXN

Quy trình tối ưu hóa điều kiện biểu hiện protein tái tổ hợp được thực hiện với ba yếu tố: nồng độ IPTG, thời gian và nhiệt độ nuôi. AFP đạt hiệu suất cao nhất với 0.1 mM IPTG, 12 giờ, 37°C; DCP tối ưu ở 0.1 mM IPTG, 9 giờ, 25°C; TXN tối ưu ở 0.2 mM IPTG, 12 giờ, 37°C. DCP cần nhiệt độ thấp để đảm bảo gấp cuộn chính xác, trong khi AFP và TXN phù hợp với điều kiện tăng trưởng nhanh. Kết quả đảm bảo hiệu quả thu nhận protein cao, giảm nguy cơ sai gấp hoặc hình thành thể vùi.

3.1.5. Tinh sạch các protein tái tổ hợp

Tỷ lệ mật độ vạch AFP so với tổng mật độ các protein trong mỗi phân đoạn tinh sạch đạt từ 80 – 86%, tương ứng với độ tinh khiết $\geq 80\%$. Tổng mật độ vạch AFP sau tinh sạch so với vạch trong mẫu lysate ban đầu cho thấy hiệu suất thu hồi đạt khoảng 73%. Độ tinh khiết của các phân đoạn E1–E4 của DCP đạt từ 78 – 85%, phản ánh chất lượng tinh sạch cao. Hiệu suất thu hồi

tổng thể so với mẫu lysate thô đạt khoảng 71 – 76%, cho thấy quá trình thu nhận protein DCP có hiệu quả tốt. Độ tinh khiết của các phân đoạn E1–E5 đạt từ 85 – 90%, với băng TXN rõ, đậm, sắc nét. Hiệu suất thu hồi tổng thể so với mẫu lysate thô đạt khoảng 93 – 96%, cao nhất trong ba protein được tinh sạch.

3.1.6. Kiểm tra sản phẩm tinh sạch bằng phản ứng Western blot

Kết quả Western blot cho thấy cả ba protein tái tổ hợp AFP (15 kDa), DCP (10 kDa) và TXN (12 kDa) đều xuất hiện dưới dạng một băng đơn rõ nét, đúng kích thước dự kiến. Điều này chứng minh các protein đạt độ tinh sạch cao, không bị phân giải, giữ nguyên cấu trúc kháng nguyên đặc hiệu theo thiết kế. Đặc biệt, TXN thể hiện tính ổn định nổi bật, không xuất hiện băng phụ, phù hợp với các báo cáo trước về độ bền cấu trúc của protein này.

3.1.7. Đo nồng độ protein tái tổ hợp

Nồng độ protein tái tổ hợp đo bằng phương pháp Bradford đạt: AFP 0.663 mg/ml, DCP 0.328 mg/ml, TXN 0.851 mg/ml, với độ chính xác cao ($R^2 > 0.98$). Dù thấp hơn các nghiên cứu trước, việc không sử dụng ure nhằm tránh ngộ độc trên động vật giúp đảm bảo tính an toàn sinh học. Protein được thu nhận nhờ kết hợp sóng siêu âm và enzym lysozyme, thể hiện hiệu quả đủ cho các ứng dụng tiếp theo dù chưa tối ưu về sản lượng.

3.2. KẾT QUẢ TẠO KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG BA CHỦ THỊ SINH HỌC AFP, DCP, TXN TỪ KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP TẠO THÀNH

3.2.1. Kết quả gây kích ứng miễn dịch trên chuột BALB/c

Quy trình gây miễn dịch với kháng nguyên AFP, DCP, TXN (400 µg/ml, phối FCA/FIA) không gây độc, chuột khỏe mạnh, phản xạ và cân nặng bình thường. 100% chuột tiêm kháng nguyên có dấu hiệu đáp ứng miễn dịch mạnh, phù hợp với cơ chế sinh kháng thể. Thiết kế (FCA mũi đầu, FIA nhắc lại) và liều tiêm (20 µg kháng nguyên) tuân thủ tiêu chuẩn quốc tế, an toàn, phù hợp cho sản xuất kháng thể đơn dòng ở chủng BALB/c.

3.2.2. Kết quả dung hợp tế bào lympho B của chuột và tế bào myeloma

3.2.2.1. Kết quả phục hồi, cấy chuyển và nhân giống tế bào myeloma

Tế bào myeloma được rửa đông, phục hồi và nuôi cấy trong điều kiện chuẩn 5% CO₂; sau 48 giờ quan sát thấy tế bào con phát triển xung quanh cụm mẹ, duy trì hình thái đặc trưng. Sau 72 giờ nuôi cấy, tế bào đạt độ phủ 80%, được cấy chuyển sang chai mới để tăng sinh; quá trình nhân giống tiếp tục theo dõi đến khi đủ mật độ. Kết quả xác nhận tế bào phục hồi sống tốt, nhân nhanh, đủ số lượng và chất lượng cho bước dung hợp với tế bào lympho B để tạo hybridoma.

3.2.2.2. Kết quả dung hợp tế bào myeloma và tế bào lympho B

Sau lần dung hợp thứ hai, tế bào myeloma và lympho B được nuôi trong môi trường HAT trên đĩa 96 giếng, sau 5 ngày đã xuất hiện cụm tế bào lai ở khoảng 30% giếng. Đến ngày thứ 10, tỷ lệ giếng có tế bào lai phát triển khỏe đạt khoảng 70%, với mật độ phủ đáy giếng lên đến 80%, cho thấy khả năng dung hợp thành công. Kết quả phù hợp với các báo cáo trước, khẳng định thời gian dung hợp tối ưu từ 7–10 ngày và đủ điều kiện tiến hành sàng lọc bằng ELISA.

3.2.3. Kết quả sàng lọc và tách dòng các tế bào lai có khả năng sinh kháng thể đơn dòng

Kết quả ELISA cho thấy hệ thống phản ứng hoạt động chính xác với giá trị nền (Blank), âm tính và dương tính đạt chuẩn, khẳng định tính đặc hiệu và độ nhạy cao. Sáu dòng tế bào lai (AFP1/2, DCP1/2, TXN1/2) tạo kháng thể đơn dòng có giá trị SNR cao (≥ 3.64), phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp, không phản ứng chéo với *E.coli* BL21. Các dòng này được chọn để nhân giống, tiêm chuột gây báng và phục vụ các bước phát triển kháng thể tiếp theo.

3.2.4. Kết quả gây báng thu dịch kháng thể bằng các dòng tế bào lai

3.2.4.1. Kết quả gây báng cho chuột BALB/c bằng AFP1 và AFP2

Tiêm dòng tế bào lai AFP1 (2×10^6 tế bào/con) gây báng thành công ở 4/5 chuột sau 6–7 ngày, thu được 11 ml dịch báng, trung bình 3 ml/con. Dòng AFP2 cho kết quả tối ưu hơn, gây báng ở cả 5/5 chuột sau 9–10 ngày với tổng dịch báng thu được là 12 ml. Cả hai dòng tế bào AFP1 và AFP2 đều chứng minh khả năng gây báng hiệu quả, tạo nền tảng thuận lợi cho thu nhận và tinh sạch kháng thể đơn dòng..

3.2.4.2. Kết quả gây báng cho chuột BALB/c bằng DCP1 và DCP2

Dòng DCP1 gây báng thành công ở 4/5 chuột sau 5–6 ngày, với tổng lượng dịch báng thu được là 12 ml, trung bình 3.5 ml/con. Dòng DCP2 gây báng hiệu quả, tất cả chuột đều xuất hiện báng, thu được 14 ml dịch báng sau tiêm với cùng liều 2×10^6 tế bào/con. Kết quả chứng minh cả hai dòng DCP1 và DCP2 đều thích hợp cho sản xuất kháng thể đơn dòng với hiệu suất tạo báng cao.

3.2.4.3. Kết quả gây báng cho chuột BALB/c bằng TXN1 và TXN2

Tiêm dòng TXN1 gây báng thành công ở cả 5/5 chuột sau 6 ngày, thu được tổng 11 ml dịch báng, trung bình 2–3 ml/con. Dòng TXN2 cũng cho hiệu quả cao, với tổng lượng dịch báng thu được là 13 ml từ 5 chuột sau tiêm 2×10^6 tế bào/con. Cả hai dòng TXN1 và TXN2 đều đạt hiệu quả gây báng 100%, lượng dịch thu ổn định, sẵn sàng cho thu nhận và tinh sạch kháng thể đơn dòng.

3.2.4.4. Đánh giá kết quả gây báng cho chuột BALB/c bằng 6 dòng tế bào lai

Thời gian xuất hiện dịch báng dao động 5–10 ngày, ngắn hơn nhiều nghiên cứu trước, cho thấy quy trình tối ưu. Khoảng cách giữa tiêm pristane và tế bào, liều tế bào và độ ổn định dòng hybridoma ảnh hưởng rõ đến hiệu quả gây báng. Các dòng AFP1, DCP1 có hiệu suất thấp hơn (80%) có thể do tăng sinh yếu hoặc đáp ứng miễn dịch cá thể chuột khác nhau.

3.2.5. Kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể trong dịch báng chuột

3.2.5.1. Đối với hai dòng tế bào lai AFP1 và AFP2

Cả hai dòng AFP1 và AFP2 đều cho hiệu giá kháng thể cao với $OD_{450nm} > 2.8$ tại các độ pha loãng 1:100 và 1:200, CV% thấp chứng minh độ lặp lại tốt. Khi tăng pha loãng, OD_{450nm} giảm dần theo quy luật, nhưng AFP2 duy trì

phản ứng mạnh hơn AFP1 ở các độ pha loãng cao. Kết quả khẳng định cả hai dòng đều sản xuất kháng thể đặc hiệu hiệu quả, trong đó AFP2 có tiềm năng mạnh hơn cho ứng dụng tiếp theo.

3.2.5.2. Đối với hai dòng tế bào lai DCP1 và DCP2

Hai dòng DCP1 và DCP2 đều tạo kháng thể đặc hiệu tốt với kháng nguyên DCP, OD_{450nm} giảm dần khi pha loãng tăng, tuân theo quy luật. DCP1 có hiệu giá kháng thể cao hơn DCP2 ở mọi tỷ lệ pha loãng, nhưng cả hai đều cho kết quả ổn định với CV% < 10%. Kết quả xác nhận khả năng sản xuất kháng thể đặc hiệu tốt của cả hai dòng, đủ điều kiện phát triển kháng thể đơn dòng chống DCP.

3.2.5.3. Đối với hai dòng tế bào lai TXN1 và TXN2

TXN1 và TXN2 đều tạo kháng thể đặc hiệu tốt, với TXN1 cho hiệu giá kháng thể cao hơn ở mọi tỷ lệ pha loãng. TXN2 ổn định hơn ở pha loãng thấp nhưng suy giảm nhanh hơn ở tỷ lệ pha loãng cao. Cả hai dòng đều đáp ứng tốt yêu cầu sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu, phù hợp cho các bước phát triển tiếp theo.

3.2.5.4. Đánh giá hiệu giá kháng thể trong dịch băng chuột với 6 dòng tế bào lai

Ba dòng AFP1, AFP2 và DCP1 cho hiệu giá kháng thể rất cao với OD_{450nm} > 2.8 tại pha loãng 1:200 và vẫn >1.7 tại 1:400–1:800, vượt ngưỡng tiêu chuẩn. Các dòng DCP2, TXN1 và TXN2 có OD_{450nm} thấp hơn (1.2 tại 1:400), nhưng vẫn đáp ứng tiêu chuẩn hiệu giá kháng thể. Kết luận: AFP1/AFP2/DCP1 có hiệu giá vượt trội; DCP2/TXN1/TXN2 vẫn đủ mạnh để sử dụng, cho thấy cả 6 dòng đều đạt tiêu chuẩn tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu.

3.2.6. Kết quả tinh sạch kháng thể đơn dòng

Ba kháng thể đơn dòng kháng AFP, DCP và TXN sau tinh sạch đều cho hai băng protein đặc trưng tại 50 kDa và 25 kDa, tương ứng chuỗi nặng và nhẹ

của IgG. Không xuất hiện băng tạp nào khác, chứng tỏ quy trình tinh sạch bằng cột protein G đạt hiệu quả cao với độ tinh khiết trên 95%.

3.3. KẾT QUẢ ỨNG DỤNG KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TRONG XÉT NGHIỆM ELISA BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ CÁC TRƯỜNG HỢP MẮC UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

3.3.1. Đặc điểm chung của các nhóm nghiên cứu

3.3.1.1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

Trong 47 bệnh nhân HCC, nhóm ≥ 60 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (72.34%), phù hợp xu hướng chung toàn cầu, nhưng HCC vẫn có thể gặp ở người < 45 tuổi. Nam giới chiếm đa số (87.2%) với tỉ lệ nam/nữ là 7:1, phản ánh sự khác biệt giới tính trong HCC do lối sống, nội tiết và miễn dịch. Yếu tố nguyên nhân chính là nhiễm HBV (81%), theo sau là HCV (10.6%) và xơ gan do rượu (6.3%), tương tự dữ liệu dịch tễ khu vực. Chỉ 17% bệnh nhân được phát hiện ở giai đoạn sớm, còn lại 83% ở các giai đoạn muộn, cho thấy vấn đề lớn về sàng lọc và phát hiện sớm.

3.3.1.2. Đặc điểm chung của các nhóm không mắc ung thư biểu mô tế bào gan

Nhóm không mắc HCC gồm 10 bệnh nhân có bệnh lý tại gan (xơ gan, viêm gan B mạn, absces gan, đồng nhiễm HBV/HCV) và 15 bệnh nhân không có bệnh lý gan, độ tuổi từ 38–79. Không có trường hợp HCC nào trong nhóm bệnh lý gan, cho thấy HCC vẫn có thể xảy ra mà không cần nền tảng xơ gan, đặc biệt ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính.

3.3.1.3. Các chỉ số sinh hóa đánh giá chức năng gan trong các nhóm nghiên cứu

Các chỉ số sinh hóa gan khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa ba nhóm ($p < 0.001$), trong đó nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư có AST, ALT, Bilirubin và PT-INR cao nhất, Albumin thấp nhất. Nhóm HCC có tổn thương gan vừa phải, phản ánh đặc điểm của viêm gan mạn hoặc xơ gan còn bù, với AST/ALT tăng vừa và Albumin còn bảo tồn. Nhóm bệnh gan không ung thư

biểu hiện đặc trưng của suy gan nặng hoặc viêm gan cấp, với ALT và PT-INR tăng mạnh, Albumin giảm sâu.

3.3.2. Kết quả phản ứng ELISA của các nhóm nghiên cứu

3.3.2.1. Tối ưu các điều kiện phản ứng ELISA gián tiếp phát hiện kháng nguyên AFP/DCP/TXN trong mẫu huyết thanh bệnh nhân

Chuẩn độ ma trận cho thấy ba cặp kháng nguyên – kháng thể (AFP, DCP, TXN) đều đạt hiệu suất gắn kết cao với giá trị OD450nm đỉnh lần lượt là 1.849 (AFP-mAb tại mAb 1:128, rAg 1:16), 1.865 (DCP-mAb tại mAb 1:64, rAg 1:8), và 1.975 (TXN-mAb tại mAb 1:128, rAg 1:8), đồng thời các mẫu trắng có OD rất thấp, phản ánh nền không đáng kể. TXN có độ nhạy đặc biệt cao, nhưng nồng độ quá cao có thể gây ức chế phản ứng. Các vùng tối ưu đều tập trung ở pha loãng kháng thể 1:64–1:128 và kháng nguyên 1:8–1:16. Tối ưu hóa phản ứng ELISA cho thấy pha loãng huyết thanh ở tỉ lệ 1/5 cho P/N cao nhất (6.2), đảm bảo tín hiệu mạnh và nền thấp. Trong blocking, 1.5% BSA cho hiệu quả tối ưu với P/N đạt 8.2, giúp ngăn bám không đặc hiệu mà không ảnh hưởng đến phản ứng đặc hiệu. Kháng thể thứ cấp cộng hợp enzym HRP đạt hiệu quả cao nhất khi pha ở tỷ lệ 1/15000 (P/N = 5.3), giúp nâng cao độ nhạy mà vẫn duy trì nền thấp. Các điều kiện tối ưu này góp phần hoàn thiện hệ thống ELISA với tín hiệu mạnh, nền thấp và độ đặc hiệu cao, phục vụ hiệu quả cho các bước đánh giá định lượng sau này.

3.3.2.2. Xây dựng và đánh giá đường cong chuẩn 4 tham số

Ba đường cong chuẩn theo mô hình logistic 4 tham số cho AFP, DCP và TXN đều cho thấy độ khớp cao với dữ liệu thực nghiệm ($R^2 > 0.99$), chứng tỏ mô hình phù hợp tốt. Kháng thể AFP có $EC_{50} = 8694.2$ ng/ml, độ dốc -1.30 và OD nền thấp, phản ứng ổn định, thích hợp cho định lượng nồng độ thấp. DCP có OD tương đương AFP nhưng EC_{50} cao (222.754 ng/ml), ái lực yếu hơn, phù hợp với mẫu có nồng độ DCP cao. TXN có OD max cao nhất (2.0195), EC_{50} ở mức trung bình (1687.9 ng/ml), độ dốc thấp, tạo tín hiệu rõ, thích hợp cho bổ sung phát hiện trong các trường hợp AFP âm tính.

Kết quả cho thấy ba kháng thể đều có hiệu năng tốt, đáp ứng yêu cầu về độ nhạy và đặc hiệu. Bộ ba marker AFP–DCP–TXN có tiềm năng cao trong sàng lọc HCC nhờ phản ứng mạnh, bền và tuyến tính. ELISA là lựa chọn phù hợp để xây dựng bộ kit định lượng đa chỉ dấu HCC, nhờ độ lặp lại tốt, chi phí hợp lý và khả năng triển khai rộng trong thực hành lâm sàng.

3.3.2.3. Kết quả phân tích các mẫu bệnh với đường cut-off

Kết quả xét nghiệm ELISA cho ba marker AFP, DCP và TXN cho thấy tỷ lệ mẫu huyết thanh dương tính dao động 50–65% tùy theo ngưỡng cut-off. AFP có tỷ lệ dương cao (55–65%) nhưng phân biệt dương/âm kém do tín hiệu chồng lấn, phản ánh độ đặc hiệu thấp ở ngưỡng nhạy. DCP cũng cho kết quả tương tự, tín hiệu yếu hơn, độ phân tách kém, nhưng cải thiện độ nhạy nếu phối hợp với AFP. Ngược lại, TXN cho tín hiệu OD mạnh, phân tách mẫu rõ ràng, ít chồng lấn, thể hiện khả năng đặc hiệu cao trong phát hiện HCC. Kết hợp AFP, DCP và TXN có thể khắc phục hạn chế của từng marker đơn lẻ. Đây là hướng phát triển bộ kit ELISA đa chỉ dấu hiệu quả, đặc biệt trong phát hiện sớm HCC trên nền viêm gan mạn tính.

3.3.2.4. So sánh độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp ELISA gián tiếp với chẩn đoán xác định theo hồ sơ bệnh án

Phân tích 72 mẫu huyết thanh cho thấy ELISA đơn lẻ với AFP có độ nhạy 89.36% và đặc hiệu 68%, Kappa = 0.59 – mức đồng thuận trung bình. DCP cải thiện đáng kể với Se 91.48%, Sp 80%, Kappa = 0.72. TXN vượt trội với Se 95.74%, Sp 84%, Kappa = 0.813 – cho thấy khả năng nhận diện HCC chính xác, đặc biệt ở các ca AFP âm tính. Khi kết hợp ba marker (AFP+DCP+TXN), độ nhạy đạt 97.87%, đặc hiệu 92%, PPV/NPV đều 95.83%, Kappa = 0.907 – đồng thuận gần như tuyệt đối với chẩn đoán hồ sơ bệnh án. So với nghiên cứu khác như Qi et al. (2000), kết hợp nhiều marker luôn cải thiện hiệu suất chẩn đoán. Phân tích chỉ ra rằng sử dụng AFP đơn lẻ không đủ, trong khi phối hợp với DCP và TXN giúp khắc phục hạn chế từng marker, tăng tính tin cậy trong sàng lọc HCC. TXN đặc biệt có giá trị trong

các trường hợp HCC AFP âm tính. Kết quả ủng hộ ứng dụng ELISA đa marker trong lâm sàng nhằm tăng hiệu quả phát hiện và theo dõi ung thư gan.

3.3.2.5. So sánh với kháng thể thương mại tương ứng

Dữ liệu so sánh cho thấy kháng thể đơn dòng tự tạo đạt độ tương đồng cao với kháng thể thương mại: AFP (95.83%), DCP (94.44%), TXN (93.05%). Hệ số Kappa tương ứng lần lượt là 0.903, 0.878, 0.842 – đều vượt ngưỡng “gần như hoàn hảo”. Điều này khẳng định hiệu suất chẩn đoán của kháng thể nội địa tương đương với kit thương mại. Một số mẫu vẫn gặp âm/dương tính giả, có thể do phản ứng chéo hoặc khác biệt sinh học cá thể. TXN cần tiếp tục tinh sạch để cải thiện đặc hiệu. Giải pháp đề xuất: kết hợp multiplex và kỹ thuật điện hóa phát quang để tăng độ chính xác. Kết quả từ Huy et al. (2025) củng cố độ đặc hiệu cao, không phản ứng chéo, và cho thấy khả năng phát hiện HCC giai đoạn sớm với độ nhạy cao.

3.3.2.6. Kết quả dựng biểu đồ ROC

Biểu đồ ROC cho thấy diện tích dưới đường cong (AUC) của AFP, DCP, TXN lần lượt là 0.719, 0.761 và 0.774, phản ánh AFP có hiệu suất phân loại thấp nhất. DCP cho thấy độ chính xác chẩn đoán cao hơn AFP, còn TXN nằm giữa hai chỉ thị này. Khi kết hợp cả ba marker, AUC đạt 0.87, mức “tốt”, chứng minh hiệu quả vượt trội so với từng marker đơn lẻ. Đường cong ROC hỗ trợ đánh giá độ nhạy và đặc hiệu tối ưu theo cut-off, cho thấy phương pháp kết hợp có độ tin cậy cao. Phân tích này khẳng định giá trị của xét nghiệm ELISA đa marker trong sàng lọc HCC giai đoạn sớm.

KẾT LUẬN

1. Kết quả tạo kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP và TXN

Nghiên cứu đã lựa chọn ba đoạn peptide chứa các epitope liên tục và không liên tục của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN, dựa trên các tiêu chí về tính kháng nguyên, độ hòa tan, độ ổn định và khả năng biểu hiện. Các gen mã hóa tương ứng được tổng hợp và chuyển vào vector pET22b+. Khi biểu hiện ở *E. coli* BL21, chúng cho những protein tái tổ hợp đúng kích thước (10–15

kDa), được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA. Kết quả Western blot cho thấy kháng nguyên thu được có cấu trúc và tính kháng nguyên phù hợp, đảm bảo giá trị miễn dịch học cho các bước tiếp theo. Kết quả thu được khẳng định tính mới của Luận án khi lần đầu tiên tại Việt Nam tạo được ba kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP và TXN có tính kháng nguyên cao, làm nguồn vật liệu đặc hiệu phục vụ sản xuất kháng thể đơn dòng chẩn đoán ung thư gan.

2. Kết quả tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu từ kháng nguyên tái tổ hợp

Dựa trên kháng nguyên tái tổ hợp tạo được, sáu dòng tế bào lai hybridoma (AFP1, AFP2, DCP1, DCP2, TXN1, TXN2) đã được tạo thành bằng phương pháp dung hợp tế bào B của chuột với tế bào myeloma. Các dòng tế bào này phát triển ổn định và sản xuất kháng thể đơn dòng IgG đặc hiệu tương ứng, với hiệu giá cao thu được trong dịch báng chuột BALB/c (khoảng 11–14 ml mỗi mẫu chuột). Kháng thể thu được được tinh sạch bằng sắc ký Protein A/G và đạt độ tinh khiết cao. Dưới gel SDS-PAGE, hai băng tương ứng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể hiện rõ, khẳng định kháng thể đã được tinh sạch. Như vậy, nghiên cứu đã tạo mới sáu dòng hybridoma tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP, TXN, chưa từng được công bố trong nước, có khả năng ứng dụng trực tiếp trong các xét nghiệm miễn dịch học và ELISA chẩn đoán.

3. Ứng dụng kháng thể đơn dòng trong phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan

Các kháng thể đơn dòng đã được sử dụng để phát hiện AFP, DCP và TXN trong huyết thanh người bệnh bằng phương pháp ELISA gián tiếp. Sau khi tối ưu hóa điều kiện phản ứng và dựng đường cong logistic 4 tham số, kết quả cho thấy độ nhạy của từng chỉ thị sinh học lần lượt là: AFP 89.36%, DCP 91.48%, TXN 95.74%; độ đặc hiệu lần lượt là: 68.00%, 80.00%, 84.00%. Khi phối hợp $\geq 2/3$ chỉ thị sinh học, độ nhạy đạt 97.87%, độ đặc hiệu 92.00%, với giá trị PPV và NPV đều đạt 95.83%. So sánh với kháng thể thương mại cho thấy mức độ đồng thuận cao trong khả năng phát hiện ($\geq 93\%$), khẳng định tính đặc hiệu và độ tin cậy của các kháng thể đơn dòng tự tạo. Nghiên

cứu đã lần đầu tiên tại Việt Nam phát triển thành công bộ ba kháng thể đơn dòng tái tổ hợp đặc hiệu AFP–DCP–TXN, có thể sử dụng phối hợp trong ELISA chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan, giúp cải thiện rõ rệt hiệu quả phát hiện bệnh, đặc biệt ở các trường hợp AFP đơn lẻ cho tín hiệu âm tính giả. Kết quả này mở ra hướng ứng dụng thực tiễn quan trọng, góp phần từng bước nội địa hóa các sinh phẩm chẩn đoán ung thư gan.

4. Hạn chế

- Quy mô mẫu thử nghiệm còn hạn chế (47 bệnh nhân ung thư gan và 10 bệnh nhân nhóm gan lành tính), do đó chưa đánh giá đầy đủ độ đặc hiệu của xét nghiệm trên các nhóm bệnh lý liên quan.

- Nghiên cứu mới ở giai đoạn thử nghiệm bước đầu trong phòng thí nghiệm, quy trình ELISA thực hiện thủ công, chưa phù hợp ngay với môi trường xét nghiệm lâm sàng thực tế.

- Kháng thể đơn dòng hiện chỉ được sản xuất quy mô nhỏ, chưa đánh giá độ ổn định và độ lặp lại khi sản xuất với quy mô lớn.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục đánh giá giá trị lâm sàng của kháng thể đơn dòng ở quy mô lớn và đa trung tâm để khẳng định độ tin cậy và khả năng ứng dụng thực tế của bộ ba kháng thể đơn dòng AFP, DCP và TXN, cần thiết kế các nghiên cứu mở rộng với cỡ mẫu lớn và thực hiện tại nhiều bệnh viện khác nhau nhằm đánh giá độ đặc hiệu thực tế và khả năng phân biệt với HCC. Đặc biệt, việc chứng minh hiệu quả phát hiện HCC giai đoạn sớm, khi AFP thường cho kết quả âm tính, sẽ củng cố tính ưu việt của bộ kháng thể phối hợp và mở rộng chỉ định xét nghiệm cho nhóm bệnh nhân nguy cơ cao.

2. Hoàn thiện quy trình chuẩn hóa kỹ thuật ELISA sử dụng các kháng thể đơn dòng tự tạo, bao gồm điều kiện bảo quản, độ bền kháng thể và hướng dẫn thao tác chuẩn. Đồng thời, đề xuất triển khai thử nghiệm bộ kit ELISA ở quy mô nhỏ tại một số bệnh viện tuyến tỉnh nhằm đánh giá khả năng vận hành, độ ổn định và phản hồi từ thực tiễn xét nghiệm. Các kết quả thu được sẽ là cơ sở khoa học và thực tiễn quan trọng để có thể đủ điều kiện đăng ký theo các tiêu chuẩn thành bộ kit thương mại.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Hồ Trường Giang**, Võ Thị Bích Thủy, Nghiêm Ngọc Minh (2024), Nghiên cứu tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên tái tổ hợp Alpha-Fetoprotein. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 2024, tập 539 - tháng 6 – số Chuyên đề, 437 - 446.
2. Võ Thị Bích Thủy, **Hồ Trường Giang**, Nguyễn Thị Diễm, Trần Thị Hợp, Nghiêm Ngọc Minh (2024), Tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên tái tổ hợp Des-gamma-carboxy-prothrombin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 2024, 229(13): 394 – 400.
3. Huy Quang Duong, Khai Xuan Nguyen, **Giang Truong Ho**, Minh Ngoc Nghiem, Thuy Thi Bich Vo (2024), *Development of an indirect ELISA to detect antigens using DNA origami nanoantenna labeled specific monoclonal antibodies*. *Journal of Asian Scientific Research*, 2024, 14(4): 586-596.
4. Huy Quang Duong, **Ho Truong Giang**, Nguyen Thi Diem, Thuy Thi Bich Vo (2025), Evaluation of the sensitivity and specificity of monoclonal antibodies for detecting the thioredoxin antigen in hepatocellular carcinoma patients. *Edelweiss Applied Science and Technology*, 2025, Vol. 9, No. 1: 1010-1018.