

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội – 2026

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

Học viện Khoa học và

Công nghệ



Nguyễn Thị Trung

GS. TS. Nghiêm Ngọc Minh PGS. TS. Võ Thị Bích Thủy

Hà Nội – 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng 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*" là kết quả nghiên cứu của riêng tôi, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh và PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy – Viện Nghiên cứu hệ gen (nay là Viện Sinh học), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Luận án sử dụng một phần số liệu từ Nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ theo Nghị định thư “Hợp tác nghiên cứu chế tạo bộ kit kháng thể đơn dòng nano DNA huỳnh quang đặc hiệu phục vụ chẩn đoán sớm ung thư gan”, mã số: NĐT.102.GER/21.

Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc.

Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 09 tháng 02 năm 2026

Tác giả



Hồ Trường Giang

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh và PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy, là người thầy, người cô với sự am hiểu sâu sắc và tầm nhìn rộng mở đã đưa ra những gợi ý thực tiễn, giúp tôi tiếp cận vấn đề một cách sáng tạo và hiệu quả hơn, luôn khuyến khích và hỗ trợ tôi trong việc xây dựng nền tảng lý thuyết vững chắc, giúp tôi định hình rõ ràng hướng đi của nghiên cứu và luôn tận tình hướng dẫn, hỗ trợ, cung cấp những lời khuyên quý báu trong suốt quá trình thực hiện luận án này. Những đóng góp chuyên môn và sự kiên nhẫn của thầy, cô đã giúp tôi hoàn thiện nghiên cứu với sự vững vàng và tự tin.

Nghiên cứu sinh cũng xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc, tập thể cán bộ, giảng viên Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi nhất cho nghiên cứu sinh trong quá trình học tập và nghiên cứu.

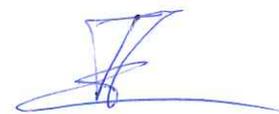
Xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo, các cán bộ quản lý, các đồng nghiệp, tại Viện Nghiên cứu hệ gen (nay là Viện Sinh học), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người đã đồng hành, chia sẻ kiến thức, kinh nghiệm và khích lệ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Cảm ơn đặc biệt tới Nhiệm vụ khoa học và công nghệ theo Nghị định thư “Hợp tác nghiên cứu chế tạo bộ kit kháng thể đơn dòng nano DNA huỳnh quang đặc hiệu phục vụ chẩn đoán sớm ung thư gan”, mã số: NĐT.102.GER/21, đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện nghiên cứu này. Sự hỗ trợ của Nghị định thư đã góp phần quan trọng vào quá trình phát triển đề tài nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Cuối cùng, tôi xin dành lời cảm ơn sâu sắc nhất đến gia đình tôi, những người đã luôn bên cạnh động viên, hỗ trợ cả về tinh thần lẫn vật chất, là nguồn động lực lớn lao giúp tôi vượt qua mọi khó khăn và hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 09 tháng 02 năm 2026

Tác giả



Hồ Trường Giang

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN	4
1.1.1. Dịch tễ học của bệnh ung thư biểu mô tế bào gan.....	4
1.1.2. Các yếu tố liên quan đến cơ chế bệnh sinh của HCC	7
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.....	11
1.2.1. Các phương pháp chẩn đoán hình ảnh.....	11
1.2.2. Phương pháp chẩn đoán mô bệnh học, tế bào học và sinh thiết lỏng.....	12
1.2.3. Xét nghiệm các chỉ thị sinh học đặc hiệu ung thư biểu mô tế bào gan ..	13
1.3. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ	27
1.3.1. Khái niệm và một số nghiên cứu kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán ung thư	27
1.3.2. Các phương pháp tạo kháng thể đơn dòng.....	30
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	34
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	34
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	34
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.....	34
2.1.3. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu bước đầu ứng dụng các kháng thể đơn dòng tạo thành để phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan	34
2.2. HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU.....	34
2.2.1. Hóa chất và sinh phẩm nghiên cứu.....	34
2.2.2. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu	35
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.3.1. Nghiên cứu <i>in silico</i> nhằm tìm kiếm các đoạn gen giàu eptiope.....	36
2.3.2. Phương pháp tạo kháng nguyên tái tổ hợp.....	37
2.3.3. Phương pháp tạo kháng thể đơn dòng.....	44

2.3.4. Tinh sạch kháng thể đơn dòng.....	51
2.3.5. Sử dụng kháng thể đơn dòng trong phản ứng ELISA phát hiện kháng nguyên trong các mẫu huyết thanh bệnh nhân.....	52
2.4. PHÂN TÍCH VÀ XỬ LÝ KẾT QUẢ TRONG NGHIÊN CỨU.....	55
2.5. ĐỊA ĐIỂM TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU.....	55
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN	56
3.1. KẾT QUẢ TẠO KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP BA CHỈ THỊ SINH HỌC AFP, DCP, TXN.....	56
3.1.1. Kết quả dự đoán epitope của các protein AFP, DCP, TXN.....	56
3.1.2. Kết quả biến nạp vào <i>E. coli</i>	66
3.1.3. Giải trình tự DNA của AFP/DCP/TXN	69
3.1.4. Biểu hiện protein tái tổ hợp	71
3.1.5. Tinh sạch các protein tái tổ hợp.....	74
3.1.6. Kiểm tra sản phẩm tinh sạch bằng phản ứng Western blot.....	77
3.1.7. Đo nồng độ protein tái tổ hợp.....	78
3.2. KẾT QUẢ TẠO KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG BA CHỈ THỊ SINH HỌC AFP, DCP, TXN TỪ KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP TẠO THÀNH	79
3.2.1. Kết quả gây miễn dịch trên chuột BALB/c	79
3.2.2. Kết quả dung hợp tế bào lympho B của chuột và tế bào myeloma	80
3.2.3. Kết quả sàng lọc và tách dòng các tế bào lai có khả năng sinh kháng thể đơn dòng.....	83
3.2.4. Kết quả gây bán thu dịch kháng thể bằng các dòng tế bào lai	84
3.2.5. Kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể trong dịch bán thu chuột.....	87
3.2.6. Kết quả tinh sạch kháng thể đơn dòng.....	90
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.....	91
3.3.1. Đặc điểm chung của các nhóm nghiên cứu.....	91
3.3.2. Kết quả phản ứng ELISA của các nhóm nghiên cứu.....	95
KẾT LUẬN.....	112
KIẾN NGHỊ.....	114
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	115
TÀI LIỆU THAM KHẢO	116

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases	Hiệp hội Nghiên cứu Bệnh gan Mỹ
AFP	Alpha-fetoprotein	Alpha-fetoprotein (protein chỉ thị ung thư)
AUC	Area Under the Curve	Diện tích dưới đường cong
BCR	B Cell Receptor	Thụ thể tế bào B
BSA	Bovine Serum Albumin	Albumin huyết thanh bò
CDR	Complementarity-determining region	Vùng xác định mức độ bổ sung
CEP	Conformational Epitope Prediction	Dự đoán cấu hình epitope
CEUS	Contrast-enhanced ultrasound	Siêu âm tương phản
CT	Computed Tomography	Chụp cắt lớp vi tính
CTCs	Circulating tumor cells	Các tế bào u lưu hành trong hệ tuần hoàn
ctDNA	Circulating tumor DNA	DNA khối u tự do
DCP	Des-gamma-carboxy prothrombin	Des-gamma-carboxy prothrombin
DIWV	Dipeptide instability weight value	Giá trị khối lượng không ổn định của dipeptide
DHFR	Dihydrofolate reductase	Dihydrofolate reductase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Môi trường nuôi cấy DMEM
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
EASL	European Association for the Study of the Liver	Hiệp hội Gan mật Châu Âu
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay	Phản ứng miễn dịch liên kết enzym
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh bào thai bò
FCA	Freund's Complete Adjuvant	Tá chất Freund hoàn chỉnh

FDA	Food and Drug Administration	Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ
FIA	Freund's Incomplete Adjuvant	Tá chất Freund không hoàn chỉnh
Gd-EOB-DTPA	Gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid	Tác nhân tương phản MRI Gadolinium-EOB-DTPA
GRAVY	Grand Average of Hydropathy	Giá trị kỵ nước trung bình
GST	Glutathione S-Transferase	Glutathione S-Transferase
HAMA	Human anti-mouse antibody	Kháng thể kháng chuột ở người
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine	Hỗn hợp chọn lọc HAT
HBV	Hepatitis B virus	Virus viêm gan B
HBx	Hepatitis B protein X	Protein X của virus viêm gan B
HCC	Hepatocellular carcinoma	Ung thư biểu mô tế bào gan
HCV	Hepatitis C virus	Virus viêm gan C
HGPRT	Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase	Enzym HGPRT
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 α	Yếu tố gây thiếu oxy-1 α
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HRP	Horseradish peroxidase	Enzym peroxidase cải ngựa
HT	Hypoxanthine, Thymidine	Hỗn hợp chọn lọc HT không chứa Aminopterin
IEDB	Immune Epitope Database and Analysis Resource	Cơ sở dữ liệu và phân tích epitope miễn dịch
mAb	Monoclonal antibody	Kháng thể đơn dòng
MHC	Major Histocompatibility Complex	Phức hợp Kháng nguyên hòa hợp mô chính
MRI	Magnetic Resonance Imaging	Chụp cộng hưởng từ
mRNA	Messenger RNA	RNA thông tin

mTORC1	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1	Phức hợp đích rapamycin 1 của động vật có vú
NAFLD/ NASH	Non-alcoholic fatty liver disease/ Non-alcoholic SteatoHepatitis	Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia
NGS	Next-generation sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
NK	Natural Killer cell	Tế bào diệt tự nhiên
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NPV	Negative predictive values	Giá trị tiên lượng âm tính
PCR	Polymerase-Chain-Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PDB	Protein Data Bank	Ngân hàng dữ liệu protein
PIVKA-II	Protein Induced by Vitamin K Absence/Antagonist-II	Protein do thiếu vitamin K/chất đối kháng-II
PEG	Polyethylene glycol	Polyetylen glycol
PET	Positron Emission Tomography	Chụp cắt lớp phát xạ positron
PPV	Positive predictive values	Giá trị tiên lượng dương tính
PVDF	Polyvinylidene difluoride	Polyvinylidene difluoride
RMSD	Root Mean Square Deviation	Độ lệch bình phương trung bình
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic (RNA)
ROS	Reactive Oxygen Species	Các tác nhân oxy hóa
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results	Chương trình Giám sát, Dịch tễ học và Kết quả cuối cùng
TACE	Transarterial Chemoembolization	Nút hóa chất động mạch
TERT	Telomerase reverse transcriptase	Phiên mã ngược của telomerase
TNM	Tumor (T), Nodes (N), Metastasis (M)	Khối u – Hạch – Di căn
TXN	Thioredoxin	Thioredoxin
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor receptor	Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu A
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số chỉ thị sinh học chẩn đoán HCC đã và đang được nghiên cứu	13
Bảng 2.1. Thành phần hỗn hợp phản ứng cắt enzym.....	38
Bảng 2.2. Thành phần hỗn hợp phản ứng gắn gen mục tiêu vào vector biểu hiện pET22b+.....	39
Bảng 2.3. Trình tự môi và chu trình chạy PCR.....	40
Bảng 2.4. Thành phần của gel polyacrylamide.....	41
Bảng 2.5. Xây dựng đường chuẩn phát hiện màu Bradford.....	44
Bảng 3.1. Các đoạn epitope tiềm năng của AFP.....	56
Bảng 3.2. Các đoạn epitope tiềm năng của DCP.....	57
Bảng 3.3. Các đoạn epitope tiềm năng của TXN.....	58
Bảng 3.4. Epitope không liên tục của protein AFP dự đoán bởi Discotope 2.0...	59
Bảng 3.5. Epitope không liên tục của protein DCP dự đoán bởi Discotope 2.0..	60
Bảng 3.6. Epitope không liên tục của protein TXN dự đoán bởi Discotope 2.0..	61
Bảng 3.7. Trình tự protein được chọn của AFP, DCP, TXN.....	62
Bảng 3.8. Đánh giá các tính chất vật lý của 3 đoạn protein P-AFP, P-DCP, P-TXN bằng ExPASy.....	63-64
Bảng 3.9. Trình tự nucleotide của các đoạn peptide P-AFP, P-DCP và P-TXN.....	66
Bảng 3.10. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra tính đặc hiệu của các dòng tế bào lai sử dụng kháng nguyên gắn bản tương ứng và kháng nguyên <i>E. coli</i> BL21 trước khi tiêm chuột tạo báng.....	84
Bảng 3.11. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra hiệu giá kháng thể trong dịch báng chuột từ dòng tế bào AFP1 và AFP2 tại các tỷ lệ pha loãng khác nhau.....	87
Bảng 3.12. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra hiệu giá kháng thể trong dịch báng chuột từ dòng tế bào DCP1 và DCP2 tại các tỷ lệ pha loãng khác nhau.....	88
Bảng 3.13. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra hiệu giá kháng thể trong dịch báng chuột từ dòng tế bào TXN1 và TXN2 tại các tỷ lệ pha loãng khác nhau.....	89
Bảng 3.14. Phân bố tuổi của nhóm bệnh nhân HCC.....	91
Bảng 3.15. Phân bố giới tính của nhóm bệnh nhân HCC.....	92
Bảng 3.16. Thống kê các yếu tố nguyên nhân trên nhóm bệnh nhân HCC.....	92

Bảng 3.17. Thống kê các giai đoạn HCC của nhóm bệnh nhân nghiên cứu.....	93
Bảng 3.18. Thống kê đặc điểm nhóm có bệnh lý tại gan.....	94
Bảng 3.19. Các chỉ số sinh hóa đánh giá chức năng gan.....	94
Bảng 3.20. Ma trận chuẩn độ kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng AFP.....	95-96
Bảng 3.21. Ma trận chuẩn độ kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng DCP.....	96
Bảng 3.22. Ma trận chuẩn độ kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng TXN.....	97
Bảng 3.23. Kết quả so sánh độ nhạy độ đặc hiệu của phương pháp ELISA gián tiếp với chẩn đoán xác định theo hồ sơ bệnh án.....	104-105
Bảng 3.24. So sánh tương quan phần trăm tương đồng của kháng thể đơn dòng với các kháng thể thương mại.....	107-108

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Phân vùng dịch tễ ung thư gan trên toàn cầu (2020). Tỷ lệ ước tính trên 100000 dân.....	5
Hình 1.2. Số ca mắc mới Ung thư gan so với một số loại ung thư thường gặp tại Việt Nam theo thống kê của GLOBOCAN 2022.....	6
Hình 1.3. Tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan theo khu vực địa lý và nguyên nhân năm 2020.....	10
Hình 1.4. Cơ chế sự tăng biểu hiện của AFP trên bệnh nhân mắc HCC	15
Hình 1.5. Độ nhạy và độ đặc hiệu theo giá trị ngưỡng AFP trong giai đoạn sớm ung thư biểu mô tế bào gan.....	17
Hình 1.6. Sự hình thành và giải phóng PIVKA-II (DCP) vào máu.....	19
Hình 1.7. Thioredoxin tạo điều kiện cho ung thư biểu mô tế bào gan phát triển và di căn bằng cách tăng độ ổn định BACH1.....	23
Hình 1.8. Kháng thể đơn dòng “khóa” tế bào ung thư.....	27
Hình 1.9. Phương pháp tạo tế bào lai hybridoma.....	30
Hình 2.1. Gây miễn dịch cho chuột nghiên cứu.....	44
Hình 2.2. Tách tế bào lympho B từ lách và hạch bẹn chuột.....	45
Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid chứa gen <i>AFP</i> , <i>DCP</i> và <i>TXN</i> ra khỏi vector pJET1.2 bằng hai loại enzym cắt giới hạn là <i>NdeI</i> và <i>XhoI</i>	67
Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm cắt gen sau tinh sạch	67
Hình 3.3. Sơ đồ vector biểu hiện pET22b+ với hai enzym <i>NdeI</i> và <i>XhoI</i>	68
Hình 3.4. Điện di đồ sản phẩm DNA plasmid tái tổ hợp từ các khuẩn lạc mọc trên đĩa LB-agar chứa kháng sinh.....	69
Hình 3.5. Điện di đồ kiểm tra gen mục tiêu từ các khuẩn lạc chọn lọc	69
Hình 3.6. Kết quả giải trình tự với môi trường mại T7 promoter.....	70
Hình 3.7. Điện di đồ sản phẩm protein tổng số của các khuẩn lạc sau khi đã được nuôi biểu hiện với chất cảm ứng IPTG.	71
Hình 3.8. Kết quả tối ưu điều kiện biểu hiện của protein AFP.....	72
Hình 3.9. Kết quả tối ưu điều kiện biểu hiện của protein DCP.....	73
Hình 3.10. Kết quả tối ưu điều kiện biểu hiện của protein TXN.....	73
Hình 3.11. Sản phẩm protein tái tổ hợp AFP tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA	75
Hình 3.12. Sản phẩm protein tái tổ hợp DCP tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA.....	76

Hình 3.13. Sản phẩm protein tái tổ hợp TXN tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA	76
Hình 3.14. Kết quả kiểm tra Western blot cho các protein (kháng nguyên) tái tổ hợp	77
Hình 3.15. Đo nồng độ protein tái tổ hợp tinh sạch bằng phương trình đường chuẩn Bradford.....	78
Hình 3.16. Quan sát nuôi cấy phục hồi tế bào myeloma (400x).....	80
Hình 3.17. Quan sát tế bào myeloma dưới kính hiển vi (400x).	81
Hình 3.18. Quan sát quá trình nuôi cấy tăng lượng tế bào myeloma (400x).....	82
Hình 3.19. Cụm tế bào lai được quan sát trên kính hiển vi quang học (400x)....	83
Hình 3.20. Kết quả tinh sạch kháng thể đơn dòng bằng cột sắc ký ái lực qua cột protein G.....	90
Hình 3.21. Tối ưu nồng độ pha loãng huyết thanh của phản ứng ELISA gián tiếp.....	98
Hình 3.22. Tối ưu nồng độ BSA trong blocking của phản ứng ELISA gián tiếp..	98
Hình 3.23. Tối ưu nồng độ kháng thể thứ cấp HRP cộng hợp enzym của phản ứng ELISA gián tiếp.....	99
Hình 3.24. Các đường cong chuẩn theo phương trình 4L của AFP.....	100
Hình 3.25. Các đường cong chuẩn theo phương trình 4L của DCP.....	100
Hình 3.26. Các đường cong chuẩn theo phương trình 4L của TXN.....	101
Hình 3.27. Phân bố giá trị OD _{450nm} của các mẫu huyết thanh trong xét nghiệm ELISA của AFP với giá trị ngưỡng cut-off = 0.191.....	102
Hình 3.28. Phân bố giá trị OD _{450nm} của các mẫu huyết thanh trong xét nghiệm ELISA của DCP với giá trị ngưỡng cut-off = 0.165.....	103
Hình 3.29. Phân bố giá trị OD _{450nm} của các mẫu huyết thanh trong xét nghiệm ELISA của TXN với giá trị ngưỡng cut-off = 0.21.....	103
Hình 3.30. Đường cong ROC đánh giá độ tin cậy của xét nghiệm miễn dịch ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng phát hiện kháng nguyên AFP, DCP, TXN có trong huyết thanh bệnh nhân mắc HCC.....	110

MỞ ĐẦU

Ung thư gan hiện nay được xem là một trong những thách thức y tế nghiêm trọng mang tính toàn cầu, với tỷ lệ mắc mới và tử vong không ngừng gia tăng trong những năm gần đây. Theo số liệu thống kê năm 2023, ung thư gan gây ra gần một triệu ca tử vong mỗi năm và nằm trong nhóm những nguyên nhân tử vong hàng đầu do ung thư trên thế giới. Dự báo từ năm 2025 trở đi, số ca mắc mới ung thư gan có thể vượt quá 1 triệu trường hợp mỗi năm [1], cho thấy gánh nặng bệnh tật ngày càng lớn đối với sức khỏe cộng đồng và hệ thống y tế, đặc biệt tại các quốc gia đang phát triển. Thực trạng này đặt ra yêu cầu cấp thiết trong việc tăng cường các chương trình sàng lọc, chẩn đoán sớm và nghiên cứu phát triển các công cụ phát hiện hiệu quả hơn.

Ung thư gan bao gồm ung thư gan thứ phát và ung thư gan nguyên phát, trong đó ung thư gan nguyên phát là dạng bệnh lý ác tính khởi phát trực tiếp từ tế bào gan. Trong các thể mô bệnh học của ung thư gan nguyên phát, ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular Carcinoma – HCC) là dạng phổ biến nhất, chiếm khoảng 90% tổng số trường hợp [2, 3]. HCC thường phát triển trên nền các bệnh gan mạn tính như nhiễm virus viêm gan B, virus viêm gan C, xơ gan do rượu hoặc phơi nhiễm các chất độc như aflatoxin B1. Các yếu tố nguy cơ này tác động thông qua nhiều cơ chế khác nhau nhưng đều dẫn đến biến đổi di truyền, rối loạn chức năng tế bào gan và hình thành tế bào ác tính.

Hiện nay, chẩn đoán HCC được thực hiện dựa trên nhiều phương pháp như xét nghiệm mô bệnh học, tế bào học và các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh (CT, MRI, PET, siêu âm). Tuy nhiên, các phương pháp này còn gặp nhiều hạn chế trong thực hành lâm sàng, đặc biệt trong phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm. Trên thực tế, phần lớn bệnh nhân chỉ được chẩn đoán khi bệnh đã tiến triển, làm giảm đáng kể hiệu quả điều trị triệt để và tiên lượng sống. Do đó, việc phát triển các công cụ sàng lọc có khả năng phát hiện sớm, chính xác và có thể ứng dụng rộng rãi trong cộng đồng có ý nghĩa đặc biệt quan trọng nhằm nâng cao tỷ lệ sống và cải thiện chất lượng điều trị cho bệnh nhân HCC.

Trong những năm gần đây, các chỉ thị sinh học đã trở thành hướng tiếp cận tiềm năng trong chẩn đoán sớm HCC. Các dấu ấn như AFP, DCP, AFP-L3, GPC3 cùng với những chỉ thị mới như TXN, GP73, OPN, miRNA, cfDNA... đã được chứng minh có giá trị nhất định trong phát hiện và tiên lượng bệnh. Trong đó, AFP là chỉ thị truyền thống nhưng còn hạn chế về độ nhạy; DCP giúp cải thiện độ đặc hiệu và hỗ trợ phát hiện các trường hợp AFP âm tính; trong khi TXN là một dấu ấn mới liên quan đến quá trình tiến triển, apoptosis và khả năng xâm lấn của khối u. Vì vậy, việc

kết hợp bộ ba dấu ấn AFP–DCP–TXN được kỳ vọng sẽ nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu trong chẩn đoán, đồng thời tạo cơ sở khoa học cho các xét nghiệm đa dấu ấn phục vụ sàng lọc HCC.

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn đó, việc nghiên cứu tạo ra các kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN có ý nghĩa quan trọng. Kháng thể đơn dòng không chỉ là công cụ then chốt trong các kỹ thuật miễn dịch hiện đại, mà còn là nền tảng để phát triển các bộ kit xét nghiệm có khả năng ứng dụng rộng rãi trong phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan. Do đó, đề tài “**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**” được thực hiện với những mục tiêu như sau:

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.

Cấu trúc Luận án gồm 3 chương:

Chương 1. Tổng quan nghiên cứu: Trình bày tổng quan về dịch tễ học ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) trên thế giới và tại Việt Nam; các phương pháp chẩn đoán hiện nay; vai trò, tiềm năng của các chỉ thị sinh học AFP, DCP, TXN; và cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho HCC.

Chương 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Mô tả chi tiết đối tượng, hóa chất, trang thiết bị sử dụng; quy trình nghiên cứu từ giai đoạn phân tích *in silico* dự đoán epitope, tạo kháng nguyên tái tổ hợp, gây miễn dịch, dung hợp tế bào, sàng lọc, tinh sạch kháng thể đơn dòng; và phương pháp ứng dụng kháng thể đơn dòng trong xét nghiệm ELISA đánh giá hiệu quả phát hiện HCC.

Chương 3. Kết quả và bàn luận: Trình bày kết quả chi tiết quá trình tạo kháng nguyên tái tổ hợp, kháng thể đơn dòng AFP, DCP, TXN; kết quả ứng dụng kháng thể đơn dòng trong phản ứng ELISA trên mẫu huyết thanh bệnh nhân; và phân tích, thảo luận kết quả so sánh với các nghiên cứu trước, nêu bật ý nghĩa khoa học và thực tiễn của Luận án.

Đóng góp mới của Luận án:

- 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 của Luận án:

- **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 NGHIÊN CỨU

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

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

1.1.1.1. Tình hình dịch tễ của bệnh ung thư biểu mô tế bào gan trên thế giới

Theo Tổ chức Y tế Thế giới, ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular carcinoma – HCC) là dạng ung thư gan nguyên phát phổ biến nhất, chiếm khoảng 80 – 90% tổng số ca ung thư gan được chẩn đoán [5]. Trên toàn cầu, HCC hiện xếp thứ 6 về tỷ lệ mắc mới với khoảng 866000 ca mỗi năm, và đứng thứ 4 về số ca tử vong do ung thư, với khoảng 759000 trường hợp tử vong hàng năm [6]. Tỷ lệ mắc chuẩn hóa theo tuổi (Age Standardized Rate – ASR) trung bình toàn cầu của HCC vào khoảng 8.6/100000, trong khi tỷ lệ tử vong ASR là 7.4/100000 [6]. Tỷ lệ tử vong cao gần bằng tỷ lệ mắc đã phản ánh tiên lượng rất kém của bệnh, khiến HCC trở thành một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư, chỉ sau ung thư phổi, ung thư vú và ung thư đại trực tràng [6].

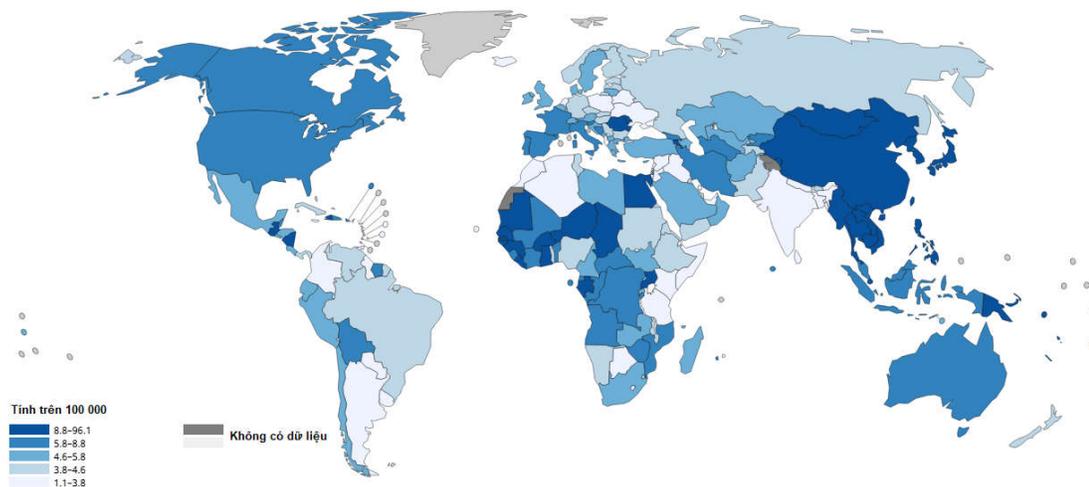
Phân bố dịch tễ của HCC có sự khác biệt rõ rệt giữa các khu vực địa lý. Khoảng 80% số ca HCC toàn cầu tập trung tại Đông Á và Châu Phi hạ Sahara, là những vùng có tỷ lệ nhiễm virus viêm gan B mạn tính rất cao [5]. Riêng châu Á chiếm tới khoảng 70% tổng số ca mắc và tử vong do HCC trên toàn thế giới. Các quốc gia được xếp vào nhóm nguy cơ cao bao gồm Trung Quốc, Mông Cổ, Hàn Quốc, Việt Nam, Thái Lan, Campuchia và nhiều nước thuộc Trung Phi – nơi tỷ lệ mắc HCC có thể vượt quá 20/100000 dân [5]. Đặc biệt, Mông Cổ hiện là quốc gia có tỷ lệ mắc và tử vong do HCC cao nhất thế giới, vượt ngưỡng 80/100000 dân, phần lớn do tỷ lệ nhiễm HBV và mức tiêu thụ rượu rất cao [5]. Ngược lại, các khu vực có nguy cơ thấp như Bắc Mỹ và châu Âu thường ghi nhận tỷ lệ mắc HCC dưới 5/100000, nhờ tỷ lệ nhiễm viêm gan virus thấp hơn và hệ thống y tế phát triển hơn [6].

Trong vài thập kỷ qua, gánh nặng HCC toàn cầu đã gia tăng đáng kể về số lượng tuyệt đối, chủ yếu do bùng nổ và già hóa dân số. Ước tính, số ca mới HCC trên toàn thế giới năm 2019 đạt khoảng 747000 ca – tăng 70% so với năm 1990. Tuy nhiên, khi chuẩn hóa theo tuổi, tỷ lệ mắc HCC trên toàn cầu có xu hướng giảm nhẹ kể từ cuối những năm 1990 đến nay [5]. Sự suy giảm này chủ yếu nhờ vào hiệu quả của các chương trình tiêm chủng viêm gan B đại trà và việc triển khai rộng rãi điều trị viêm gan C bằng thuốc kháng virus. Tại Nhật Bản, tỷ lệ HCC đã giảm mạnh nhờ thành công trong kiểm soát viêm gan C. Hàn Quốc cũng chứng kiến sự sụt giảm từ 28.9/100000 năm 1999 xuống còn 16.1/100000 năm 2019, phần lớn nhờ triển khai tiêm chủng HBV và điều trị virus hiệu quả. Trung Quốc, quốc gia chiếm tỷ trọng ca

mắc HCC lớn nhất thế giới, cũng đang ghi nhận xu hướng giảm tỷ lệ mắc nhờ chương trình tiêm vắc xin viêm gan B diện rộng [5].

Tuy nhiên, trái ngược với xu hướng này, một số quốc gia trước đây có tỷ lệ HCC thấp lại đang ghi nhận sự gia tăng nhanh chóng. Tại Hoa Kỳ, tỷ lệ mắc HCC đã tăng gấp 2 – 3 lần trong ba thập kỷ qua, chủ yếu do dân số nhiễm viêm gan C mạn tính đang già hóa, cùng với sự gia tăng nhanh chóng của bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD). GLOBOCAN 2022 (Hình 1.1) cũng cho thấy một số nước thuộc Trung Đông và Trung Á như Iran, Iraq, Nepal... đang chứng kiến mức gia tăng đáng kể về tỷ lệ mắc HCC trong thời gian gần đây.

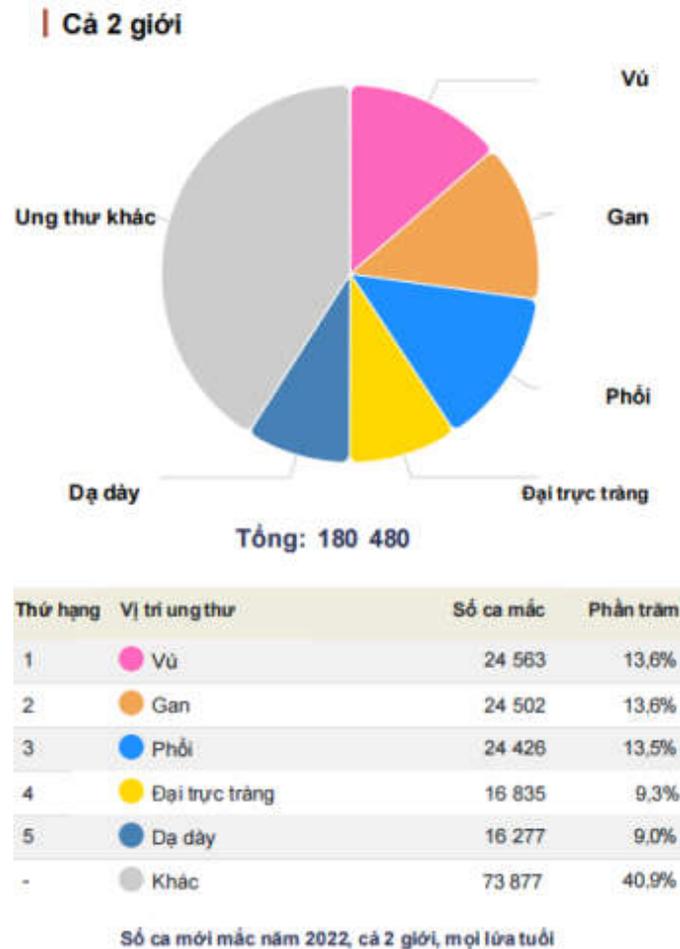
Nhìn chung, nếu không có các biện pháp can thiệp toàn diện và hiệu quả, số ca HCC mới trên toàn cầu được dự báo sẽ còn tăng mạnh trong thời gian tới. Theo dự báo của WHO, đến năm 2040, số ca mắc mới HCC có thể tăng thêm 55%, đạt mức khoảng 1.4 triệu ca mỗi năm; đồng thời, số ca tử vong do HCC cũng có thể lên tới 1.3 triệu trường hợp mỗi năm [7, 8].



Hình 1.1. Phân vùng dịch tễ ung thư gan trên toàn cầu (2022)
Tỷ lệ ước tính trên 100000 dân [6]

1.1.1.2. Tình hình dịch tễ của bệnh ung thư biểu mô tế bào gan tại Việt Nam

Việt Nam nằm trong vùng dịch tễ có nguy cơ HCC rất cao. Theo ước tính GLOBOCAN 2022, ung thư gan là một trong những loại ung thư phổ biến nhất tại Việt Nam (Hình 1.2). Trong năm 2020, tỷ suất mắc mới chuẩn hóa theo tuổi của HCC tại Việt Nam vào khoảng 22 - 24/100000, thuộc nhóm cao nhất thế giới (gấp gần 3 lần mức trung bình toàn cầu) [5]. Số liệu năm 2022 cho thấy, Việt Nam có khoảng hơn 24000 ca HCC mới, chiếm 13.6% tổng ca ung thư mới (xếp thứ 2 sau ung thư vú) [9]. HCC đặc biệt thường gặp ở nam giới (gấp 3 - 4 lần nữ giới), và là nguyên nhân hàng đầu gây ung thư ở nam giới Việt Nam [9].



Hình 1.2. Số ca mắc mới Ung thư gan so với một số loại ung thư thường gặp tại Việt Nam theo thống kê của GLOBOCAN 2022 [9]

Ung thư gan, chủ yếu là ung thư biểu mô tế bào gan, đang là nguyên nhân tử vong do ung thư hàng đầu ở cả nam và nữ tại Việt Nam. Theo thống kê gần đây, mỗi năm có hơn 25000 người tử vong vì HCC, chiếm khoảng 19 – 20% tổng số tử vong do ung thư trong cả nước [9]. Điều đáng lo ngại là tỷ lệ tử vong trên số ca mắc gần như tương đương, phản ánh thực trạng chẩn đoán muộn và tiên lượng xấu ở đa số bệnh nhân. Báo cáo của Bộ Y tế cũng cho thấy, HCC liên tục giữ vị trí số một trong các loại ung thư có số ca mắc và tử vong cao nhất tại Việt Nam trong nhiều năm trở lại đây [10].

Mặc dù đã có một số cải thiện ở cấp độ địa phương, như tại TP. Hồ Chí Minh ghi nhận xu hướng giảm nhẹ tỷ lệ mắc trong vòng 2 thập kỷ qua, có thể liên quan đến việc mở rộng tiêm chủng viêm gan B và quản lý tốt hơn các yếu tố nguy cơ, nhưng tổng thể trên toàn quốc, gánh nặng HCC vẫn ở mức đáng báo động. Dân số ngày càng tăng và già hóa tiếp tục đẩy số ca mắc mới tăng cao: 24502 ca năm 2022, theo dữ liệu

GLOBOCAN [9]. Đáng chú ý, Việt Nam hiện được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) xếp vào nhóm các quốc gia có gánh nặng viêm gan virus và HCC cao nhất trong khu vực Tây Thái Bình Dương. Vì vậy, mục tiêu loại trừ viêm gan virus vào năm 2030 đã được Chính phủ Việt Nam xác định là ưu tiên y tế quốc gia [10].

So với mức trung bình toàn cầu, tỷ lệ mắc HCC tại Việt Nam cao hơn rất nhiều. Với ASR khoảng 23/100000, Việt Nam có mức độ gấp 2 – 3 lần so với ASR trung bình của thế giới (8.6/100000) [5, 6]. Quốc gia ta thường nằm trong nhóm 5 nước có số ca HCC cao nhất toàn cầu, bên cạnh Trung Quốc, Ấn Độ và một số quốc gia đông dân khác. Trong khu vực, tỷ lệ mắc HCC của Việt Nam tương đương với các nước Đông Nam Á như Thái Lan và Campuchia (khoảng 20 – 25/100000), và thấp hơn so với Mông Cổ – nơi tỷ lệ này vượt ngưỡng 80/100000 [5].

Trong khi nhiều quốc gia Đông Á như Hàn Quốc, Nhật Bản đã bước đầu kiểm soát được HCC nhờ chiến lược phòng chống viêm gan hiệu quả, Việt Nam vẫn đang đối mặt với tỷ lệ mắc và tử vong duy trì ở mức cao và ổn định. Một yếu tố góp phần duy trì mức độ dịch tễ này là cơ cấu nguyên nhân gây bệnh khác biệt so với các quốc gia phương Tây. Tại Mỹ và châu Âu, HCC có xu hướng tăng chủ yếu do viêm gan C và bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), trong khi tại Việt Nam và các nước châu Á, nguyên nhân chính vẫn là viêm gan B mạn tính [5, 10].

Mặc dù chương trình tiêm phòng viêm gan B toàn dân đã được triển khai hơn 20 năm qua và được kỳ vọng sẽ giúp làm giảm dần tỷ lệ mắc HCC trong tương lai, nhưng hiện tại hiệu quả rõ rệt vẫn chưa thể ghi nhận do nhóm người trưởng thành và người cao tuổi, nhiễm virus trước khi có chương trình tiêm chủng, hiện đang ở độ tuổi nguy cơ cao mắc HCC. Do đó, gánh nặng HCC tại Việt Nam được dự báo sẽ còn duy trì ở mức cao trong nhiều năm tới nếu không có những chiến lược kiểm soát mạnh mẽ và đồng bộ hơn.

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

Ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular carcinoma – HCC) là hậu quả của một quá trình phức tạp, diễn ra kéo dài trên nền tổn thương gan mạn tính. Về mặt bệnh học, HCC thường phát sinh thông qua chuỗi tiến triển từ viêm gan mạn → xơ hóa → xơ gan → loạn sản nốt tái tạo → ung thư hóa. Quá trình này đi kèm với sự tích lũy dần các biến đổi di truyền và biểu sinh trong tế bào gan, kết hợp với các tác động môi trường và rối loạn chuyển hóa, dẫn đến mất kiểm soát tăng sinh và hình thành khối u ác tính. Ngoài ra, HCC thường đi kèm với tăng sinh mạch máu bất thường, hoại tử trong khối u và sự xâm lấn vi mạch, phản ánh tính chất tiến triển và khả năng di căn của bệnh. Những đặc điểm bệnh học này có liên quan chặt chẽ đến

sự rối loạn các con đường tín hiệu phân tử và biểu hiện các dấu ấn sinh học như AFP, DCP và TXN là các chỉ dấu quan trọng được nghiên cứu trong luận án.

1.1.2.1. Yếu tố di truyền

Yếu tố di truyền đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh và tiến triển của ung thư biểu mô tế bào gan. Nhiều đột biến gen mắc phải (somatic mutations) đã được xác định có liên quan đến HCC, trong đó nổi bật là đột biến vùng promoter thuộc phiên mã ngược của telomerase (TERT), chiếm đến 44 – 60% trường hợp và thường là đột biến sớm nhất trong quá trình sinh ung thư [3]. Đột biến TP53, một gen ức chế khối u quan trọng, xuất hiện trong khoảng 30 – 50% ca HCC, đặc biệt liên quan đến bệnh nhân nhiễm HBV và tiếp xúc aflatoxin B1. Trong khi đó, CTNNB1 (mã hóa β -catenin), một gen chủ chốt của con đường Wnt/ β -catenin, thường đột biến ở 20 – 40% HCC, đặc biệt ở bệnh nhân không do virus [3].

Ngoài ra, các đột biến khác như AXIN1, ARID1A, ARID2, KEAP1/NFE2L2, tham gia vào điều hòa tín hiệu Wnt, sửa chữa nhiễm sắc thể và kiểm soát stress oxy hóa, cũng được ghi nhận trong tỷ lệ nhỏ hơn nhưng có ý nghĩa sinh học cao [3].

Bên cạnh các đột biến somatic, các biến thể di truyền dòng mầm (germline polymorphisms) như PNPLA3 (rs738409 C>G), TM6SF2, MBOAT7 cũng được chứng minh làm tăng nguy cơ HCC thông qua cơ chế tích tụ mỡ trong gan, viêm gan không do rượu (NAFLD/NASH) và xơ gan [3].

Việc xác định các đột biến này không chỉ giúp hiểu rõ hơn về sinh bệnh học của HCC mà còn là cơ sở cho các ứng dụng lâm sàng như chẩn đoán sớm, phân tầng nguy cơ, tiên lượng bệnh và cá thể hóa điều trị. Ví dụ, các đột biến CTNNB1 có thể liên quan đến kháng liệu pháp miễn dịch, trong khi các liệu pháp đích vào TERT, Wnt/ β -catenin hoặc TP53 đang được nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng [11].

1.1.2.2. Yếu tố môi trường

a) Virus viêm gan B (Hepatitis B Virus - HBV)

HBV là một loại DNA virus có thể tích hợp vào bộ gen của vật chủ gây đột biến xen kẽ, dẫn đến kích hoạt gen gây ung thư. Mặc dù hầu hết bệnh nhân mắc HCC do HBV đều có biểu hiện xơ gan, tuy nhiên các nghiên cứu thống kê cho thấy HBV làm tăng nguy cơ mắc HCC ngay cả khi không có xơ gan. Nguyên nhân là do HCC có thể xảy ra trực tiếp mà không cần trải qua giai đoạn xơ gan [12, 13].

Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới, có khoảng 360 triệu người bị nhiễm HBV và nguy cơ tiến triển thành HCC chiếm đến 25% các trường hợp. Tỷ lệ nhiễm HBV chiếm khoảng 70 - 80% các trường hợp HCC ở Châu Á và Châu Phi (Hình 1.3), thông qua rất nhiều con đường như: truyền máu, quan hệ tình dục không an toàn, từ

mẹ sang con; và 20 - 30% các trường hợp ở phương Tây, chủ yếu lây truyền do: các thủ thuật y học can thiệp và quan hệ tình dục không an toàn [14].

Tỷ lệ nhiễm HBV cao ở Châu Á đã dẫn đến nguy cơ mắc HCC vượt trội ở nam giới (40 tuổi) và ở nữ giới (50 tuổi). Một nghiên cứu cũng cho thấy ở Châu Phi, bệnh nhân ở độ tuổi 30 hoặc 40 bị HCC có thể là do tiếp xúc với aflatoxin B1, tuy nhiên khi có yếu tố đồng nguy cơ là HBV sẽ làm tăng khả năng mắc HCC [15].

Việt Nam nằm trong vùng lưu hành HBV cao với khoảng 6.6 triệu người nhiễm HBV mạn (tương đương 8% dân số). Thống kê tại Bệnh viện Chợ Rẫy cho thấy 66% bệnh nhân mắc HCC có tiền sử viêm gan B [10].

b) Virus viêm gan C (Hepatitis C Virus - HCV)

Nhiễm HCV cũng là nguyên nhân lớn gây HCC, đặc biệt ở các nước phát triển. Không giống như HBV, HCV là một loại RNA virus không tích hợp vào bộ gen của vật chủ và do đó, nguy cơ tiến triển thành HCC chủ yếu do sự xơ hóa gan sau quá trình gây tổn thương mạn tính của HCV. Thời kỳ bệnh toàn phát của người nhiễm HCV, các triệu chứng có thể kéo dài khá lâu (khoảng 6 - 8 tuần) rồi bệnh tự khỏi không cần điều trị bất kỳ một loại thuốc gì. Tuy vậy, số người bệnh tự khỏi này chỉ chiếm khoảng 15 - 30% các trường hợp (khác với viêm gan B là 90%). Số còn lại hoặc sẽ trở thành viêm gan C mạn tính hoặc trở thành người lành mang virus viêm gan C (nghĩa là sau khoảng 6 tháng cơ thể không đào thải HCV ra khỏi cơ thể). Điều đáng lo ngại nhất là khi bị viêm gan C mạn tính là có thể bị biến chứng xơ gan (khoảng 10 - 20%) và dẫn đến HCC (khoảng 5%). Tỷ lệ biến chứng thành HCC so với viêm gan B cũng cao hơn nhiều [16].

Trên thế giới, khoảng 20% ca HCC quy cho HCV (tổng cộng viêm gan B và C chiếm 62% ca HCC) [17]. Nhiễm HCV là bệnh gan mạn tính phổ biến nhất ở những bệnh nhân bị HCC ở Bắc Mỹ, Châu Âu và Nhật Bản (Hình 1.3). Theo thống kê của WHO, trên thế giới có khoảng 170 triệu người nhiễm HCV (chiếm khoảng 3% dân số thế giới). Tập trung chủ yếu ở các khu vực: Nam Mỹ, Châu Âu, Châu Á; thông qua hình thức lây truyền chủ yếu là dùng chung bơm kim tiêm và tình dục không an toàn. Mỗi năm có khoảng 3 - 4 triệu người mắc mới tại những điểm nóng này [12].

Ở Việt Nam, tỷ lệ nhiễm HCV (khoảng 1% dân số) thấp hơn HBV. Hiện theo ước tính khoảng 21% bệnh nhân mắc HCC tại Việt Nam nhiễm HCV và nguy cơ HCC ở người xơ gan do HCV chiếm khoảng 1-5% mỗi năm [10].

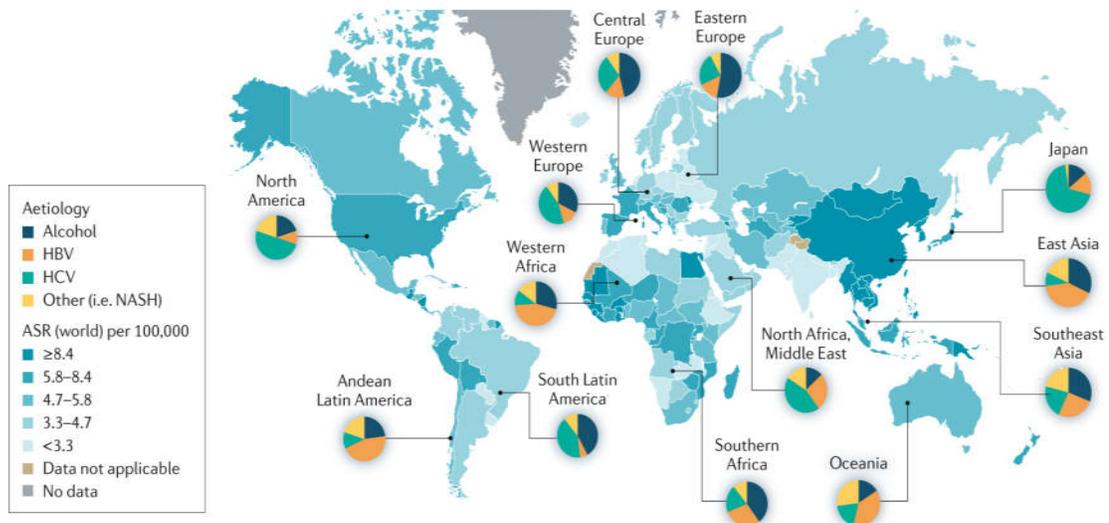
c) Tiền sử sử dụng đồ uống có cồn

Hiện nay, ngày càng có nhiều người bị xơ gan do tiền sử sử dụng đồ uống có cồn. Xơ gan liên quan đến rượu, bia có tỷ lệ mắc hàng năm trên thế giới từ 1% đến 3% và chiếm khoảng 18 - 30% các trường hợp HCC [5]. Uống rượu trường diễn

cũng là yếu tố đồng nguy cơ gây ra HCC cùng các căn nguyên khác; ví dụ, một số nghiên cứu cho thấy nguy cơ mắc HCC tăng lên ở những người mang HBV uống rượu so với những người không uống rượu [18].

Theo những nghiên cứu cộng đồng, những người có tiền sử sử dụng đồ uống có cồn với lượng lớn 50g (rượu tiêu chuẩn)/ngày có nguy cơ mắc HCC cao gấp 2 lần những người không uống rượu; với những trường hợp uống > 80g (rượu tiêu chuẩn)/ngày, trên 10 năm thì nguy cơ tăng gấp 5 - 7 lần [19].

Tại Việt Nam, tiêu thụ rượu bia ở mức cao là vấn đề đáng lo ngại: một khảo sát cho thấy có đến 77% nam giới Việt Nam uống rượu, trong đó 31% thuộc nhóm uống “nguy cơ cao”. Điều này giải thích vì sao nam giới Việt Nam mắc HCC nhiều gấp nhiều lần nữ [20].



Hình 1.3. Tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan theo khu vực địa lý và nguyên nhân năm 2020 [3]

1.1.2.3. Yếu tố chuyển hóa

Gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), đặc biệt ở dạng nặng là viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), đang là yếu tố nguy cơ quan trọng của ung thư biểu mô tế bào gan. NAFLD có tỉ lệ mắc toàn cầu khoảng 20 – 25% và gia tăng song song với sự gia tăng của béo phì, đái tháo đường typ 2 và hội chứng chuyển hóa [21]. Tích tụ triglyceride trong tế bào gan (steatosis) ở NAFLD thường kèm theo các rối loạn chuyển hóa như béo phì, tăng huyết áp, rối loạn lipid máu và đái tháo đường [22]. Ở giai đoạn tiến triển NASH, tổn thương tế bào gan kết hợp viêm mạn và xơ hóa nhiều hơn, qua đó làm tăng nguy cơ phát triển xơ gan và HCC [22]. Trên thực tế, dịch tễ học cho thấy NASH đang trở thành nguyên nhân gia tăng nhanh nhất của HCC

[22]. Nhiều nghiên cứu lớn ghi nhận NAFLD/NASH là yếu tố nguy cơ hàng đầu (chiếm 59% các trường hợp HCC ở Mỹ), trong khi đái tháo đường typ 2 cũng góp mặt ở nhiều bệnh nhân mắc HCC (chiếm 36% theo một nghiên cứu) [22]. Béo phì, đề kháng insulin và đái tháo đường typ 2 là trung tâm của hội chứng chuyển hóa và cũng thúc đẩy sinh ung ở gan. Béo phì gây đề kháng insulin dẫn đến tăng insulin huyết và kích hoạt mạnh trục tín hiệu insulin/IGF-1, giúp tế bào gan tăng sinh quá mức và giảm chết theo chương trình. Đồng thời, mô mỡ tiết ra nhiều adipokine và cytokine viêm (chẳng hạn leptin, IL-6, TNF- α) tương tác với tế bào gan, thúc đẩy viêm mạn và xơ hóa gan. Các yếu tố sinh học như cường insulin, leptin và IL-6 đã được ghi nhận tương tác với vi mô gan gây viêm, xơ và độc tính mỡ (lipotoxicity) [22]. Trong khi đó, bệnh nhân đái tháo đường typ 2 (thường kèm NAFLD) có nguy cơ HCC tăng gấp 2 – 3 lần so với người không, do tăng tín hiệu tăng trưởng qua insulin/IGF và tình trạng viêm mạn nghiêm trọng hơn (một nghiên cứu cho thấy tiểu đường type 2 chiếm 36% nguy cơ HCC) [22].

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

Các phương pháp chẩn đoán hình ảnh đóng một vai trò vô cùng quan trọng trong quá trình chẩn đoán, theo dõi và đánh giá hiệu quả điều trị ung thư biểu mô tế bào gan, cũng như theo dõi sự tái phát sau điều trị. Các kỹ thuật này bao gồm siêu âm thường, siêu âm tương phản (CEUS), chụp cắt lớp vi tính, chụp cộng hưởng từ, chụp mạch kỹ thuật số hoá xoá nền, xạ hình, và PET/CT. Trong thực tế cận lâm sàng hiện nay, siêu âm thường, CT và MRI đang được áp dụng rộng rãi nhất [23].

* Ưu điểm chung của các phương pháp chẩn đoán hình ảnh:

- Phát hiện khối u và đánh giá chi tiết: Các phương pháp như siêu âm thường, siêu âm tương phản, CT, MRI, PET/CT giúp phát hiện khối u, xác định kích thước, vị trí và mức độ xâm lấn. Ngoài ra, các phương pháp này còn phát hiện được hệ thống mạch máu tăng sinh của khối u, những tổn thương kèm theo như: Các hạch di căn hoặc các cơ quan ung thư thứ phát.

- Không xâm lấn hoặc xâm lấn tối thiểu: Đa số các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh không gây đau đớn hay ảnh hưởng lớn đến cơ thể bệnh nhân.

* Nhược điểm chung:

- Hạn chế trong phát hiện khối u nhỏ ở giai đoạn sớm hoặc đối với khối u nằm sâu trong nhu mô gan. Một số phương pháp có độ phân giải thấp hoặc phụ thuộc vào kỹ năng người thực hiện, gây khó khăn trong việc phát hiện sớm.

- Không xác định được tính chất khối u: Không phân biệt được chính xác u lành tính hay ác tính, nguyên phát hay thứ phát.

- Chi phí cao và hạn chế tiếp cận: Các kỹ thuật như MRI, PET/CT có giá thành cao và không phải lúc nào cũng có sẵn ở tất cả các cơ sở y tế.

- Nguy cơ phơi nhiễm bức xạ và tác dụng phụ: Một số phương pháp sử dụng tia X hoặc đồng vị phóng xạ, gây phơi nhiễm bức xạ; thuốc cản quang có thể gây dị ứng hoặc ảnh hưởng đến chức năng thận.

- Yêu cầu về thiết bị và kỹ thuật: Cần có trang thiết bị hiện đại và đội ngũ chuyên môn cao để thực hiện và phân tích kết quả chính xác.

Trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan, các phương pháp chẩn đoán hình ảnh cần kết hợp hợp lý với các thử nghiệm sinh hóa, sinh thiết mô hoặc các xét nghiệm máu để có kỳ vọng tăng độ chính xác và hiệu quả chẩn đoán. Mỗi phương pháp có ưu nhược điểm riêng, nên việc lựa chọn phương pháp phù hợp với mỗi bệnh nhân sẽ hỗ trợ tối ưu trong việc phát hiện sớm và điều trị hiệu quả.

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

- Chẩn đoán tế bào học: Trong quá trình này, việc thu thập mẫu tế bào học với khả năng chẩn đoán cao thường được thực hiện thông qua phương pháp chọc hút tế bào, đặc biệt là kỹ thuật chọc hút tế bào bằng kim nhỏ dưới sự hướng dẫn của siêu âm. Phương pháp này được coi là chính xác và mang lại giá trị chẩn đoán cao. Các mẫu bệnh phẩm tế bào học thường được phết lam kính và sử dụng phương pháp nhuộm Giemsa [12].

- Chẩn đoán mô bệnh học: Mô bệnh học được coi là phương pháp chẩn đoán chính xác nhất trong việc định rõ ung thư biểu mô tế bào gan. Sự lấy mẫu bệnh phẩm thường được thực hiện thông qua các phương pháp sinh thiết, tử thiết, hoặc sinh thiết trong phẫu thuật. Trong các kỹ thuật này, sinh thiết bằng kim nhỏ dưới sự hướng dẫn của siêu âm hoặc cắt lớp vi tính đã trở thành phương pháp phổ biến, kết hợp giữa tính an toàn và đảm bảo đủ bệnh phẩm cần thiết để đưa ra chẩn đoán mô bệnh học [12].

- Sinh thiết lỏng (liquid biopsy): Là phương pháp phân tích các thành phần khối u lưu hành trong dịch cơ thể (chủ yếu là máu) như DNA khối u tự do (circulating tumor DNA – ctDNA), tế bào u lưu hành trong hệ tuần hoàn (circulating tumor cells – CTCs), RNA (đặc biệt là microRNA lưu hành trong hệ tuần hoàn) hoặc các thể ngoại bào (extracellular vesicles – EV) chứa phân tử đặc hiệu khối u. Đây được xem là giải pháp bổ sung hoặc thay thế ít xâm lấn cho sinh thiết mô truyền thống [24].

* Nhược điểm:

- 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. Trong một số trường hợp, thủ thuật sinh thiết có thể gây lan rộng tế bào ung thư dọc theo đường kim sinh thiết, mặc dù nguy cơ này thấp. 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.

- Sinh thiết lỏng là phương pháp hiện đại có nhiều ưu điểm, tuy nhiên cũng có những hạn chế nhất định như: Yêu cầu kỹ thuật và chi phí cao, độ đặc hiệu còn có nguy cơ nhiễu lớn, độ nhạy ở giai đoạn sớm còn hạn chế, chưa phổ biến và chưa thể triển khai rộng rãi.

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

Các chỉ thị sinh học của HCC bao gồm cả thành phần protein, glycoprotein và DNA đặc hiệu do khối u tiết ra hoặc sản sinh trong quá trình biến đổi ác tính của tế bào gan. Những chỉ thị này có thể được phát hiện trong máu ngoại vi, thông qua các xét nghiệm đơn giản và ít xâm lấn, do đó có tiềm năng lớn trong tầm soát cộng đồng và theo dõi bệnh nhân có nguy cơ cao. Bảng 1.1 dưới đây tổng hợp một số chỉ thị sinh học quan trọng đã và đang được ứng dụng hoặc nghiên cứu trong chẩn đoán HCC [25].

Bảng 1.1. Một số chỉ thị sinh học chẩn đoán HCC đã và đang được nghiên cứu

Chỉ thị phân tử	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	Số lượng mẫu thử nghiệm (n)
AFP	62	87	689
AFP-L3	55	90	689
AFU	56.1	69.2	512
DCP	48	86	689
SCCA	12-84	48-100	12
SCCA-IgM	51-89	48-78	12
GP73	72.4 - 74.6	61.5 - 97.4	60 - 4217

* Ưu điểm:

- Một số xét nghiệm chỉ thị phân tử giúp phát hiện sớm các biểu hiện phân tử của HCC đôi khi ở giai đoạn khởi phát.

- Các chỉ thị phân tử đặc hiệu với HCC có thể giúp đưa ra chẩn đoán chính xác, giảm khả năng đưa ra kết quả âm tính giả hoặc dương tính giả.

- Phản ánh sự thay đổi cấp độ phân tử: Các chỉ thị sinh học có thể phản ánh sự thay đổi ở cấp độ phân tử và gen, giúp hiểu rõ hơn về cơ chế phát triển của HCC.

- Không xâm lấn và tiện lợi: Xét nghiệm chỉ thị phân tử thường là không xâm lấn, không đau đớn và tiện lợi cho bệnh nhân.

- Dễ thực hiện và lặp lại: Các xét nghiệm này thường dễ thực hiện, và kết quả có thể được lặp lại nhiều lần để theo dõi sự thay đổi và tiến triển của HCC.

- Hỗ trợ quyết định phương pháp điều trị: Kết quả xét nghiệm chỉ thị phân tử có thể hỗ trợ quyết định về lựa chọn phương pháp điều trị và theo dõi đáp ứng của bệnh nhân.

* Nhược điểm:

- Đòi hỏi máy móc, trang bị hiện đại, người thực hiện chuyên môn có kỹ thuật xét nghiệm cao do đó hạn chế cho việc triển khai rộng rãi.

- Độ tin cậy tùy theo chỉ thị sinh học: Cần lựa chọn đúng chỉ thị sinh học vì một số chỉ thị sinh học có thể không đủ đặc hiệu hoặc độ nhạy.

Trong nhiều thập kỷ, AFP là chỉ thị sinh học huyết thanh phổ biến nhất được áp dụng trong chẩn đoán HCC. Mặc dù cho đến nay việc tìm kiếm các chỉ thị sinh học chẩn đoán, tiên lượng hoặc dự đoán khác cho HCC vẫn đang được nghiên cứu mở rộng thì AFP vẫn là chỉ thị sinh học được sử dụng phổ biến nhất trong phác đồ chẩn đoán HCC. Đối với những bệnh nhân có nguy cơ tiến triển thành HCC, xét nghiệm các chỉ thị sinh học bổ sung có thể phát hiện HCC ở giai đoạn sớm hơn, tăng khả năng chữa khỏi cho bệnh nhân. Các chỉ thị sinh học mới như Des-gamma-carboxy protrombin (DCP) và AFP-L3 (dạng đồng phân của AFP liên kết với lectin *Lens culinaris* agglutinin), GPC3, TXN,... đã được nghiên cứu như là các chỉ thị sinh học thay thế hoặc bổ sung cho AFP và sự kết hợp của chúng dường như có tác dụng cải thiện hiệu suất chẩn đoán sớm so với xét nghiệm chỉ có AFP đơn lẻ [26].

1.2.3.1. Alpha-fetoprotein (AFP)

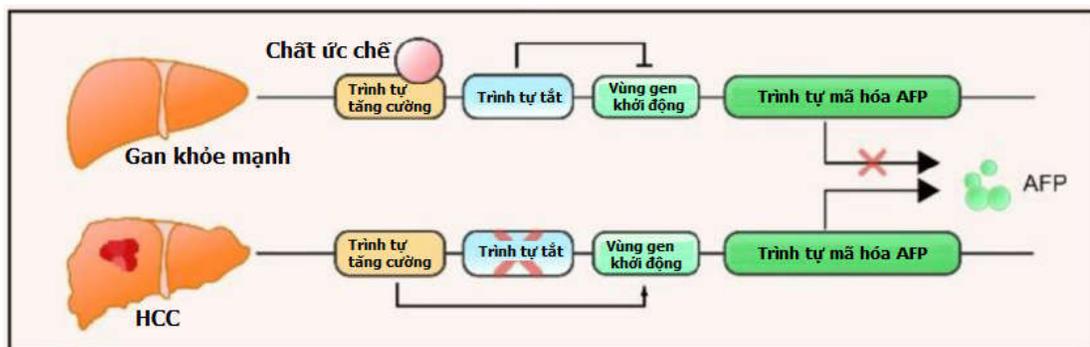
AFP là một glycoprotein có khối lượng phân tử 70 kDa được tạo ra bởi gan bào thai và túi ối trong giai đoạn ba tháng đầu thai kỳ. Được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1956 bởi nhà nghiên cứu người Anh Barry và cộng sự. Do được tìm thấy trong máu thai phụ nên ban đầu, AFP được gọi là "mô gan bào thai" (Fetal Liver Tissue) và được xác định trong huyết thanh thai từ ngày thứ 50 của thai kỳ. Trước khi được gọi là AFP, nó đã có các tên gọi khác nhau như: "gan bào thai" (fetal liver), "protein chuẩn" (standard protein), "protein ngày" (day protein) và "alpha-fetoglobulin". Trong sinh lý bình thường, AFP giảm nhanh sau khi sinh và duy trì ở mức thấp (< 8 ng/ml) trong suốt cuộc đời [26].

Gen *AFP* là một thành viên thuộc họ gen albumin, bao gồm bốn gen chính có liên quan đến quá trình phát triển và chức năng gan. Trong số đó, *AFP* tồn tại dưới ba dạng đồng phân chính: *AFP-L1*, *AFP-L2* và *AFP-L3*, được phân biệt dựa trên ái

lực của chúng với lectin *Lens culinaris* agglutinin. Mỗi dạng này có hàm lượng biến thiên trong các trạng thái sinh lý hoặc bệnh lý khác nhau, và đặc biệt *AFP-L3* thường tăng cao ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), được xem là chỉ dấu sinh học có độ đặc hiệu cao. Biểu hiện của *AFP* chủ yếu được điều hòa ở mức độ phiên mã. Gen này được định vị trên nhánh dài của nhiễm sắc thể số 4 ở người (4q11–q13), và có cấu trúc điều hòa phức tạp, bao gồm ít nhất hai vùng chức năng: một trình tự tăng cường (enhancer) và một trình tự ức chế (silencer) hoạt động một cách độc lập [27,28].

Trong quá trình phát triển của gan bào thai, các trình tự tăng cường này hoạt động mạnh mẽ, giúp thúc đẩy phiên mã gen *AFP*, từ đó sản sinh một lượng lớn *AFP* phục vụ cho chức năng biệt hóa và tăng trưởng của tế bào gan đang phát triển. Tuy nhiên, khi gan bước vào giai đoạn trưởng thành sau sinh, các yếu tố điều hòa phiên mã sẽ thay đổi: các trình tự tăng cường của *AFP* dần bị loại khỏi khu vực tiếp cận promoter của gen *AFP*, trong khi các yếu tố điều hòa gen *Albumin* được tuyển chọn để đảm bảo phiên mã bền vững của albumin (một protein chức năng chủ yếu của gan trưởng thành). Chính sự chuyển đổi này phản ánh một cơ chế điều hòa gen tinh vi nhằm đảm bảo tính đặc hiệu theo thời gian và giai đoạn phát triển của tế bào gan. Do đó, mức AFP trong máu giảm mạnh sau sinh và duy trì ở mức rất thấp trong người trưởng thành khỏe mạnh [27, 28].

Tuy nhiên, ở một số trạng thái bệnh lý, đặc biệt là trong ung thư biểu mô tế bào gan, cơ chế kiểm soát phiên mã này có thể bị phá vỡ. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng khi vùng ức chế bị xóa bỏ, hoặc các trình tự tăng cường bị tái kích hoạt bất thường, gen *AFP* có thể được “mở khóa” trở lại, dẫn đến sự tăng biểu hiện *AFP* một cách bất thường trong huyết thanh người bệnh. Đây là cơ chế giải thích hiện tượng tăng AFP huyết thanh gặp trong nhiều ca HCC, và cũng là cơ sở cho việc sử dụng *AFP* như một chỉ thị sinh học trong chẩn đoán và theo dõi bệnh gan ác tính [27, 28] (Hình 1.4).

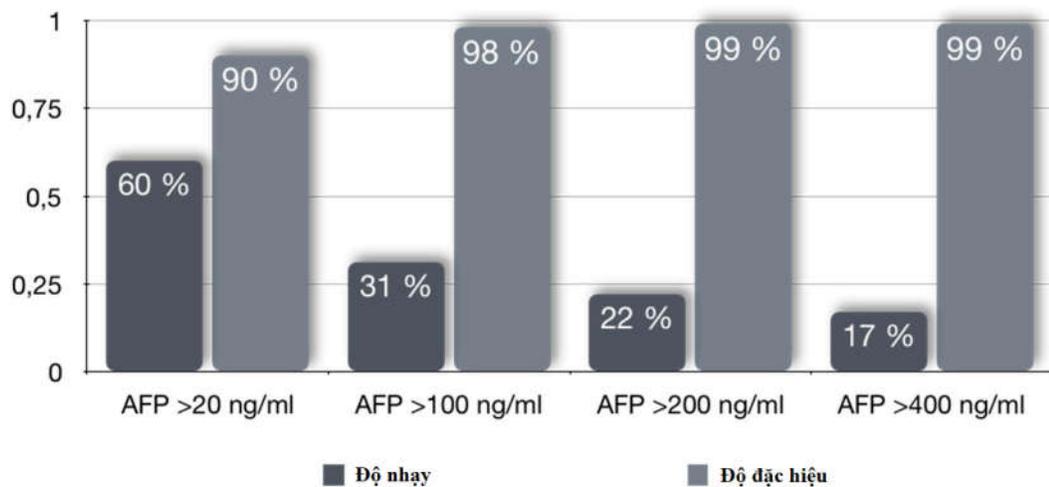


Hình 1.4. Cơ chế sự tăng biểu hiện của AFP trên bệnh nhân mắc HCC [29]

AFP không chỉ là một dấu ấn sinh học trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), mà còn được ghi nhận có vai trò sinh học phức tạp trong cơ chế bệnh sinh của HCC. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng AFP có thể tham gia vào quá trình ức chế miễn dịch chống khối u, tạo điều kiện cho sự phát triển và lan rộng của tế bào ung thư gan. Cụ thể, AFP được chứng minh là có khả năng tương tác với đại thực bào, làm suy giảm hoạt động thực bào cũng như ức chế biểu hiện phân tử kháng nguyên Ia, là nhóm phân tử MHC lớp II có vai trò thiết yếu trong việc trình diện kháng nguyên và hoạt hóa đáp ứng miễn dịch tế bào T. Ngoài ra, AFP còn ức chế hoạt động của các tế bào diệt tự nhiên (Natural Killer – NK), làm giảm sự phát triển và hoạt hóa của tế bào lympho T, đồng thời thúc đẩy hoạt động của các tế bào ức chế miễn dịch, góp phần tạo ra môi trường vi mô thuận lợi cho sự phát triển của HCC [30, 31]. Mặc dù cơ chế phân tử chi tiết về cách AFP điều hòa tăng sinh tế bào gan và hình thành khối u vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn, nhưng nhiều nghiên cứu đã phát hiện AFP có khả năng liên kết với các thụ thể đặc hiệu trên màng tế bào, bao gồm cả tế bào thường và tế bào u. Sự hiện diện đồng thời của AFP và các thụ thể tương ứng trong nhau thai gợi ý rằng AFP có thể sử dụng các thụ thể này như một cơ chế vận chuyển xuyên nhau thai, từ tuần hoàn của mẹ sang thai nhi, một đặc điểm có thể được tái sử dụng trong bối cảnh ung thư để hỗ trợ sinh u [30].

AFP bắt đầu được nghiên cứu trong các bệnh lý gan từ đầu những năm 1960 và nhanh chóng được nhận diện là dấu ấn quan trọng trong ung thư biểu mô tế bào gan. Năm 1963, nhà khoa học Abelev lần đầu tiên công bố vai trò của AFP như một dấu ấn ung thư gan, mở đường cho việc ứng dụng AFP như một xét nghiệm thường quy trong tầm soát và chẩn đoán HCC [12]. Các nghiên cứu sau đó khẳng định rằng AFP huyết thanh tăng cao ở hầu hết bệnh nhân HCC, trở thành chỉ thị sinh học kinh điển cho bệnh lý này. AFP hiện được sử dụng không chỉ trong chẩn đoán ban đầu, mà còn trong theo dõi tiến triển bệnh, đánh giá đáp ứng điều trị và tiên lượng lâm sàng. Tuy nhiên, độ nhạy và độ đặc hiệu của AFP trong phát hiện HCC sớm vẫn còn hạn chế, đặc biệt trong các trường hợp u nhỏ hoặc u biệt hóa tốt. Vì vậy, nhiều nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc tối ưu hóa ngưỡng AFP để tăng độ chính xác chẩn đoán, cũng như kết hợp AFP với các dấu ấn khác (như DCP, AFP-L3) nhằm cải thiện hiệu quả phát hiện sớm HCC. Theo khuyến cáo của Hiệp hội Gan Mỹ (AASLD, 2005), AFP có thể được sử dụng để chẩn đoán HCC khi khối u có kích thước trên 2 cm. Ở ngưỡng AFP > 200 ng/ml, có thể chẩn đoán HCC mà không cần sinh thiết trong một số tình huống đặc biệt [12]. Hội Gan học Nhật Bản (2011) cũng xem mức AFP vượt quá 200 ng/ml là một trong những tiêu chí chính xác cho chẩn đoán HCC [12].

Đáng chú ý, hiệu quả của AFP phụ thuộc rất lớn vào chỉ số ngưỡng (cut-off value) và tỷ lệ lưu hành HCC trong cộng đồng. Trong nghiên cứu của Trevisani và cộng sự (2001), với ngưỡng AFP là 20 ng/ml trong một quần thể có tỷ lệ mắc HCC là 5%, giá trị dự đoán âm tính (NPV) đạt tới 97.7% trong khi giá trị dự đoán dương tính (PPV) chỉ là 25%, cho thấy AFP ở ngưỡng này hữu ích hơn cho loại trừ HCC hơn là chẩn đoán xác định [19]. Nếu tỷ lệ mắc HCC trong cộng đồng tăng lên 20%, PPV cũng tăng lên đến 61% trong khi NPV vẫn duy trì ở mức 90%. Trong các phân tích so sánh, ngưỡng AFP > 20 ng/ml có độ nhạy cao nhất (60%) cho phát hiện sớm, trong khi các ngưỡng cao hơn (> 100, > 200, > 400 ng/ml) có độ đặc hiệu tăng dần, lên đến 99% ở ngưỡng > 200 ng/ml (Hình 1.5), nghĩa là có ít khả năng dương tính giả nhưng lại có nguy cơ bỏ sót HCC giai đoạn sớm [32].



Hình 1.5. Độ nhạy và độ đặc hiệu theo giá trị ngưỡng AFP trong giai đoạn sớm ung thư biểu mô tế bào gan. [32]

Tuy nhiên, hiệu quả chẩn đoán của AFP không đồng nhất giữa các khu vực địa lý và cộng đồng dân cư khác nhau. Một số nghiên cứu đã ghi nhận AFP được ứng dụng sàng lọc hiệu quả hơn trong quần thể người châu Á, đặc biệt ở Nhật Bản, Trung Quốc và Việt Nam, là những nơi có tỷ lệ cao nhiễm HBV và HCV, trong khi ở các cộng đồng phương Tây, nơi nguyên nhân chủ yếu là NAFLD và hội chứng chuyển hóa, hiệu suất sàng lọc của AFP thường thấp hơn đáng kể. Sự khác biệt này có thể liên quan đến cơ chế sinh bệnh học không đồng nhất của HCC giữa các vùng và biểu hiện AFP thay đổi theo đặc điểm di truyền, miễn dịch của từng quần thể. Thực tế này đã được thống kê và xác nhận trong nghiên cứu của Wu và cộng sự (2019), qua phân tích dữ liệu dịch tễ và chẩn đoán tại nhiều quốc gia trên thế giới [33].

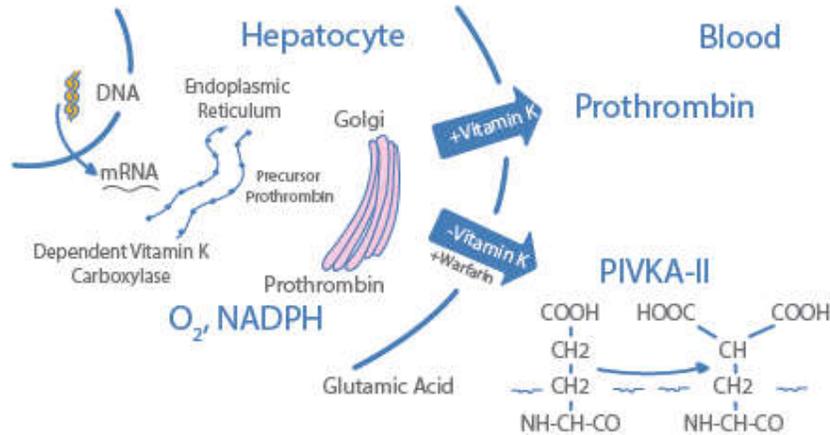
Mặc dù vậy, AFP vẫn được xem là một kháng nguyên đặc trưng của HCC trong khoảng 70 – 95% trường hợp. Khi nồng độ AFP huyết thanh vượt trên 400 ng/ml, xác suất mắc HCC là rất cao. Ngược lại, trong trường hợp di căn gan từ các khối u nguyên phát khác (như đại trực tràng, phổi), mức AFP thường chỉ tăng nhẹ, hiếm khi vượt quá 350 – 400 ng/ml [12]. Ngoài ra, AFP cũng có thể tăng trong các bệnh gan lành tính, như viêm gan virus cấp, viêm gan mạn và xơ gan do rượu do liên quan đến quá trình tái tạo tế bào gan. Điều này làm giảm độ đặc hiệu của AFP, đặc biệt trong các khối u nhỏ hoặc giai đoạn rất sớm của HCC. Một số bệnh lý ác tính ngoài gan, như ung thư nội mạc tử cung biệt hóa hướng sinh dục, cũng có thể gây tăng AFP huyết thanh lên mức tương đương với HCC (khoảng 350 – 400 ng/ml) [12]. Những trường hợp này góp phần lý giải vì sao độ nhạy và độ đặc hiệu của AFP suy giảm đáng kể khi chẩn đoán HCC giai đoạn sớm. Mặc dù phần lớn bệnh nhân mắc HCC có tăng AFP, nhưng nhiều người chỉ tăng ở mức trung bình hoặc cận ngưỡng chẩn đoán, đặc biệt ở giai đoạn đầu. Thậm chí, khoảng 9% bệnh nhân có thể có mức AFP rất cao và kéo dài dai dẳng, mà không tương ứng với kích thước khối u hay tiến triển bệnh [12].

Trước những hạn chế của AFP, các nghiên cứu đã tập trung phát triển và tìm kiếm các chỉ thị sinh học bổ sung nhằm nâng cao hiệu quả chẩn đoán HCC, đặc biệt ở giai đoạn sớm. Trong số đó, AFP-L3 (phân đoạn giàu fucosyl hóa của AFP) và DCP (Des-gamma-carboxy prothrombin, hay còn gọi là PIVKA-II) đã được xác định là hai chỉ thị huyết thanh có giá trị cao. Đặc biệt, các nhà khoa học Nhật Bản đã tiên phong tích hợp bộ ba dấu ấn AFP, AFP-L3 và DCP vào mô hình sàng lọc HCC. Một phân tích tổng hợp dựa trên 12 nghiên cứu, với dữ liệu từ 919 bệnh nhân mắc HCC và 1549 đối chứng, cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu gộp khi kết hợp cả ba dấu ấn huyết thanh đạt 0.91 và 0.84, vượt trội so với khi sử dụng AFP đơn lẻ (0.65 và 0.88) [34]. Đồng thời, thước đo hiệu quả chẩn đoán tổng thể, diện tích dưới đường cong ROC (AUC) cũng cho thấy sự vượt trội của mô hình kết hợp (AUC = 0.95) so với chỉ dùng AFP (AUC = 0.88) [34]. Những dữ liệu này đã củng cố cơ sở cho việc đồng thời sử dụng AFP, AFP-L3 và DCP trong các phác đồ sàng lọc HCC hiện đại, đặc biệt là tại các quốc gia có tỷ lệ bệnh cao và chương trình tầm soát cộng đồng rộng rãi.

1.2.3.2. Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP)

Năm 1984, Liebman và các cộng sự lần đầu tiên báo cáo về sự tăng nồng độ DCP trong huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh ung thư biểu mô tế bào gan. Kể từ đó, DCP đã trở thành một dấu ấn sinh học hữu ích trong việc chẩn đoán HCC. Hiện nay, các nhà nghiên cứu đã khám phá ra nhiều hoạt động sinh học của DCP liên quan đến quá trình phát triển của HCC [35, 36, 37].

Des-gamma-carboxy prothrombin là một protein bất thường được tạo ra bởi sự thiếu vitamin K của prothrombin, một yếu tố đông máu được sản xuất bởi gan. DCP có trọng lượng phân tử 72 kDa, chứa ba gốc acid glutamic, do đó không có khả năng tương tác với canxi, ảnh hưởng đến hoạt động đông máu. Khi các tế bào gan đang trong quá trình biến đổi ác tính, hệ thống carboxyl hoá phụ cảm ứng bởi vitamin K gặp trở ngại, dẫn đến sản sinh ra DCP (nên còn có tên là PIVKA-II, protein induced by vitamin K absence/ antagonist-II) (Hình 1.6).



Hình 1.6. Sự hình thành và giải phóng PIVKA-II (DCP) vào máu [38].

Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng DCP được tiết ra từ các tế bào ung thư biểu mô tế bào gan, thúc đẩy sự phát triển và di căn của HCC thông qua các cơ chế kích thích yếu tố tăng trưởng và yếu tố tương tác cận chế tiết giữa các tế bào HCC và các tế bào nội mô mạch máu [35]. Nồng độ DCP trong huyết thanh có thể được đo lường thông qua phương pháp ELISA. Nồng độ DCP bình thường là 0 – 7.5 ng/ml. Với ngưỡng cut-off là 25 ng/ml thì xét nghiệm DCP có độ nhạy là 87% và độ đặc hiệu là 85% trong chẩn đoán HCC [35]. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự tăng DCP phản ánh tình trạng của bệnh, kích thước khối u, sự xâm lấn tĩnh mạch cửa. Ngoài ra sau phẫu thuật cắt bỏ khối u hoặc sau điều trị ung thư gan bằng một số phương pháp thì nồng độ DCP có thể giảm rõ rệt. Do đó nếu nồng độ DCP tăng trở lại sau điều trị thể hiện bệnh tái phát hoặc điều trị thất bại.

Một trong những lợi thế lớn nhất của DCP là tính đặc hiệu cao: khác với AFP thường tăng trong các bệnh gan lành tính như xơ gan, viêm gan mạn hoặc gan nhiễm mỡ do rượu, DCP ít bị ảnh hưởng bởi các tình trạng không ác tính, từ đó giúp giảm tỷ lệ dương tính giả trong tầm soát HCC. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng nồng độ DCP huyết thanh có mối liên hệ chặt chẽ với các đặc điểm sinh học ác tính của khối u, bao gồm: xâm lấn vi mạch máu, hình thành huyết khối tĩnh mạch cửa,

kích thước khối u lớn, giai đoạn TNM tiến triển và tỷ lệ tái phát cao sau điều trị. Đặc biệt, trong các trường hợp HCC có huyết khối tĩnh mạch cửa, một yếu tố tiên lượng sống còn trong điều trị, DCP thường tăng rõ rệt và có thể phát hiện trước khi các tổn thương mạch máu được xác định qua chẩn đoán hình ảnh, hỗ trợ quyết định liệu có thể can thiệp phẫu thuật hay cần chuyển sang các phương pháp điều trị thay thế như TACE, hoặc liệu pháp miễn dịch. Bên cạnh vai trò tiên lượng, DCP còn chứng minh hiệu quả trong chẩn đoán HCC giai đoạn sớm, với độ nhạy và độ đặc hiệu vượt trội so với AFP, đặc biệt ở những bệnh nhân có khối u nhỏ hoặc AFP âm tính. Nhiều nghiên cứu cho thấy ngưỡng DCP khoảng 40 – 50 mAU/ml có thể đạt độ nhạy 70 – 80% và độ đặc hiệu trên 80% trong phát hiện HCC sớm. Quan trọng hơn, do mức độ biểu hiện DCP không đồng biến với AFP, nên khi kết hợp DCP và AFP, hiệu quả chẩn đoán được cải thiện rõ rệt, diện tích dưới đường cong (AUC) có thể vượt mốc 0.90, cao hơn đáng kể so với sử dụng AFP đơn lẻ. Nhờ đó, DCP đã được nhiều hướng dẫn quốc tế, đặc biệt là tại Nhật Bản và Hàn Quốc, đưa vào như một dấu ấn sinh học tiêu chuẩn kết hợp trong bộ ba AFP, AFP-L3, DCP để nâng cao hiệu quả sàng lọc và chẩn đoán HCC một cách chính xác và sớm hơn [39]. DCP thể hiện độ đặc hiệu cao trong việc chẩn đoán HCC, với nhiều nghiên cứu trên toàn cầu chỉ ra rằng DCP có độ nhạy cao hơn và mang giá trị chẩn đoán độc lập so với AFP trong việc chẩn đoán sớm HCC. Khi kết hợp sử dụng cả hai protein DCP và AFP, sẽ gia tăng khả năng phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan. Hiệu quả chẩn đoán của DCP (Des-gamma-carboxy prothrombin) trong phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) đã được khẳng định qua nhiều nghiên cứu quy mô khác nhau, đặc biệt là trong so sánh trực tiếp với AFP và AFP-L3. Trong nghiên cứu của Baek và cộng sự (2009) [35], các tác giả đã đánh giá độ chính xác chẩn đoán của DCP ở các nhóm bệnh nhân có khối u gan với nhiều kích thước khác nhau. Kết quả cho thấy, dù đường kính khối u nhỏ hơn 3 cm, từ 3 – 5 cm hay lớn hơn 5 cm, DCP vẫn vượt trội về độ chính xác chẩn đoán so với AFP, bất kể kích thước khối u. Điều này đặc biệt quan trọng trong bối cảnh nhu cầu phát hiện HCC ở giai đoạn rất sớm ngày càng cấp thiết.

Bổ sung vào bằng chứng này, Andreana và cộng sự (2009) đã tiến hành tổng hợp dữ liệu từ nhiều nghiên cứu, cho thấy độ nhạy của DCP dao động từ 58% đến 89%, trong khi độ đặc hiệu dao động từ 93% đến 97% vượt trội hơn hầu hết các dấu ấn huyết thanh khác, bao gồm AFP và AFP-L3 [36]. Tuy nhiên, tác giả cũng lưu ý rằng sự khác biệt về độ nhạy trong các báo cáo có thể là do sử dụng các phương pháp định lượng khác nhau, ngưỡng chẩn đoán không đồng nhất, hoặc sự đa dạng về nền tảng bệnh lý gan của nhóm chứng trong từng nghiên cứu.

Xu hướng này cũng được xác nhận trong các nghiên cứu mới hơn. Gần đây, Chen và cộng sự (2023) đã thực hiện một nghiên cứu bệnh chứng lớn, so sánh hiệu quả chẩn đoán của AFP và DCP đối với HCC, đặc biệt là HCC liên quan đến viêm gan B. Kết quả cho thấy AFP có AUC tương đối thấp, chỉ đạt 0.655 đối với HCC và 0.668 đối với HCC liên quan HBV, với độ nhạy và độ đặc hiệu không cao [37]. Trong khi đó, DCP thể hiện hiệu suất vượt trội hơn rõ rệt, với AUC lần lượt là 0.746 và 0.773 đối với HCC và HCC liên quan HBV. Khi sử dụng ngưỡng 40 mAU/ml, DCP đạt độ nhạy 59.92% và độ đặc hiệu lên tới 89.35% (là một mức đặc hiệu cao trong bối cảnh lâm sàng để chẩn đoán HCC).

Đặc biệt đáng chú ý, khi kết hợp DCP và AFP, hiệu suất chẩn đoán được cải thiện rõ rệt: AUC tăng lên 0.781, với độ nhạy 67.56% và độ đặc hiệu 81.95% [37]. Điều này củng cố một trong những quan điểm hiện đại trong sàng lọc ung thư gan, rằng việc kết hợp các dấu ấn sinh học, thay vì sử dụng đơn lẻ, có thể tối ưu hóa độ chính xác chẩn đoán và hỗ trợ phát hiện HCC ở giai đoạn sớm hơn. Những kết quả này tiếp tục khẳng định DCP không chỉ là một dấu ấn thay thế AFP, mà còn là yếu tố tăng cường hiệu quả chẩn đoán khi kết hợp, nhất là trong các mô hình sàng lọc HCC hiện nay.

1.2.3.3. Thioredoxin (TXN)

Thioredoxin là một loại protein rất phổ biến có kích thước 12 kDA, có mặt trong tất cả các loài sinh vật từ vi khuẩn *Archeabacteria* đến người, và có vai trò trong quá trình tổng hợp DNA thông qua việc hoạt động như một nguồn cung cấp hydro cho enzym ribonucleotide reductase. Thioredoxin còn quan trọng trong quá trình chuyển hóa của cơ thể, kiểm soát quá trình oxy hóa khử (redox) là một cơ chế kiểm soát sinh học cơ bản trong cơ thể [40]. Hệ thống thioredoxin (TXNs) bao gồm TXN, nicotinamid adenin dinucleotid phosphate dạng khử (NADPH), và thioredoxin reductase (TXNRD), đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự cân bằng quá trình oxy hóa khử trong tế bào và bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do các tác nhân oxy hóa (ROS) [41]. Cơ chế hoạt động của hệ thống TXN diễn ra theo chu trình: NADPH cung cấp điện tử cho TXNRD (một enzym dimer chứa selenocysteine ở trung tâm hoạt động), sau đó TXNRD sẽ khử TXN từ dạng oxy hóa (disulfide) về dạng khử (dithiol). TXN ở trạng thái khử sẽ tiếp tục truyền điện tử để khử các cầu disulfide trên nhiều protein đích khác nhau, qua đó tác động đến cấu trúc và chức năng của các protein này [40]. Nhờ chu trình trên, hệ thống thioredoxin đóng vai trò quan trọng trong việc trung hòa ROS và duy trì môi trường khử nội bào: TXN là chất cho điện tử cho các enzym chống oxy hóa như peroxiredoxin (để phân hủy H_2O_2) và cho ribonucleotide reductase (để tổng hợp DNA). Bên cạnh chức năng chống oxy hóa,

TXN còn tham gia điều hòa các quá trình tín hiệu tế bào: protein này có thể tương tác và điều chỉnh hoạt tính của nhiều yếu tố phiên mã nhạy cảm với trạng thái oxy hóa-khử (ví dụ: NF- κ B, AP-1), ảnh hưởng đến biểu hiện gene liên quan sinh trưởng và apoptosis. Ngoài ra, TXN có thể được tiết ra khỏi tế bào theo cơ chế không điển hình (leaderless secretion) và khi hiện diện ngoại bào, nó có thể đóng vai trò như một cytokine nhỏ điều hòa đáp ứng miễn dịch [40].

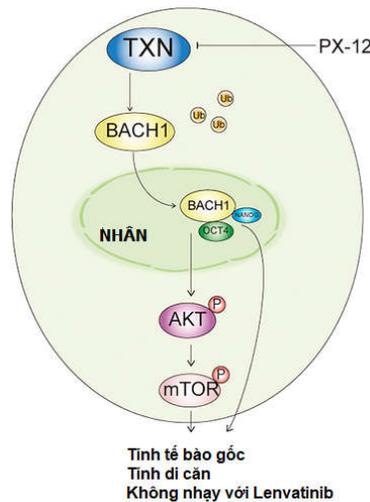
Cấu trúc của TXN đã là mục tiêu của nhiều nghiên cứu kể từ khi chuỗi axit amin của vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) được giải mã vào năm 1968. Nghiên cứu này chỉ ra rằng TXN của *E. coli* bao gồm 108 axit amin và các nghiên cứu sau chứng minh thioredoxin của người bao gồm 105 axit amin. Ở người, TXN1 (thioredoxin dạng tế bào chất) chứa trình tự axit amin ngắn: Cys-Gly-Pro-Cys đặc trưng tại vị trí hoạt động, hai cysteine tạo cầu disulfide nội phân tử khi TXN ở dạng oxy hóa và sẽ tách ra ở dạng khử để chuyển điện tử. TXN có cấu trúc bậc ba dạng nếp gấp thioredoxin (thioredoxin fold) điển hình: một lõi gồm các gấp nếp beta (beta-sheet) được bao quanh bởi các xoắn alpha (alpha-helix). Đặc điểm cấu trúc này tạo nên trung tâm hoạt động linh động cho phép TXN thực hiện chức năng xúc tác các phản ứng trao đổi disulfide. Sự luân chuyển giữa dạng khử (dithiol) và dạng oxy hóa (disulfide) tại cầu nối Cys32-Cys35 chính là cơ sở cho hoạt tính enzym của TXN, giúp protein này khử các cầu disulfide trên protein đích và tham gia điều hòa trạng thái oxy hóa-khử của tế bào.

TXN thường được phát hiện tăng cường biểu hiện trong nhiều loại ung thư, bao gồm ung thư phổi, vú, gan, đại tràng, cổ tử cung, tuyến tụy và dạ dày. Sự biểu hiện quá mức của TXN có liên quan chặt chẽ đến quá trình tăng sinh tế bào ác tính, ức chế hiện tượng chết tế bào theo chương trình (apoptosis), thúc đẩy khả năng xâm lấn và di căn của khối u, đồng thời phản ánh tiên lượng xấu ở người bệnh. Trong môi trường vi mô khối u vốn giàu các tác nhân oxy hóa (ROS), TXN đóng vai trò như một yếu tố bảo vệ giúp tế bào ung thư thích nghi và sống sót, trong khi các tế bào bình thường thường không chịu đựng được áp lực oxy hóa kéo dài. Mặt khác, khi hệ thống chống oxy hóa nội sinh, bao gồm TXN bị suy giảm, cơ thể rơi vào trạng thái stress oxy hóa mãn tính, tạo điều kiện cho sự tích tụ ROS, từ đó khởi phát hoặc thúc đẩy tiến triển của nhiều bệnh lý, đặc biệt là ung thư.

Như vậy, TXN vừa là một thành phần bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa, vừa tham gia vào các tiến trình sinh học then chốt như điều hòa apoptosis, kiểm soát sự xâm lấn và hỗ trợ tăng trưởng khối u, những đặc điểm giúp giải thích tại sao TXN có vai trò trung tâm trong sinh bệnh học của ung thư:

+ Quá trình sinh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), có liên quan mật thiết với mất cân bằng oxy hóa khử nội bào. Tình trạng viêm mạn tính ở gan (do virus, rượu hoặc nhiễm độc,...) dẫn đến sản sinh quá mức ROS và gây stress oxy hóa, qua đó thúc đẩy đột biến DNA và biến đổi ác tính ở tế bào gan. Tuy nhiên, nếu nồng độ ROS tăng quá cao, tế bào có thể bị tổn thương nặng, ngừng tăng sinh hoặc chết theo chương trình. Do đó, các tế bào ung thư phải thích nghi bằng cách tăng cường hệ thống chống oxy hóa nhằm giữ mức ROS ở ngưỡng vừa đủ để kích thích tăng sinh nhưng không gây độc tế bào [41]. Hệ thống thioredoxin là một cơ chế chống oxy hóa trọng yếu sẽ được điều hòa tăng cao trong các khối u gan. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng TXN biểu hiện mức độ cao trong mô ung thư so với mô lành, và sự hoạt hóa ưu thế của trục TXN/TXNIRD mang lại lợi thế cho tế bào ung thư trong môi trường stress oxy hóa cao [42].

Trong các trường hợp HCC, TXN tăng cao góp phần thúc đẩy nhiều đường tín hiệu sinh ung quan trọng. Cụ thể, TXN hoạt hóa yếu tố HIF-1 α trong điều kiện thiếu oxy nội khối u, làm tăng tiết yếu tố tăng trưởng mạch máu VEGF-A, qua đó kích thích hình thành mạch máu mới nuôi khối u và đẩy mạnh sự phát triển của tế bào ung thư gan. Bên cạnh đó, biểu hiện TXN trong HCC có tương quan thuận với sự hoạt hóa của các chương trình gen thúc đẩy tăng sinh như phức hợp mTORC1, các mục tiêu của E2F, cũng như gen *Myc* [42]. Những thay đổi này cho thấy TXN không chỉ đơn thuần chống lại ROS mà còn can thiệp vào mạng lưới điều hòa tăng trưởng của tế bào ung thư. Nghiên cứu đáng chú ý gần đây của Chengmeng và cộng sự (2023) [43] đã làm sáng tỏ một cơ chế mới: TXN tương tác ổn định protein cảm ứng oxy hóa BACH1, kích hoạt đường dẫn AKT/mTOR, qua đó tăng cường tính chất tế bào gốc ung thư và thúc đẩy di căn trong HCC (Hình 1.7).



Hình 1.7. Thioredoxin tạo điều kiện cho ung thư biểu mô tế bào gan phát triển và di căn bằng cách tăng độ ổn định BACH1. [43]

Phát hiện này giúp lý giải vì sao những khối u gan biểu hiện TXN cao thường có đặc tính xâm lấn mạnh và đi kèm tiên lượng xấu. Nhiều khảo sát lâm sàng cho thấy mức TXN (cùng với TXNRD) tăng cao có liên hệ chặt chẽ với thể trạng u ác tính, bao gồm u kích thước lớn, xâm lấn mạch, di căn xa, cũng như kháng trị hóa chất và thời gian sống ngắn hơn ở bệnh nhân HCC. Ngược lại, chất ức chế nội sinh của thioredoxin là TXNIP thường bị giảm biểu hiện trong HCC, càng làm tăng cường hoạt động của TXN và tạo điều kiện thuận lợi cho tế bào ung thư phát triển [41, 42, 43].

+ Sự biểu hiện quá mức của thioredoxin còn liên quan đến sự ức chế apoptosis trong các tế bào ung thư và tính xâm lấn của khối u, điều này ít khi được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó. Thioredoxin tăng cường sự sinh trưởng của tế bào ung thư gan, giúp cho sự lan truyền của ung thư trong cơ thể bệnh nhân [44]. Nghiên cứu này cũng đã chỉ ra rằng biểu hiện của thioredoxin có mối liên hệ chặt chẽ với tiên lượng xấu của bệnh nhân HCC, vì những bệnh nhân có mức thioredoxin cao hơn có khả năng tiến triển bệnh nhanh hơn và giảm khả năng sống sót. Một nghiên cứu quan trọng khác đã chỉ ra rằng sự tăng cường biểu hiện thioredoxin trong huyết thanh có thể giúp phân biệt giữa bệnh nhân mắc HCC và các bệnh lý gan mạn tính như xơ gan, với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Điều này làm cho thioredoxin trở thành một chỉ thị sinh học đầy hứa hẹn cho việc chẩn đoán HCC ở giai đoạn sớm, đặc biệt là khi AFP, một chỉ thị sinh học hiện nay trong chẩn đoán HCC, không đạt được độ nhạy cao trong những trường hợp bệnh sớm [45].

Sự kết hợp giữa TXN và AFP có thể mang lại hiệu quả cao hơn trong chẩn đoán HCC. AFP đã được sử dụng lâu dài như một chỉ thị sinh học chính trong chẩn đoán và theo dõi điều trị HCC, tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, AFP không đủ nhạy để phát hiện ung thư gan ở giai đoạn sớm, đặc biệt là trong các bệnh nhân có AFP âm tính [46]. TXN với khả năng phát hiện các tế bào ung thư gan ở giai đoạn sớm và sự liên kết với tiên lượng xấu của bệnh, có thể bổ sung giá trị cho AFP, giúp cải thiện khả năng chẩn đoán và theo dõi sự tiến triển của HCC. Sự tăng biểu hiện của TXN đã được thấy trong nhiều loại ung thư là bằng chứng gợi ý có thể liên quan đến sự phát triển ác tính của khối u gan và giảm khả năng sống của bệnh nhân HCC. TXN tăng biểu hiện ở mô HCC của người, liên quan đến tiên lượng xấu của bệnh; các thử nghiệm chức năng cho thấy TXN thúc đẩy tính chất tế bào gốc ung thư và khả năng di căn của HCC cả *in vitro* lẫn *in vivo*. Ở cấp độ phân tử, TXN còn kích hoạt con đường HIF-1 α /VEGF-A, thúc đẩy quá trình tạo mạch và tăng sinh tế bào trong khối u gan [43]. Ở khía cạnh lâm sàng, nghiên cứu của Abdelwahab và cộng sự (2024) cũng cho thấy nồng độ TXN huyết thanh ở bệnh nhân mắc HCC ($140.96 \pm$

12.70 ng/ml) cao hơn rõ so với nhóm xơ gan và nhóm chứng (88.33 ± 10.34 và 73.10 ± 13.22 ng/ml; $P < 0.001$). Đáng chú ý, với ngưỡng cắt 114 ng/ml, TXN đạt độ nhạy và độ đặc hiệu 100% trong chẩn đoán HCC (AUC = 1.00), vượt trội so với AFP (đặc hiệu chỉ 47%) [42]. Các nghiên cứu này khẳng định TXN không chỉ tham gia tiến trình ác tính hoá của HCC mà còn có tiềm năng lâm sàng như một chỉ thị sinh học mới. Việc bổ sung TXN vào bộ chỉ thị sinh học cùng với AFP và DCP do đó là hợp lý, vì TXN có thể nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu chẩn đoán HCC, đặc biệt ở giai đoạn sớm hoặc ở những trường hợp mà AFP/DCP đơn lẻ chưa đủ phát hiện.

Trong nghiên cứu của Jun Li và cộng sự (2015) thực hiện trên một quần thể người bệnh ở Trung Quốc, cho thấy TXN trong huyết thanh tăng đáng kể ở bệnh nhân mắc HCC so với người khỏe mạnh, bệnh xơ gan và bệnh gan mạn tính, với mức trung bình 45.1 ng/ml. Ngưỡng tối ưu để phát hiện TXN là 20.5 ng/ml, với chỉ số AUC là 0.946 cho nhóm người khỏe mạnh và 0.941 cho nhóm bệnh nhân HCC. Độ nhạy (khả năng phát hiện bệnh) và độ đặc hiệu (khả năng xác định người không bị bệnh) lần lượt là 84.3% và 91.8%. Đặc biệt, 73.7% bệnh nhân mắc HCC giai đoạn rất sớm có kết quả xét nghiệm TXN dương tính, trong khi chỉ 31.6% có kết quả dương tính với AFP. Trong nhóm bệnh nhân có kết quả AFP âm tính, 69.2% vẫn có kết quả TXN dương tính. Khi kết hợp xét nghiệm TXN và AFP, khả năng chẩn đoán được cải thiện rõ rệt, với chỉ số AUC đạt 0.982 cho nhóm người khỏe mạnh và 0.978 cho nhóm bệnh nhân HCC, với độ nhạy 88.7% và độ đặc hiệu 92.2%. [47]. Ngoài ra, một nghiên cứu năm 2023 của Zenlander và cộng sự đã chỉ ra rằng thioredoxin reductase 1 (TXNRD1), một thành phần enzym liên quan TXN, cũng có tiềm năng làm dấu ấn bổ sung. Khi kết hợp TXNRD1 với AFP và DCP, độ nhạy và độ đặc hiệu trong chẩn đoán HCC được cải thiện, với AUC tăng từ 0.844 lên 0.92 [48].

Với vai trò quan trọng trong duy trì trạng thái redox của tế bào và sự liên quan đến các quá trình sinh học cơ bản như tổng hợp DNA, điều hòa apoptosis và tăng sinh tế bào, TXN đã chứng tỏ là một chỉ thị sinh học tiềm năng trong chẩn đoán và theo dõi HCC. Đặc biệt, khả năng phát hiện sớm HCC ngay cả khi AFP âm tính, làm tăng giá trị lâm sàng của TXN như một chỉ thị sinh học bổ sung cho AFP trong việc chẩn đoán và theo dõi ung thư gan. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu lâm sàng rộng rãi và dài hạn để xác định vai trò chính thức của TXN trong chẩn đoán và theo dõi điều trị HCC.

1.2.3.4. Ưu điểm của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP, TXN trong chẩn đoán HCC

a) AFP:

- Nhạy và đặc hiệu: AFP là một trong những chỉ thị sinh học truyền thống, phổ biến được ứng dụng rộng rãi trong sàng lọc và theo dõi HCC. Ở ngưỡng ≥ 400 ng/ml,

AFP có độ đặc hiệu cao trong chẩn đoán HCC. Tuy nhiên, ở giai đoạn sớm, khoảng 30 – 40% bệnh nhân mắc HCC có thể không tăng AFP, làm hạn chế hiệu quả phát hiện sớm.

- Dễ thực hiện và chi phí thấp: Phương pháp xét nghiệm AFP thường dễ thực hiện, chi phí thấp và phổ biến tại hầu hết cơ sở y tế.

b) DCP:

- Tính đặc hiệu cao cho HCC: DCP được coi là đặc hiệu hơn đối với HCC so với AFP trong một số trường hợp (bệnh nhân có nồng độ AFP bình thường hoặc ở giai đoạn sớm). Phản ánh sự phát triển kích thước và xâm lấn mạch máu của khối u.

- Tăng độ nhạy và chính xác khi kết hợp với AFP: Kết hợp xét nghiệm đồng thời DCP và AFP có thể cung cấp thông tin đa chiều và tăng cường độ chính xác của quá trình chẩn đoán, đặc biệt ở những trường hợp HCC giai đoạn sớm.

- Dự đoán khả năng đáp ứng điều trị: Nồng độ DCP huyết thanh có thể liên quan đến dự đoán đáp ứng của bệnh nhân với điều trị, đặc biệt là sau phẫu thuật hoặc điều trị bằng thuốc chống ung thư.

c) TXN:

- Độc lập với AFP và DCP: TXN là một chỉ thị sinh học độc lập, không phụ thuộc vào nồng độ AFP hay DCP, giúp cung cấp thông tin bổ sung và đa chiều cho quá trình chẩn đoán, đặc biệt trong trường hợp HCC giai đoạn sớm hoặc AFP âm tính.

- Phản ánh chức năng tế bào: TXN có khả năng phản ánh chức năng tế bào và sự biểu hiện của nó có thể liên quan đến sự phát triển của HCC ở giai đoạn sớm.

- Mối liên quan với tiêu chuẩn kiểm soát ung thư: TXN đã được liên kết với quá trình kiểm soát ung thư, đặc biệt là trong việc điều chỉnh sự chết của tế bào (apoptosis) và sự đa dạng biểu hiện của ung thư.

* Lý do kết hợp bộ ba chỉ thị sinh học trong xét nghiệm chẩn đoán HCC:

- Tăng độ chính xác và tin cậy: Kết hợp sử dụng ba chỉ thị sinh học giúp tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của quá trình chẩn đoán so với từng chỉ thị sinh học đơn lẻ, giảm khả năng bỏ sót ở giai đoạn sớm.

- Phản ánh đa dạng biểu hiện bệnh: AFP phản ánh tăng sinh tế bào, DCP liên quan đến chức năng gan và kích thước khối u, còn TXN phản ánh mức độ stress oxy hóa và chức năng tế bào

- 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.

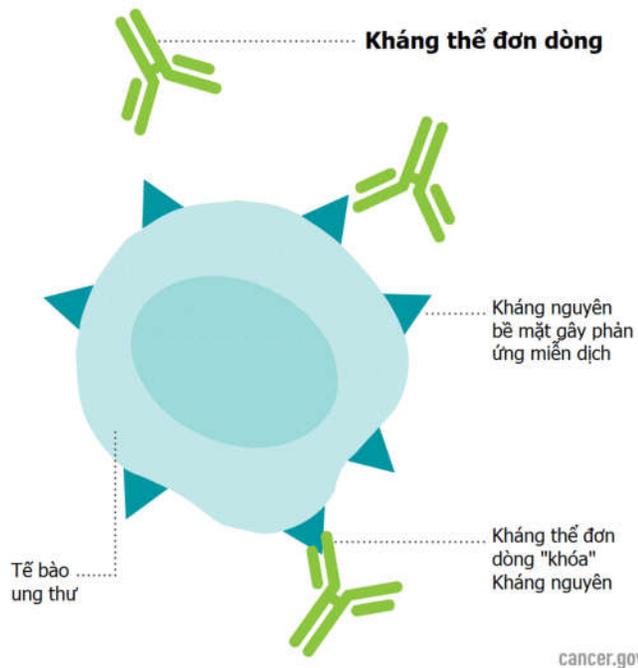
- Hỗ trợ tiên lượng và theo dõi điều trị: AFP và DCP có tác dụng đánh giá đáp ứng phẫu thuật hoặc điều trị đích; TXN bổ sung thông tin về tiên lượng lâu dài.

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

1.3.1.1. Khái niệm

Kháng thể đơn dòng (monoclonal Antibodies - mAbs) là các phân tử globulin miễn dịch được tạo ra trong phòng thí nghiệm có nguồn gốc từ một dòng tế bào lympho B duy nhất, được thiết kế để thay thế, tăng cường hoặc mô phỏng khả năng tấn công của hệ miễn dịch lên các tế bào ung thư bằng cách liên kết với các kháng nguyên trên bề mặt của chúng (Hình 1.8).



Hình 1.8. Kháng thể đơn dòng “khóa” tế bào ung thư [49]

Kháng thể đơn dòng được tạo ra từ một bản sao duy nhất của dòng tế bào lai, do đó có tính thuần nhất. Chúng được sản xuất thông qua việc kết hợp giữa tế bào lympho B và tế bào myeloma (tế bào ung thư tủy xương), cho phép tế bào lai tiếp tục phân chia và tiết ra một loại immunoglobulin duy nhất trong môi trường nuôi cấy tế bào [50]. Kháng thể đơn dòng có thể có ái lực đơn trị (monovalent affinity), chỉ liên kết với cùng một epitope (phần kháng nguyên được kháng thể nhận biết) [51]. Có thể tạo ra các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thích hợp; sau đó có thể dùng kháng thể đơn dòng này để phát hiện kháng nguyên đó. Khả năng này đã trở thành một công cụ hữu dụng trong các nghiên cứu trong hóa sinh, sinh học phân tử và y học [50].

Kháng thể đơn dòng hiện nay là một trong những nền tảng cốt lõi của y học hiện đại, đã phát triển qua 4 thế hệ:

- + Thế hệ 1.0 (Hybridoma cổ điển): Sản xuất từ tế bào lympho B chuột; đặc hiệu cao nhưng sinh miễn dịch mạnh ở người.
- + Thế hệ 2.0 (Chimeric và Humanized): Tái tổ hợp vùng biến từ chuột với khung người; giảm đáng kể phản ứng miễn dịch.
- + Thế hệ 3.0 (Fully Human): Kháng thể người hoàn toàn; tối ưu hóa độ an toàn và hiệu quả lâm sàng.
- + Thế hệ 4.0+ (Thiết kế thông minh): Gồm bispecific antibodies, antibody-drug conjugates (ADCs), và CAR-mAbs; cho phép gắn đa mục tiêu, mang thuốc chính xác hoặc kích hoạt miễn dịch đặc hiệu cao [52].

1.3.1.2. Một số nghiên cứu kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán ung thư trên thế giới và tại Việt Nam

Kháng thể đơn dòng (mAbs) đã trở thành công cụ quan trọng trong chẩn đoán bệnh, đặc biệt trong lĩnh vực ung thư học. Nhờ khả năng nhận diện và gắn kết đặc hiệu với các dấu ấn sinh học trên tế bào ung thư, mAbs giúp cải thiện độ chính xác, tính đặc hiệu, và độ nhạy trong chẩn đoán so với các phương pháp truyền thống.

- Kháng thể đơn dòng ứng dụng trong phát hiện dấu ấn sinh học: Dấu ấn sinh học đóng vai trò quan trọng trong việc phát hiện và theo dõi ung thư.

+ HER2/neu: Trong ung thư vú, kháng thể đơn dòng trastuzumab đã được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện HER2, giúp phân loại bệnh nhân và đưa ra phác đồ điều trị phù hợp [53].

+ Glypican-3 (GPC3): Một dấu ấn sinh học được biểu hiện đặc biệt trên bề mặt tế bào ung thư biểu mô tế bào gan (HCC). Kháng thể đơn dòng đặc hiệu với GPC3, như GC33, đã được phát triển để nhận diện và gắn kết với GPC3, từ đó hỗ trợ chẩn đoán ung thư gan sớm. Nghiên cứu của Feng và cộng sự (2013) [54] chỉ ra rằng GPC3 có tỷ lệ biểu hiện cao (khoảng 77%) ở bệnh nhân HCC, làm nổi bật tính ứng dụng kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán.

+ EPCA-2: EPCA-2 với một đặc điểm quan trọng là protein này chỉ tăng mạnh ở tế bào ác tính tuyến tiền liệt vì vậy nó đặc trưng cho ung thư tuyến tiền liệt. Bằng quy trình gây miễn dịch trên thỏ, nghiên cứu của Đàm Thị Tú Anh và cộng sự (2016) [55] đã tạo thành công kháng thể thỏ đặc hiệu với EPCA-2, ứng dụng trong chẩn đoán sớm ung thư tiền liệt tuyến và chẩn đoán phân biệt với phì đại lành tính tuyến tiền liệt.

- Ứng dụng trong kỹ thuật miễn dịch học: Các phương pháp miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng giúp tăng cường hiệu quả chẩn đoán.

+ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): mAbs được sử dụng để phát hiện các dấu ấn sinh học trong mẫu huyết thanh hoặc mô, với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Năm 2024, Viện Sinh học (Viện Hàn lâm KH&CN VN) thông báo đã chế tạo thành công bộ kit ELISA đo nồng độ kháng nguyên ung thư CA125 để chẩn đoán sớm ung thư buồng trứng. Nhóm của TS. Nguyễn Thị Xuân đã được cấp bằng độc quyền giải pháp hữu ích cho phương pháp sản xuất kit này. Bộ kit sử dụng kháng thể bất là kháng thể thu được từ huyết thanh chuột được gây miễn dịch với kháng nguyên CA125, kết hợp với kháng thể đơn dòng kháng CA125 gắn enzyme (HRP) trong xét nghiệm ELISA. Kit nội địa có độ chính xác 70–80% trong phát hiện sớm ung thư buồng trứng so với tiêu chuẩn vàng (chẩn đoán hình ảnh, giải phẫu bệnh), nhưng giá thành chỉ bằng 1/3–1/5 so với kit nhập khẩu [56].

+ Immunohistochemistry (IHC): mAbs được sử dụng để nhuộm mô ung thư, giúp xác định biểu hiện của các protein đặc hiệu như HER2, PD-L1 hoặc GPC3. Kỹ thuật này thường được sử dụng trong bệnh học để chẩn đoán và phân loại các loại ung thư [57]

+ Flow Cytometry: Trong ung thư máu, mAbs được sử dụng để xác định các dấu ấn bề mặt tế bào (CD markers) như CD33 (bệnh bạch cầu cấp dòng tủy) [58]. Năm 2024, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.HCM công bố đã sản xuất thành công bộ kháng thể đơn dòng tái tổ hợp đặc hiệu cho các thụ thể CD3ε, CD4 và CD8α trên tế bào lympho T. Nhóm nghiên cứu do TS. Nguyễn Thị Thanh Thảo chủ trì đã tổng hợp các gen mã hóa kháng thể kháng CD3, CD4, CD8 và đưa vào hệ thống biểu hiện trên dòng tế bào buồng trứng chuột (CHO). Kết quả, họ tạo được các dòng CHO-DG44 ổn định sản xuất lượng lớn các kháng thể này, tinh sạch đạt độ tinh khiết >90% và gắn thành công chất huỳnh quang để dùng trong phân tích tế bào dòng chảy. Khi thử nghiệm trên mẫu máu, bộ kháng thể này cho phép định tính, định lượng chính xác tỷ lệ tế bào T CD3⁺CD4⁺ và CD3⁺CD8⁺. Đáng chú ý, hiệu quả của các kháng thể đơn dòng nội địa được kiểm chứng tại các bệnh viện lớn (Chợ Rẫy, Huyết học Truyền máu Cần Thơ) cho thấy tương đương hoặc cao hơn so với sản phẩm nhập khẩu [59].

- Chẩn đoán hình ảnh nhờ kháng thể đơn dòng: Kháng thể đơn dòng được gắn với các chất đánh dấu phóng xạ hoặc huỳnh quang

+ PET (Positron Emission Tomography): mAbs gắn với đồng vị phóng xạ (như Zirconium-89) được tiêm vào cơ thể để phát hiện vị trí và mức độ lan rộng của ung thư. Ví dụ, mAbs gắn với GPC3 đã được thử nghiệm trong PET để phát hiện di căn gan [60].

+ MRI (Magnetic Resonance Imaging): Các hạt nano từ tính liên kết với mAbs có thể được sử dụng để tăng cường hình ảnh trong MRI. Nghiên cứu của Fleuren và cộng sự (2014) [61] đã chỉ ra rằng việc sử dụng mAbs kết hợp với công nghệ nano giúp cải thiện đáng kể khả năng phát hiện khối u ở giai đoạn sớm.

+ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography): mAbs gắn với đồng vị phóng xạ như Technetium-99m được sử dụng để phát hiện ung thư tuyến tiền liệt và ung thư gan với độ chính xác cao [62].

- Một số nghiên cứu đối với mAbs khác trong mô học và phân tử: Mặc dù số lượng nghiên cứu nhắm trực tiếp vào chẩn đoán các loại ung thư rắn như HCC, vú, đại trực tràng... bằng kháng thể đơn dòng ở Việt Nam còn hạn chế, một số công trình đã ghi nhận việc gắn kháng thể đơn dòng với các hạt nano hoặc chất đánh dấu để nhắm tới marker như CD133 trên tế bào ung thư di căn, cho thấy hướng mở trong nghiên cứu phát triển mAbs ứng dụng chẩn đoán bằng hình ảnh và kỹ thuật phân tử tại Việt Nam [63].

- Cá nhân hóa chẩn đoán: Kháng thể đơn dòng đang hỗ trợ chẩn đoán cá nhân hóa bằng cách xác định các dấu ấn sinh học cụ thể liên quan đến từng bệnh nhân. Điều này đặc biệt hữu ích trong ung thư có tính không đồng nhất, nơi mỗi khối u có thể biểu hiện các đặc điểm sinh học khác nhau.

1.3.2. Các phương pháp tạo kháng thể đơn dòng

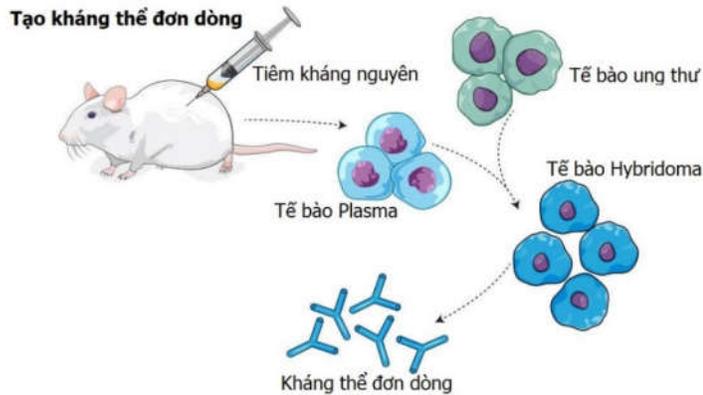
1.3.2.1. Phương pháp tạo tế bào lai hybridoma

Nguyên lý của phương pháp này dựa trên sự kết hợp giữa hai đặc tính: Thứ nhất là khả năng phân chia liên tục của tế bào ung thư tủy xương myeloma và thứ hai là khả năng sinh ra kháng thể của tế bào lympho B đã được miễn cảm kháng nguyên. Từ đó tạo ra một loại tế bào lai có thể phân bào liên tục trong điều kiện nuôi cấy như tế bào ung thư, đồng thời lại có khả năng sản sinh ra kháng thể.

Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng này dựa trên việc tạo tế bào lai bằng cách xác định các tế bào lympho B đã được hoạt hóa sinh kháng thể đặc hiệu (các tế bào này tiết ra kháng thể nhận diện kháng nguyên quan tâm) và hợp nhất chúng với các tế bào myeloma [64]. Tế bào lympho B của chuột hoặc thỏ có thể được sử dụng để tạo thành tế bào lai hybridoma [65]. 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 (Hình 1.9).

Polyethylene glycol (PEG) thường được sử dụng để kích thích sự hợp nhất giữa các màng tế bào lympho B của hai dòng tế bào khác nhau, nhằm tạo thành tế bào lai. Tuy nhiên, hiệu suất hợp nhất nhờ PEG thường khá thấp. Do đó, để chọn lọc được

các tế bào đã thực sự hợp nhất, các nghiên cứu sau này sử dụng môi trường chọn lọc HAT trong đó chỉ những tế bào lai mới có khả năng sống sót và phát triển [66].



Hình 1.9. Phương pháp tạo tế bào lai Hybridoma [67]

Nguyên lý của phương pháp này dựa trên đặc điểm di truyền của tế bào ung thư tủy xương (myeloma cells): chúng bị bất hoạt gen mã hóa enzym hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), một enzym thiết yếu cho con đường tái sử dụng purine (purine salvage pathway). Mặc dù không có HGPRT, các tế bào này vẫn có thể tồn tại nếu con đường tổng hợp purine *de novo* còn hoạt động. Tuy nhiên, trong môi trường chọn lọc HAT (gồm hypoxanthine, aminopterin, thymidine), aminopterin, là một chất ức chế dihydrofolate reductase (DHFR), sẽ chặn con đường *de novo* bằng cách ngăn tổng hợp nucleotide thông qua folate. Khi cả hai con đường đều bị khóa, các tế bào không có HGPRT sẽ chết. Ngược lại, nếu một tế bào lympho B sinh kháng thể bình thường (có HGPRT) được hợp nhất với tế bào myeloma, tế bào lai này sẽ có khả năng tổng hợp acid nucleic qua con đường tái sử dụng purin nhờ enzym HGPRT từ tế bào B. Nhờ đó, chỉ các tế bào lai (hybridoma) mới sống sót được trong môi trường HAT, tạo điều kiện cho việc chọn lọc dòng sản xuất kháng thể đơn dòng. Trong môi trường HAT, các tế bào u tủy không thể tồn tại do thiếu enzym HGPRT, khiến chúng không thể tổng hợp nucleotide thông qua con đường salvage và do đó không thể nhân lên. Các tế bào lách (splenocytes) nếu không được hợp nhất chỉ có khả năng tồn tại trong thời gian hữu hạn và sẽ dần chết đi do không có khả năng phân chia vô hạn. Ngược lại, các tế bào hybridoma, được tạo ra từ sự hợp nhất giữa tế bào lách và tế bào u tủy, kế thừa khả năng tổng hợp nucleotide thông qua HGPRT từ tế bào lách và tính bất tử từ tế bào u tủy, do đó là dòng tế bào duy nhất có thể sống sót và tăng sinh lâu dài trong môi trường HAT. Sau giai đoạn chọn lọc, các tế bào hybridoma được nhân dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn nhằm thu được các dòng đơn dòng có nguồn gốc từ một tế bào mẹ duy nhất. Mỗi dòng hybridoma sau đó được kiểm tra khả năng sản xuất kháng thể đặc hiệu bằng các kỹ

thuật như ELISA, dot blot miễn dịch hoặc các phương pháp sàng lọc kháng nguyên khác. Những dòng tạo ra kháng thể đơn dòng có ái lực cao, tính đặc hiệu tốt và khả năng tiết kháng thể ổn định sẽ được lựa chọn để sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo [68]. Các dòng hybridoma này có khả năng tăng sinh lâu dài trong các điều kiện nuôi cấy tế bào thích hợp. Bên cạnh phương pháp nuôi cấy *in vitro*, một chiến lược được sử dụng rộng rãi nhằm tăng hiệu suất sản xuất kháng thể là nuôi cấy hybridoma trong khoang màng bụng chuột. Khi được tiêm vào khoang phúc mạc, các hybridoma phát triển thành khối u tiết ra một lượng lớn kháng thể vào dịch báng, cho phép thu nhận kháng thể với nồng độ cao trong thời gian ngắn [69]. Song song với đó, để tối ưu hóa quá trình chọn lọc và tăng sinh hybridoma ở giai đoạn *in vitro* trước khi tạo u báng, các hệ nuôi cấy thường được hỗ trợ bằng lớp tế bào trung chuyển (feeder layer) hoặc các tác nhân kích thích tăng trưởng chuyên biệt như briclone, giúp nâng cao khả năng sống sót, ổn định dòng và hiệu quả tiết kháng thể của hybridoma [70].

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 (recombinant antibody technology) phát triển trên nền tảng hybridoma, cho phép phân lập và nhân bản các gen mã hóa vùng biến đổi của kháng thể (VH, VL) để sản xuất kháng thể tái tổ hợp dưới nhiều định dạng đa dạng như scFv (single-chain variable fragment), Fab (fragment antigen-binding) hoặc kháng thể tái tổ hợp toàn phần. Các đoạn gen này được ghép nối với nhau thông qua một đoạn nối (linker) linh hoạt để tạo thành cấu trúc scFv (single-chain variable fragment), hoặc được gắn vào khung gen mã hóa chuỗi Fc để tái tạo kháng thể toàn phần [71]. Nhờ công nghệ tái tổ hợp, các kháng thể có thể được biểu hiện hiệu quả trong nhiều hệ thống: vi khuẩn (*E. coli*), nấm men (*Pichia pastoris*), tế bào động vật có vú (HEK293, CHO) hoặc thậm chí thực vật, cho phép sản xuất số lượng lớn với tính đồng nhất cao. Đặc biệt, việc biểu hiện ở hệ thống tế bào động vật cho phép kháng thể tái tổ hợp có glycosyl hóa gần giống kháng thể tự nhiên ở người, đảm bảo hoạt tính sinh học và giảm nguy cơ sinh miễn dịch khi sử dụng điều trị [72]. Ưu điểm lớn nhất của công nghệ tái tổ hợp kháng thể là khả năng “nhân tính hóa” (humanization): vùng framework (khung) của kháng thể chuột được thay thế bằng vùng khung của kháng thể người, chỉ giữ lại các vùng CDR (complementarity determining region) đặc hiệu kháng nguyên, giúp giảm khả năng kháng thể bị hệ miễn dịch người nhận diện là “lạ”, từ đó kéo dài thời gian lưu hành kháng thể trong cơ thể và hạn chế phản ứng miễn dịch chống lại kháng thể điều trị [73]. Phương pháp này không chỉ giúp cải thiện ái lực, giảm tính sinh miễn dịch ở người, mà còn hỗ trợ sản xuất hàng loạt với chất lượng đồng nhất, tránh các hạn chế do hybridoma bị mất dòng

hoặc thay đổi đặc tính theo thời gian nuôi cấy. Công nghệ tái tổ hợp hiện đang là xu hướng tất yếu để phát triển các kháng thể thế hệ mới, phục vụ chẩn đoán sớm, theo dõi tiến triển bệnh, và đặc biệt là điều trị trúng đích ung thư bằng liệu pháp miễn dịch.

Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp: là thành quả của việc sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen kháng thể từ các tế bào lympho B, thường được sàng lọc để có tính đặc hiệu cao với một epitope nhất định của kháng nguyên. Các gen mã hóa chuỗi kháng thể sau đó được thiết kế và biểu hiện trong hệ thống nuôi cấy, nhằm tạo ra các loại kháng thể mong muốn. Hai dạng chính gồm: (1) Kháng thể đơn dòng ghép (Chimeric monoclonal antibodies): Mặc dù kháng thể chuột và người có cấu trúc tương đồng, sự khác biệt về trình tự vẫn đủ để gây ra phản ứng miễn dịch khi kháng thể chuột được tiêm vào người, dẫn đến việc hình thành anti-mouse antibodies (HAMA) và làm giảm hiệu quả điều trị [74]. Để khắc phục, các nhà khoa học đã phát triển phương pháp "ghép CDR". Trong đó, vùng nhận biết kháng nguyên (CDR) của kháng thể chuột được giữ lại, còn phần khung xung quanh được thay thế bằng trình tự gen người. Kết quả là kháng thể tạo ra vừa mang tính đặc hiệu cao của chuột, vừa ít gây phản ứng miễn dịch ở người [75]. (2) Kháng thể đơn dòng nhân tính hóa (Humanized monoclonal antibodies): Mục tiêu xa hơn của nghiên cứu kháng thể là tạo ra kháng thể gần như hoàn toàn mang đặc tính của người, nhằm giảm tối đa nguy cơ miễn dịch và tăng tính tương thích sinh học. Theo tiêu chuẩn của WHO, một kháng thể được coi là "nhân tính hóa" nếu có mức độ tương đồng $\geq 85\%$ với chuỗi kháng thể người dòng mầm, dựa trên hệ thống cơ sở dữ liệu IMGT [76].

Các công nghệ kháng thể đơn dòng mới: Bên cạnh kỹ thuật tế bào lai truyền thống, nhiều công nghệ mới đã được phát triển để tạo ra kháng thể đơn dòng, với độ chính xác và ứng dụng rộng rãi hơn. Một số kỹ thuật bao gồm: (1) Phage display: không sử dụng động vật mà sử dụng vi khuẩn và virus để biểu hiện các vùng biến đổi của kháng thể trên bề mặt phage, cho phép sàng lọc kháng thể đặc hiệu cao trong thời gian ngắn và có thể tạo thư viện kháng thể lớn [77]; (2) Nuôi cấy tế bào lympho B đơn lẻ: cho phép phân lập từng tế bào sản xuất kháng thể trong điều kiện in vitro [78]; (3) Khuếch đại tế bào đơn từ nhiều nguồn tế bào lympho B khác nhau: giúp tiếp cận đa dạng miễn dịch rộng hơn; (4) Phân tích từng tế bào plasma riêng biệt (single-cell plasma cell interrogation): cho phép truy nguyên và khai thác các tế bào tiết kháng thể hiệu quả trong các mẫu mô hoặc máu [79]. Khác với phương pháp hybridoma vốn dựa vào hợp nhất tế bào, các công nghệ hiện đại ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử, đặc biệt là PCR và công nghệ DNA tái tổ hợp, để tách và nhân bản gen kháng thể (chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) từ tế bào B, sau đó đưa chúng vào các hệ thống biểu hiện như vi khuẩn, tế bào động vật có vú, hoặc các dòng tế bào chuyên biệt khác.

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 [80], Des-gamma-carboxy prothrombin [81] và Thioredoxin [82] được sử dụng để dự đoán epitope được tham khảo trên NCBI. (Định dạng FASTA được trình bày trong Phụ lục 2)

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 ung thư biểu mô tế bào gan

- Mẫu máu của 47 bệnh nhân đã được các bác sĩ tại Khoa A3B (Nội Gan, Mật, Tụy) - Bệnh viện Trung Ương Quân đội 108 chẩn đoán xác định HCC theo tiêu chuẩn được khuyến cáo của AASLD/EASL và được phân các giai đoạn (giai đoạn sớm, giai đoạn trung gian, tiến triển và cuối) theo hệ thống BCLC, không di căn, 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 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 Viện nghiên cứu hệ gen số 06-2020/NCHG-HĐĐĐ**, ngày 12 tháng 10 năm 2020. (Phụ lục 3)

2.2. HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

2.2.1. Hóa chất và sinh phẩm nghiên cứu

- Trình tự gen *AFP*, *DCP*, *TXN* suy diễn được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics (<https://phusagenomics.com/>).

- Kháng thể: Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody-HRP (Thermo Fisher, Mỹ); Anti-alpha 1 Fetoprotein antibody [AFP-01] (Abcam, Anh); Anti-

Human PIVKA-II/DCP Monoclonal Antibody (1A301) (MyBioSource; Canada); Monoclonal Anti-TXN antibody produced in mouse (Sigma, Mỹ). (Phụ lục 4)

- Enzyme: *NdeI*, *XhoI*, T4 DNA ligase (NEB Biolabs, Anh)

- Marker ladder: M1: GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder – Thang DNA chuẩn GeneRuler 1 Kb Plus; M2: GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thang DNA chuẩn GeneRuler 100 bp; M3: PageRuler™ Prestained Protein Ladder – Thang chuẩn Protein đã nhuộm (Thermo Fisher, Mỹ) (Phụ lục 4).

- Các bộ kit: PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Mỹ); PCR Master Mix (2X), GeneJET PCR Purification Kit, HisPur™ Ni-NTA Spin Columns Kit, NAb™ Protein A/G Spin Columns Kit (Thermo Fisher, Mỹ) (Phụ lục 4)

- Vi khuẩn *Escherichia coli*: chủng BL21 (DE3) (Thermo Fisher, Mỹ)

- Tế bào Myeloma Sp2/0 Cell line: SP2/0-Ag14. Mã NSO: ATCC CRL-1581 (Thermo Fisher, Mỹ)

- Màng Nitrocellulose Membranes, 0.45 μm (Thermo Fisher, Mỹ)

- Vector: vector tách dòng pJET1.2 mang gen mục tiêu (được cung cấp bởi công ty Phù Sa); vector biểu hiện pET22b+ (Invitrogen, Mỹ)

- 1-Step™ TMB ELISA Substrate Solutions; 1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution (Thermo Fisher, Mỹ) (Phụ lục 4)

- Tá chất Freund's Complete Adjuvant (FCA) và Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) (Sigma, Mỹ)

- Hóa chất điện di DNA và protein: agarose; acrylamide; glycerol; ethidium bromide; comassie blue; APS; SDS; Tris-HCl; TEMED (Sigma, Mỹ)

- Kháng sinh: Ampicillin (Merck; Mỹ); Gentamycin; Penicillin (Sigma, Mỹ)

- Chất cảm ứng: IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (Sigma, Mỹ)

- Môi trường: LB lỏng, LB đặc (Phụ lục 4) được khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút; Môi trường DMEM, HAT, RPMI-1640 (Thermo Fisher, Mỹ)

2.2.2. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

- Kính hiển vi soi ngược (Kern, Đức)

- Tủ cấy an toàn sinh học; Tủ ấm nuôi cấy tế bào (Esco, Singapore)

- Bể ổn nhiệt (Mettler, Đức)

- Máy đo quang phổ UV-VIS; Máy ly tâm; Máy lắc tốc độ cao vortex; Máy ly tâm nhanh spindown; Máy PCR (Eppendorf - Đức)

- Bộ điện di nằm ngang trên gel agarose; Bộ điện di đứng SDS-PAGE; Bộ chuyển màng (Clever Scientific – Anh)

- Máy soi gel (UVP, Mỹ)

- Máy đọc ELISA (Awareness, Mỹ)
- Máy giải trình tự DNA tự động ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Mỹ)

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện theo trình tự như sau:

(I) Nghiên cứu *in silico*

- Dự đoán epitope liên tục và epitope không liên tục.
- Đánh giá tính kháng nguyên và các đặc tính vật lý của các đoạn peptide lựa chọn. → Chọn ra các đoạn peptide giàu epitope để tái tổ hợp.
- Thiết kế và tối ưu hóa trình tự nucleotide.

(II) Tạo dòng và biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp

- Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp.
- Biến nạp vector biểu hiện vào tế bào *E. coli*.
- Tối ưu các điều kiện biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp.
- Kiểm tra protein tái tổ hợp

(III) Tạo kháng thể đơn dòng

- Gây miễn dịch
- Tạo tế bào lai hybridoma
- Sàng lọc tế bào lai
- Tách dòng tế bào sinh kháng thể
- Nhân giống và bảo quản

(IV) Kiểm tra phản ứng miễn dịch giữa AFP/DCP/TXN trong huyết thanh các nhóm nghiên cứu với kháng thể đơn dòng tạo được.

- Thu thập mẫu theo tiêu chuẩn nghiên cứu.
- Thực hiện ELISA gián tiếp kiểm tra.
- So sánh kết quả với chẩn đoán theo bệnh án và so sánh với các kháng thể thương mại tương ứng.

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

Nghiên cứu được tiến hành bằng phương pháp tin sinh (*in silico*) để xác định các đoạn peptide chứa nhiều epitope kháng nguyên từ ba protein chỉ thị sinh học AFP, DCP, TXN. Trình tự các protein AFP, DCP, TXN được tham chiếu từ cơ sở dữ liệu NCBI làm đầu vào cho các bước phân tích tiếp theo.

Các bước phân tích chính và công cụ sử dụng bao gồm:

(1) Dự đoán epitope liên tục và epitope không liên tục: Sử dụng BepiPred 2.0 để dự đoán các epitope B tế bào liên tục trên trình tự protein. Để đảm bảo các epitope có khả năng kích thích phản ứng miễn dịch mạnh, các phân đoạn peptide được chọn phải có điểm BepiPred ≥ 0.5 , ngưỡng này cho thấy sự tương quan tốt với khả năng nhận diện kháng thể. Các peptide có điểm thấp hơn 0.5 thường không được xem là đủ khả năng gây đáp ứng miễn dịch mạnh [83].

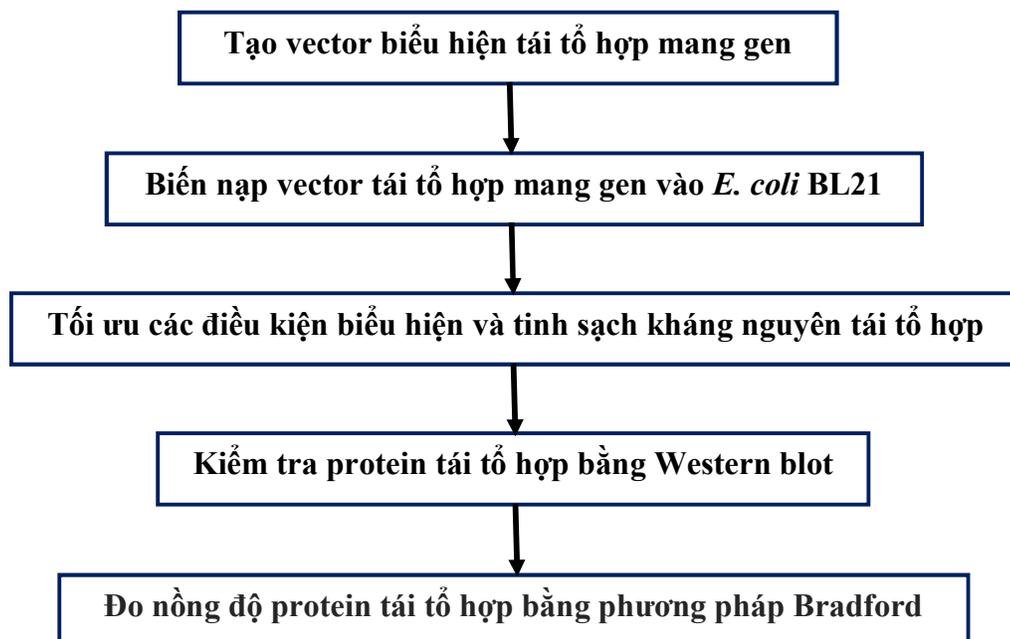
Dựa trên cấu trúc 3D của protein (thực nghiệm hoặc mô hình), sử dụng DiscoTope 2.0 để dự đoán các epitope không liên tục. Để đảm bảo tính đặc hiệu và độ tin cậy của các peptide giàu epitope. Các phân đoạn peptide cần phải có điểm DiscoTope ≥ -3.7 , ngưỡng này được chọn theo các tiêu chuẩn xác định từ nghiên cứu về tính đặc hiệu của các epitope trong các bệnh lý khác nhau, bao gồm cả HCC [84].

(2) Đánh giá tính kháng nguyên và các đặc tính lý hóa của peptide: Sử dụng VaxiJen, AntigenPro [85] để đánh giá khả năng kích hoạt đáp ứng miễn dịch (tính kháng nguyên) của các epitope được chọn. Sử dụng ExPASy [86] để tính toán các chỉ số vật lý của peptide như trọng lượng phân tử, điểm đẳng điện (pI), hệ số ổn định, nồng độ tan lý thuyết,...

(3) Thiết kế và tối ưu hóa trình tự nucleotide: Chuyển đổi trình tự axit amin của peptide chọn lọc thành trình tự nucleotide bằng phần mềm MEGA X [87]. Các trình tự nucleotide được thêm 2 điểm cắt giới hạn ở đầu và cuối trình tự là *NdeI* và *XhoI*.

2.3.2. Phương pháp tạo kháng nguyên tái tổ hợp

Phương pháp tạo kháng nguyên tái tổ hợp được tiến hành như sơ đồ sau:



*** Bước 1:** Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp mang gen

- Phương pháp cắt DNA bằng enzym cắt giới hạn

Các đoạn gen mục tiêu, sau khi được chọn lọc và thiết kế. Các trình tự gen suy diễn được gửi cho Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics, Việt Nam; sản phẩm nhận lại được giữ ở dạng plasmid là vector tách dòng pJET1.2 (Thermo Fisher, Mỹ). Plasmid được vận chuyển trong đá khô và được bảo quản dài hạn ở -80°C tại phòng Hệ Gen học Vi sinh – Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trước khi tiến hành cắt các gen mục tiêu ra khỏi vector tách dòng.

Bảng 2.1. Thành phần hỗn hợp phản ứng cắt enzyme

Thành phần phản ứng	Thể tích
Buffer 10X	2 μl
pJET1.2 mang gen mục tiêu	5 μl
<i>NdeI</i>	0.5 μl
<i>XhoI</i>	0.5 μl
Nước khử ion vô trùng	12 μl
Tổng thể tích	20 μl

Cho các thành phần phản ứng vào ống Eppendorf 1.5ml. Trộn nhẹ nhàng hỗn hợp bằng pipet và ly tâm nhanh trong 5 – 10 giây. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 4 giờ. Thu được mẫu hỗn hợp.

- Điện di trên gel agarose

Điện di bản gel trong bể chứa sẵn TAE 1X pha từ TAE 50X (Phụ lục 4). Tra 1 μl mẫu hỗn hợp với 1 μl nhuộm (1:1). Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V trong 45 phút. Nhuộm bản gel bằng ethidium bromide 2 $\mu\text{g/ml}$ trong khoảng 5- 7 phút. Chụp ảnh dưới ánh sáng tử ngoại có bước sóng $\lambda = 360 \text{ nm}$.

- Thu DNA từ gel agarose

Sử dụng bộ kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Mỹ).

- Ghép gen mục tiêu vào vector biểu hiện pET22b+

Nguyên tắc: Vector biểu hiện pET22b+ được sử dụng để biểu hiện các protein tái tổ hợp AFP, DCP và TXN nhằm làm kháng nguyên. Vector thuộc hệ pET với promoter T7, cho phép biểu hiện protein hiệu quả trong *E. coli* BL21(DE3), đáp ứng yêu cầu thu nhận lượng protein đủ lớn cho các thí nghiệm tiếp theo. pET22b+ mang His-tag ở đầu C, thuận lợi cho tinh sạch protein bằng sắc ký ái lực Ni-NTA. Hệ biểu hiện *E. coli* kết hợp với pET22b+ phù hợp với mục tiêu tạo kháng nguyên tái tổ hợp trong nghiên cứu.

Enzym T4 DNA ligase có khả năng xúc tác quá trình hình thành liên kết giữa nhóm 5'-phosphat và nhóm 3'-OH tự do, giúp gắn kết hai phân tử DNA có đầu dính bổ sung với nhau, tạo thành DNA tái tổ hợp.

Tiến hành: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng như Bảng 2.2. Trộn nhẹ nhàng tất cả hỗn hợp bằng pipet, ly tâm nhanh để hỗn hợp lắng xuống đáy ống nghiệm. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 22°C trong 5 giờ.

Bảng 2.2. Thành phần hỗn hợp phản ứng gắn gen mục tiêu vào vector biểu hiện pET22b+

Thành phần phản ứng	Thể tích
T4 ligase buffer 10X	1 µl
Vector pET22b+ đã mở vòng	1 µl
Đoạn gen cần chèn	5 µl
T4 DNA ligase	1 µl
Nước khử ion vô trùng	2 µl
Tổng thể tích	10 µl

* Bước 2: Biến nạp vector tái tổ hợp mang gen vào *E. coli* BL21

Nguyên tắc: Phương pháp biến nạp bằng sốc nhiệt là kỹ thuật phổ biến để đưa plasmid tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli* BL21. Nguyên tắc dựa trên việc làm thay đổi tính thấm của màng tế bào trong điều kiện sốc nhiệt, tạo điều kiện cho DNA plasmid xâm nhập vào vi khuẩn.

Tiến hành: Lấy 100µl tế bào khả biến *E. coli* BL21 được rã đông nhẹ nhàng trên đá lạnh trong 30 phút để duy trì tính nguyên vẹn của màng tế bào. Sau đó, thêm 5µl plasmid là vector pET22b+ đã mang gen (khoảng 100 ng DNA) được thêm vào tế bào và trộn nhẹ nhàng mà không lắc tốc độ cao để tránh làm hỏng tế bào. Hỗn hợp này tiếp tục được ủ trên đá lạnh thêm 30 phút để DNA tiếp xúc với màng tế bào trước khi thực hiện sốc nhiệt. Giai đoạn sốc nhiệt diễn ra bằng cách chuyển ống chứa tế bào vào máy Block nhiệt ở 42°C trong 90 giây. Quá trình này làm thay đổi tính thấm của màng tế bào, tạo điều kiện cho DNA plasmid xâm nhập. Ngay sau sốc nhiệt, ống được đặt trở lại đá lạnh trong 2 phút để giúp tế bào phục hồi.

Tiếp theo, bổ sung 900 µl môi trường LB không kháng sinh, ủ ở 37°C trong 60 phút với lắc nhẹ 200 vòng/phút để tế bào hồi phục và biểu hiện kháng ampicillin. Sau khi phục hồi, tế bào được cấy bằng que cấy vô trùng lên đĩa LB-agar có chứa kháng sinh ampicillin ở nồng độ 100 µg/ml. Đĩa được ủ lộn ngược ở 37°C trong khoảng 12 – 16 giờ để khuẩn lạc phát triển. Các khuẩn lạc mọc trên đĩa sẽ được kiểm tra biến nạp thành công bằng PCR plasmid.

Để chuẩn bị PCR, dịch nuôi tế bào được thu cặn, xử lý theo phương pháp ly giải kiềm bằng Sol I, Sol II, Sol III (Phụ lục 4), ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút để loại tạp chất. Mẫu tiếp tục được xử lý với RNase (37°C, 5 giờ) để loại RNA, trộn với hỗn hợp Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1), ly tâm và thu dịch trên.

DNA plasmid được kết tủa bằng sodium acetate 3M (1:10) và ethanol tuyệt đối, ủ 20°C trong 3 giờ, ly tâm, rửa bằng ethanol 70%, sau đó hòa tan trong nước khử ion 2 lần. Sản phẩm DNA thu được được kiểm tra bằng PCR sử dụng môi đặc hiệu được thiết kế qua phần mềm Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Bảng 2.3) với bộ kit PCR Master Mix (2X, Invitrogen, Mỹ) theo hướng dẫn nhà sản xuất để đánh giá sơ bộ sự hiện diện của đoạn gen biến nạp.

Bảng 2.3. Trình tự môi và chu trình chạy PCR

Môi	Trình tự						GC %																		
AFP-F	CATATGAATGATGAAAAACCCGAGG						36%																		
AFP-R	CTCGAGGTAGTACTCACCCAG						57%																		
DCP-F	CATATGGGGGATTTTGGATATTGTGA						46%																		
DCP-R	CTCGAGATCGATATAGGACTCCAG						50%																		
TXN-F	CATATGATAGAGTCAAAAACAGCATTTC AAG						41.9%																		
TXN-R	CTCGAGCGCCTCCAGCTTTT						65%																		
<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td>95°C</td> <td>95°C</td> <td>58°C</td> <td>72°C</td> <td>72°C</td> <td>4°C</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>45s</td> <td>45s</td> <td>45s</td> <td rowspan="2">3p</td> <td rowspan="2">∞</td> </tr> <tr> <td>5p</td> <td colspan="4">30 cycles</td> </tr> </table>								95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C			45s	45s	45s	3p	∞	5p	30 cycles			
	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C																			
		45s	45s	45s	3p	∞																			
5p	30 cycles																								
Chu trình chạy PCR kiểm tra môi đặc hiệu với các gen mục tiêu																									

Plasmid của các khuẩn lạc đạt tiêu chuẩn sẽ được gửi giải trình tự Sanger tại 1st BASE (Singapore) sau khi được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Trình tự môi T7 promoter thương mại là môi xuôi 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' và môi ngược 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' được cung cấp bởi 1st BASE (Singapore). Trình tự DNA trả về dưới dạng file FASTA và được phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.2 để kiểm tra và căn chỉnh sinh học.

*** Bước 3:** Tối ưu các điều kiện biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp

(1) Tối ưu các điều kiện biểu hiện protein tái tổ hợp trong hệ thống tế bào *E. coli* BL21: Chúng tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh ampicillin 100 µg/ml ở 37°C, lắc 200 vòng/ phút qua đêm. Sau đó chuyển 2% dịch tế bào nuôi cấy qua đêm vào môi trường LB lỏng mới, tiếp tục nuôi lắc ở điều kiện 37°C, 200 vòng/phút đến khi OD_{600nm} đạt 0.5 - 0.8.

Khảo sát ở các nồng độ chất cảm ứng IPTG lần lượt là: 0.05mM; 0.1mM; 0.2mM; 0.4mM; Thời gian nuôi biểu hiện lần lượt là: 9 giờ, 12 giờ, 15 giờ, 18 giờ; Nhiệt độ nuôi biểu hiện lần lượt là: 25°C, 30°C, 33°C, 37°C khác nhau để đánh giá mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp.

Tế bào *E. coli* được ly giải bằng máy siêu âm Sonicator để tách protein nội bào. Dịch nuôi tế bào được thu nhận và ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu pellet. Phần dịch nổi được loại bỏ, tế bào được hoàn nguyên trong Lysis Buffer giúp ổn định protein và giảm tương tác không đặc hiệu trong quá trình chiết. Tiếp theo, mẫu được đặt trong nước đá và xử lý bằng máy siêu âm với chu kỳ on 10 giây/off 20 giây trong tổng thời gian 3 phút. Trong quá trình sonicate đảm bảo nhiệt độ luôn được duy trì thấp để protein không bị biến tính. Sau khi phá tế bào xong, dịch được ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Dịch nổi thu được sau ly tâm chính là phần chiết chứa protein hòa tan, cặn pellet sẽ được loại bỏ. Sau đó kiểm tra các phân dịch nổi này trên gel polyacrylamide (Bảng 2.4).

Bảng 2.4. Thành phần của gel polyacrylamide

Thành phần	Gel tách 14% (µl)	Gel cô 5% (µl)
Nước	1300	680
Acrylamid 30%	2340	170
Tris-HCl 1.5M; pH = 8.8	1250	0
Tris-HCl 0.5M; pH = 6.8	0	130
SDS 10%	50	10
APS 10%	25	10
TEMED	5	1
Tổng	5000	1000

Bản gel được đổ hai lớp, lớp dưới là lớp gel tách được đổ cách mặt trên 1.5cm, để gel đông khoảng 30 phút, gắn lược rồi đổ tiếp lớp gel cô ở trên, để 15 - 30 phút cho gel đông hoàn toàn và ổn định. Bản điện di được lắp vào hệ thống điện di và chạy với 90V, 20 phút cho lớp gel cô và 110V, 120 phút cho lớp gel tách. Sau điện di, bản gel được tách khỏi phiến kính rồi nhuộm bằng Comassie Brilliant Blue R-250 trong 45 phút, sau đó bản gel được tẩy màu bằng dung dịch rửa nhuộm có chứa methanol/acid acetic.

(2) Tinh sạch: Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng hệ thống cột resin gắn nickel chuyên dùng cho các protein tái tổ hợp chứa các gốc histidine. Cột resin-nickel có ái lực cao với các protein chứa gốc 6xHistidine.

Nguyên tắc: Hoạt động của thẻ 6xHistidine (6xHis tag) với resin niken dựa trên sự phối trí giữa các nhóm imidazole của histidine và ion Ni^{2+} . Khi protein gắn 6xHis được đưa qua cột chứa Ni^{2+} , các nhóm histidine sẽ liên kết với ion kim loại này, giúp giữ protein lại trên cột. Protein không đặc hiệu sẽ bị rửa trôi, còn protein đích được tách ra bằng dung dịch imidazole nồng độ cao. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi để tinh sạch protein tái tổ hợp nhờ hiệu quả và độ chọn lọc cao [88].

Tiến hành: Trước tiên, chuẩn bị cột (có trong bộ kit Bộ kit HisPur™ Ni-NTA Spin Columns) bằng cách tháo nắp dưới của cột. Sau đó, đặt cột resin 3ml vào ống vào ống ly tâm 50ml và ly tâm ở 700 vòng/phút trong 2 phút để loại bỏ dung dịch bảo quản. Tiếp theo, tiến hành cân bằng cột bằng cách thêm 6 ml Equylibration Buffer vào cột và để dung dịch thấm hoàn toàn vào resin. Sau đó, ly tâm ở 700 vòng/phút trong 2 phút để loại bỏ dung dịch thừa. Thêm 6ml dịch nuôi tế bào biến nạp đã sonicate phá tế bào và ly tâm bỏ cặn lên cột. Trộn đều bằng cách đảo ngược nhẹ nhàng dịch nuôi với Equylibration Buffer. Để tăng hiệu suất liên kết, ủ hỗn hợp trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Cách 15 phút đảo cột 1 lần.

Sau khi tải mẫu, tiến hành rửa cột bằng cách tháo nắp dưới và đặt cột vào ống ly tâm mới, sau đó ly tâm ở 700 vòng/phút trong 2 phút để thu dịch chảy qua. Resin được rửa bằng cách thêm 6ml dung dịch rửa, tiếp tục ly tâm để thu dịch rửa. Lặp lại bước này tổng cộng 3 lần để loại bỏ các tạp chất không liên kết với resin. Cuối cùng, thực hiện rửa giải protein tái tổ hợp bằng cách thêm 3 ml Elution Buffer vào cột, ly tâm ở 700 vòng/phút trong 2 phút để thu dịch chứa protein tái tổ hợp tinh sạch. Lặp lại bước này 3 lần nữa, thu các phân đoạn rửa giải riêng biệt để đảm bảo thu được lượng protein tái tổ hợp tối đa.

Hiệu suất tinh sạch và độ tinh khiết của protein tái tổ hợp được đánh giá dựa trên phân tích định lượng kết quả SDS-PAGE sau sắc ký ái lực Ni-NTA. Mẫu protein trước tinh sạch (lysate thô), sau tinh sạch (các phân đoạn rửa giải), và mẫu chuẩn (marker) được chạy đồng thời trên gel polyacrylamide 12% để so sánh [89]. Ảnh gel được chụp và phân tích bằng phần mềm ImageJ (NIH, Hoa Kỳ). Hai chỉ số chính được xác định:

Hiệu suất thu hồi (%): Được tính bằng tỷ lệ mật độ vạch protein mục tiêu trong phân đoạn rửa giải so với mật độ vạch tương ứng trong lysate thô:

$$\text{Hiệu suất thu hồi}(\%) = \left(\frac{I_{\text{sau tinh sạch}}}{I_{\text{trước tinh sạch}}} \right) \times 100$$

I là mật độ vạch protein mục tiêu do phần mềm xác định.

Độ tinh khiết (%): Được tính bằng tỷ lệ mật độ vạch protein mục tiêu so với tổng mật độ của tất cả các vạch có trong mẫu sau tinh sạch:

$$\text{Độ tinh khiết}(\%) = \left(\frac{I_{\text{protein mục tiêu}}}{I_{\text{tổng các protein}}} \right) \times 100$$

I là mật độ vạch protein mục tiêu do phần mềm xác định.

*** Bước 4: Kiểm tra protein tái tổ hợp bằng Western blot**

(1) **Chuyển màng:** Sau khi điện di SDS-page, bản gel polyacrylamide được ủ lắc trong dung dịch đệm chuyển màng 1X transfer buffer 20 phút nhằm loại bỏ SDS còn lại trong gel. Màng nitrocellulose và miếng bọt biển (fiber pad) được làm ẩm

trong 1X transfer buffer trước khi sửa tiến hành chuyển màng. Tạo miếng Sandwich theo thứ tự chuyển màng như sau: Anode-cực dương (màu đỏ)/miếng bột biển/màng nitrocellulose/bản gel điện di SDS-PAGE chứa protein đích/miếng bột biển/Cathode-cực âm (màu đen). Đặt buồng chuyển màng vào một thùng đá lạnh đầy. Nhanh chóng đặt miếng “Sandwich” vào buồng chuyển màng, bổ sung đầy dung dịch đệm 1X transfer buffer vào bể và chạy ở 400 mA trong 2 giờ, cường độ dòng điện không đổi.

(2) *Khoá màng*: Khoá màng bằng dung dịch Blocking Buffer trong 1 giờ ở 37°C lắc nhẹ nhàng. Loại bỏ dung dịch blocking màng và rửa màng bằng dung dịch đệm rửa TBST 3 lần, mỗi lần 15 phút, lắc nhẹ nhàng qua lại.

(3) *Ủ kháng thể sơ cấp đặc hiệu với kháng nguyên*: Các kháng thể sơ cấp được sử dụng là Anti-alpha 1 Fetoprotein antibody [AFP-01] (Abcam, Anh); Anti-Human PIVKA-II/DCP Monoclonal Antibody (1A301) (MyBioSource; Canada); Monoclonal Anti-TXN antibody produced in mouse (Sigma, Mỹ) tương đương với các kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP và TXN. Màng nitrocellulose được cho vào hỗn hợp 10 ml TBS + 100µl kháng thể sơ cấp (đã pha loãng 1:100 so với kháng thể gốc) có bổ sung 5% BSA. Ủ màng với kháng thể đơn dòng sơ cấp ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Rửa màng bằng TBST 1X ba lần, mỗi lần 15 phút lắc nhẹ nhàng qua lại.

(4) *Ủ kháng thể thứ cấp cộng hợp HRP (Horseradish peroxidase)*: Pha 10 ml dung dịch TBS + 100µl kháng thể thứ cấp (đã pha loãng 1:100 so với kháng thể gốc) có bổ sung 5% BSA. Ủ màng với dung dịch kháng thể thứ cấp trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng bằng TBST 1X ba lần, mỗi lần 15 phút lắc nhẹ nhàng qua lại.

(5) *Phát hiện*: Sử dụng cơ chất phát màu 1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution. Đổ dung dịch chất phát màu ngập màng, để trong tối, đợi 30 phút. Rửa lại màng bằng PBS 1X, quan sát màu sắc trên màng và phân tích kết quả.

*** Bước 5: Đo nồng độ protein tái tổ hợp bằng phương pháp Bradford**

Cơ sở của phương pháp là dựa vào sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại của thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 khi liên kết với protein. Khi gắn kết với protein, thuốc nhuộm chuyển từ dạng nâu đỏ (hấp thụ cực đại tại 465 nm) sang màu xanh lam (hấp thụ cực đại tại 595 nm). Độ hấp thụ quang (OD) tại 595 nm phản ánh hàm lượng protein có trong mẫu.

Để xác định hàm lượng protein, đầu tiên xây dựng đường chuẩn bằng protein chuẩn Bovine Serum Albumin (BSA) trong dải nồng độ từ 0 đến 0.8 mg/ml, phù hợp với nồng độ dự kiến của các mẫu tinh sạch sau này. Mỗi phản ứng gồm: 100 µl dung dịch BSA chuẩn ở các mức: 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.6; 0.8 mg/ml; 5 ml dung dịch thuốc nhuộm Bradford (hòa tan 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 trong 50 ml ethanol 95%, thêm 100 ml phosphoric acid 85%, định mức đến 1 lít bằng nước cất). Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, lắc đều mỗi phút, sau đó đo mật độ

quang học (OD) tại bước sóng 595 nm bằng máy quang phổ UV-VIS (Eppendorf – Đức). Các giá trị để xây dựng đường chuẩn Bradford được mô tả như Bảng 2.5:

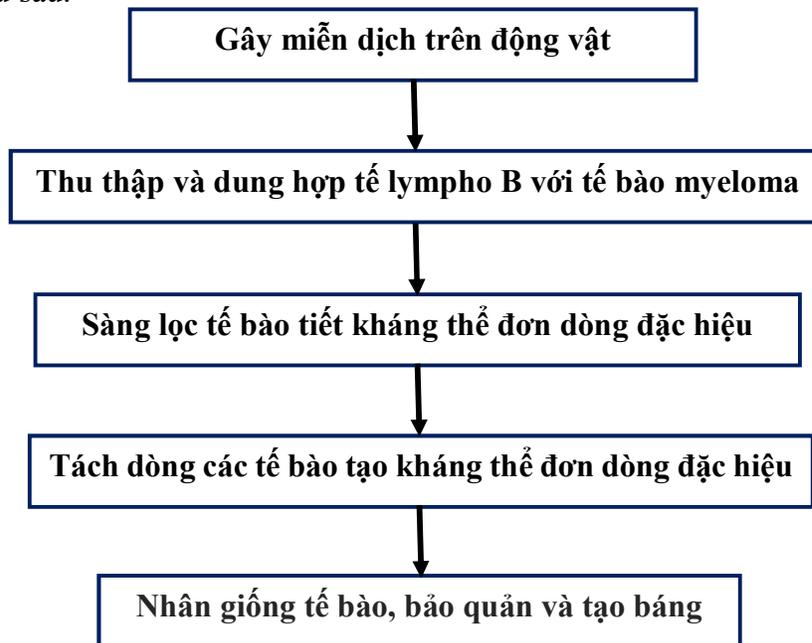
Bảng 2.5. Xây dựng đường chuẩn phát hiện màu Bradford

BSA (0.1mg/ml)(μl)	BSA (mg/ml)	H₂O (μl)	Bradford (μl)	OD_{595nm}
0	0	1000	5000	0.036
100	0.1	900	5000	0.36
200	0.2	800	5000	0.64
300	0.3	700	5000	0.95
400	0.4	600	5000	1.24
600	0.6	400	5000	1.88
800	0.8	200	5000	2.46

Các mẫu protein tinh sạch (AFP, DCP, TXN) được pha loãng thích hợp để đưa giá trị OD vào khoảng tuyến tính của đường chuẩn. Đường chuẩn có hệ số tương quan $R^2 > 0.99$, cho phép tính toán nồng độ protein bằng phương trình tuyến tính: $y = ax + b$ trong đó: x là nồng độ protein (mg/ml); y là OD của dung dịch hỗn hợp trong ống nghiệm được đo ở bước sóng 595 nm bằng máy đo quang phổ UV-VIS. a là hệ số góc (slope), thể hiện mức tăng OD khi nồng độ protein tăng 1 mg/ml. b là hệ số chặn (intercept), phản ánh OD nền khi không có protein ($x = 0$).

2.3.3. Phương pháp tạo kháng thể đơn dòng

Các bước nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng được tiến hành theo sơ đồ tổng quát như sau:



*** Bước 1: Gây miễn dịch trên động vật**

Nghiên cứu sử dụng chuột cái BALB/c thuần chủng, khỏe mạnh (16–18 g, khoảng 5 tuần tuổi), được nuôi ổn định 3 ngày trước thí nghiệm. Ba nhóm thí nghiệm được bố trí, mỗi nhóm gồm 04 chuột gây miễn dịch với một kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP hoặc TXN; 01 chuột đối chứng chung tiêm nước cất vô trùng được sử dụng cho cả ba nhóm nhằm kiểm soát các yếu tố nền trong cùng điều kiện thí nghiệm, phù hợp với mục tiêu nghiên cứu và nguyên tắc giảm thiểu động vật thí nghiệm [90, 91]. Chuột được gây miễn dịch theo lịch 3 mũi cách nhau 3 ngày (ngày 0–3–6) theo mô hình tăng cường miễn dịch nhanh (rapid immunization schedule), thường áp dụng để rút ngắn thời gian tạo dòng hybridoma nhưng vẫn đảm bảo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu [92].

- Chuẩn bị kháng nguyên: Kháng nguyên tái tổ hợp AFP/DCP/TXN thu được từ quá trình nuôi cấy và biểu hiện trên vi khuẩn *E. coli* đã tinh sạch. Pha loãng kháng nguyên AFP/DCP/TXN đến nồng độ cuối cùng là 400 $\mu\text{g/ml}$ [93] với dung dịch đệm PBS 1X vô trùng. Dung kháng nguyên đã pha loãng (400 $\mu\text{g/ml}$) để phối trộn với tá chất Freund's Complete Adjuvant (FCA) theo tỉ lệ 1:1. Hỗn hợp kháng nguyên, tá chất được trộn đều để đồng nhất hỗn dịch trong xi lanh.

- Gây miễn dịch cho chuột (Hình 2.1):



Hình 2.1. Gây miễn dịch cho chuột nghiên cứu

+ Gây miễn dịch lần 1 (priming): Chuột được gây miễn dịch lần 1 với kháng nguyên tái tổ hợp (AFP/DCP/TXN) bằng cách tiêm 50 μl kháng nguyên (pha loãng bằng PBS tới nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) đã được phối trộn với tá chất FCA theo tỉ lệ 1:1. Hỗn hợp kháng nguyên và tá chất FCA sẽ được tiêm dưới da hai bàn chân chuột [94].

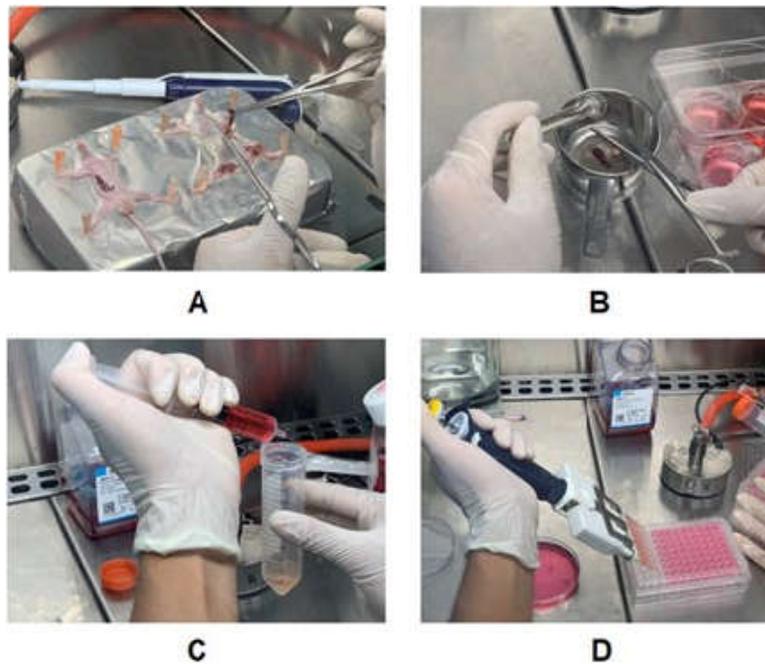
+ Gây miễn dịch lần 2 (booster 1): Sau 3 ngày gây miễn dịch lần 1, tiến hành gây miễn dịch lần 2 bằng cách tiêm 50 μl kháng nguyên tái tổ hợp (AFP/DCP/TXN) (pha loãng bằng PBS tới nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) đã được phối trộn với Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) theo tỷ lệ 1:1 dưới da hai bàn chân chuột [94].

+ Gây miễn dịch lần 3 (booster 2): Sau 6 ngày gây miễn dịch lần 1, tiến hành gây miễn dịch lần 3, tiêm nhắc lại 50 μl kháng nguyên tái tổ hợp (AFP/DCP/TXN) (pha loãng bằng PBS tới nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) đã được phối trộn với FIA theo tỉ lệ 1:1 vào dưới da hai bàn chân của chuột.

*** Bước 2: Thu thập và dung hợp tế lympho B với tế bào myeloma**

(1) *Thu thập tế bào lympho từ lách và hạch bẹn chuột*: Bốn ngày sau lần gây miễn dịch cuối cùng với FIA, chuột được gây mê bằng chloroform, sát trùng vùng bụng chuột bằng cồn 70° mở chuột để thu lấy 2 hạch bẹn và lách. Rửa lách và hạch bẹn 3 lần, mỗi lần trong 5 ml môi trường DMEM. Dùng kim G18 nghiền nhỏ hạch bẹn và lách trong đĩa petri, sau đó bổ sung 5 ml môi trường RPMI vào đĩa, trộn đều hỗn hợp vài lần để tăng hiệu quả phân tán tế bào. Dùng pipet chuyển dịch chứa tế bào lympho đi qua màng lọc để loại bỏ mảnh vụn lớn, thu dịch để ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút.

Loại bỏ dịch nổi, hoàn nguyên tế bào vào 5 ml NH_4Cl 0.85% để phá hồng cầu. Bổ sung thêm 10 ml môi trường DMEM. Ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và hoàn nguyên tế bào vào 10 ml môi trường DMEM. Ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ NH_4Cl . Loại bỏ dịch nổi và hoàn nguyên tế bào vào 10 ml môi trường DMEM.



Hình 2.2. Tách tế bào lympho B từ lách và hạch bẹn chuột

A) Thu lách và hạch bẹn của chuột; B) Nghiền nhỏ lách và hạch bẹn; C) Dung hợp tế bào lympho B bằng xúc tác PEG và bổ sung môi trường DMEM; D) Dịch huyền phù tế bào dung hợp được nuôi trong đĩa 96 giếng với HAT.

Nhuộm và đếm tế bào được thực hiện bằng cách hút 50 μl huyền phù tế bào vào ống eppendorf, bổ sung 50 μl dung dịch trypan blue và trộn đều. Sau đó, lấy 10 μl hỗn hợp cho vào buồng đếm hồng cầu và đếm dưới kính hiển vi (Hình 2.2). Các tế bào chết sẽ ngấm thuốc nhuộm và bắt màu xanh trypan blue, từ đó xác định tổng số

tế bào và tỷ lệ tế bào sống. Số lượng và tỷ lệ tế bào sống được ghi nhận để sử dụng cho bước dung hợp tạo tế bào lai trong các thí nghiệm tiếp theo. Ghi lại số lượng tế bào sống, tỷ lệ sống (%), mật độ tế bào tổng cộng để sử dụng cho bước tiếp theo trong quy trình tạo tế bào lai.

(2) *Chuẩn bị tế bào myeloma*: Phục hồi tế bào myeloma từ trạng thái đông, ống tế bào được rã đông nhanh (≤ 90 giây) ở 37°C bằng bể ổn nhiệt. Huyền dịch tế bào được chuyển sang ống falcon 15 ml có chứa sẵn 10 ml môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi chứa chất bảo quản, thu cặn tế bào và hòa lại trong 20 ml môi trường DMEM 10% FBS. Huyền dịch tế bào được chuyển vào chai nuôi cấy T75 và nuôi trong tủ 37°C , 5% CO_2 . Hàng ngày theo dõi sự phát triển của tế bào dưới kính hiển vi soi ngược. Sau khoảng 72 giờ nuôi cấy phục hồi, tế bào myeloma tăng sinh ổn định, đạt mật độ phù hợp để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Để đảm bảo sự phát triển của tế bào và có đủ số lượng phục vụ cho bước dung hợp, tiến hành nhân giống tế bào sang các chai nuôi mới như sau:

Loại bỏ môi trường cũ trong chai nuôi cấy, rửa nhẹ bằng dung dịch PBS 1X để loại bỏ cặn và tế bào chết. Do tế bào myeloma là dòng bán bám dính, nên chỉ cần lắc mạnh hoặc gõ nhẹ đáy chai là tế bào sẽ bong ra và lơ lửng trong môi trường. Bổ sung 10–15 ml môi trường DMEM có chứa 5% FBS, thu toàn bộ dịch tế bào vào ống Falcon 50 ml. Ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, hòa cặn tế bào trong 1 ml môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS.

Đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer, sau đó pha loãng để đạt nồng độ 2×10^5 tế bào/ml. Cho 20 ml huyền dịch tế bào vào mỗi chai nuôi T75 và đặt trong tủ ấm 37°C , có bổ sung CO_2 để tế bào tiếp tục phát triển.

(3) *Tạo tế bào lai hybridoma*: Chuyển huyền phù tế bào lympho và huyền phù tế bào myeloma vào ống falcon 50 ml (tỷ lệ tế bào lympho / tế bào myeloma = 5/1). Ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, tái huyền phù tế bào vào 10 ml môi trường DMEM, ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút để rửa tế bào. Loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào. Dùng xi lanh bổ sung 1 ml PEG 50% đã được làm ấm từ trước, nhỏ từng giọt một trong vòng 1 phút, vừa nhỏ vừa lắc đều ống falcon. Bổ sung 1 ml môi trường DMEM đã được làm ấm từ trước, nhỏ từng giọt một trong vòng 1 phút, vừa nhỏ vừa lắc đều ống falcon. Lắc đều ống falcon trong 1 phút. Cuối cùng bổ sung 8 ml môi trường DMEM đã được làm ấm từ trước, nhỏ từng giọt một trong vòng 2 phút. Ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và hoàn nguyên cặn tế bào vào môi trường HAT để chọn lọc các tế bào hybridoma sống sót, loại bỏ tế bào không hợp nhất. Môi trường HAT (Hypoxanthine – Aminopterin – Thymidine) được dùng ngay sau dung hợp để chọn lọc hybridoma. Sử dụng pipet đa kênh chuyển 150 μl huyền phù tế bào vào các giếng của đĩa 96 giếng. Sau 10 ngày, loại bỏ dịch nuôi

cây HAT và thêm vào mỗi giếng 150 μ l môi trường HT (môi trường HT (Hypoxanthine – Thymidine, không chứa Aminopterin) được sử dụng để duy trì hybridoma đã chọn, cung cấp nucleotide qua con đường cứu hộ mà không gây độc tính kéo dài, tạo điều kiện cho hybridoma phát triển ổn định. [95].

*** Bước 3: Sàng lọc tế bào lai có khả năng sinh kháng thể đơn dòng đặc hiệu**

Sau giai đoạn chọn lọc bằng HAT, các giếng có cụm hybridoma được chuyển sang môi trường HT và nuôi thêm 2–4 ngày để tế bào phát triển ổn định và tăng lượng kháng thể tiết vào dịch nuôi. Sau đó, thu dịch nuôi và kiểm tra khả năng tiết kháng thể bằng ELISA để sàng lọc các giếng dương tính, làm cơ sở cho bước tách dòng. Pha loãng kháng nguyên trong dung dịch Bicarbonate 0.05 M; pH 9.6 tới nồng độ 4 μ g/ml. Bổ sung 100 μ l vào mỗi giếng của đĩa ELISA. Ủ đĩa ở 37°C trong 2 giờ. Loại bỏ kháng nguyên thừa trong các giếng. Rửa các giếng bằng 200 μ l/giếng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Blocking bằng 100 μ l dung dịch 0.5% BSA ở 37°C trong 1 giờ. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 μ l dịch nuôi cấy ở các giếng có tế bào lai vào các giếng theo thứ tự và ghi lại vị trí các giếng trong đĩa nuôi cấy tương ứng, ủ đĩa 37°C trong 1 giờ. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 μ l kháng thể cộng hợp (HRP-IgG Goat anti Mouse) vào mỗi giếng. Ủ nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 μ l cơ chất (TMB), 100 μ l/giếng. Dừng phản ứng bằng 50 μ l dung dịch HCl 1M. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm. Những giếng có hiệu giá kháng thể cao sẽ cho giá trị cao, từ kết quả này chọn ra một số giếng có hiệu giá cao nhất để đánh giá tiếp.

*** Bước 4: Tách dòng các tế bào tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu**

Chuẩn bị sẵn 150 μ l môi trường DMEM vào mỗi giếng trong cột đầu tiên của đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, các giếng còn lại cho 100 μ l. Dùng pipet 200 μ l trộn đều giếng có tế bào tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu, hút 50 μ l từ giếng này sang giếng đầu tiên của đĩa tách dòng (giếng A1). Trộn đều, lấy 50 μ l từ giếng A1 sang giếng B1, rồi lần lượt đến hết các giếng trong hàng số 1 của đĩa. Dùng pipet đa kênh trộn đều dịch tế bào trong hàng đầu tiên, chuyển 50 μ l từ hàng 1 sang hàng 2. Tiếp tục trộn đều và chuyển cho đến hàng cuối cùng của đĩa. Nuôi tế bào trong tủ 37°C có bổ sung CO₂. Hàng ngày quan sát sự phát triển của tế bào. Sau 3–4 ngày tách dòng, có thể quan sát rõ các cụm tế bào trong các giếng nuôi cấy. Chọn các giếng chỉ xuất hiện một cụm tế bào (colony) đơn lẻ để thu dịch nuôi và sàng lọc khả năng tiết kháng thể bằng phương pháp ELISA với kháng nguyên đích. Sau khi sàng lọc lần đầu khoảng 24 giờ, tiến hành sàng lọc kháng thể đơn dòng với chính dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* BL21 bằng phương pháp ELISA tương tự như sàng lọc lần 1. Ở lần sàng lọc này, chỉ chọn những giếng có tế bào lai và có kết quả tốt ở lần 1. Trong quá trình bố

trí thí nghiệm ELISA, các giếng được phủ kháng nguyên đích và kháng nguyên từ dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* BL21 trên các giếng riêng biệt, nhằm đánh giá đồng thời khả năng nhận diện đặc hiệu và phản ứng chéo của kháng thể. Kháng nguyên của *E. coli* BL21 được pha loãng trong đệm Bicarbonate 0.05 M; pH 9.6 tới nồng độ 4 µg/ml. Bổ sung 100 µl vào mỗi giếng của đĩa ELISA. Ủ đĩa ở 37°C trong 2 giờ. Loại bỏ kháng nguyên thừa trong các giếng. Rửa các giếng bằng 200 µl/giếng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Blocking bằng 100 µl dung dịch 0.5% BSA ở 37°C trong 1 giờ. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 µl dịch nuôi cấy ở các giếng có tế bào lai vào các giếng theo thứ tự và ghi lại vị trí các giếng trong đĩa nuôi cấy tương ứng, ủ đĩa 37°C trong 1 giờ. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 µl kháng thể cộng hợp (HRP-IgG Goat anti Mouse) vào mỗi giếng. Ủ nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Các giếng được rửa bằng dung dịch PBS bổ sung 0.05% Tween 20, lặp lại 3 lần. Bổ sung 50 µl cơ chất (TMB), 100 µl/giếng. Dừng phản ứng bằng 50 µl dung dịch HCl 1M. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm. Các giếng cho kết quả tốt là những giếng cho hiệu giá kháng thể cao với kháng nguyên đích nhưng không đặc hiệu cho kháng nguyên *E. coli* BL21.

Phân tích tỷ lệ tín hiệu/nhiều (signal-to-noise ratio, SNR) để đánh giá tính đặc hiệu và độ nhạy của các dòng kháng thể đơn dòng tạo được [96].

Giá trị SNR được tính bằng công thức:

$$SNR = \frac{\text{Tín hiệu với kháng nguyên}}{\text{Tín hiệu nền}}$$

Trong đó, tín hiệu với kháng nguyên là giá trị OD_{450nm} đo được khi có mặt kháng nguyên AFP/DCP/TXN tái tổ hợp, và tín hiệu nền là giá trị OD_{450nm} đo được khi có mặt *E. coli* BL21.

*** Bước 5: Nhân giống tế bào lai, bảo quản và tạo băng**

Từ các giếng chứa dòng tế bào lai đã được chọn lọc, dùng pipet nhẹ nhàng hút trộn để tách tế bào bám khỏi đáy giếng, sau đó chuyển toàn bộ dịch tế bào sang đĩa nuôi 24 giếng đã chứa sẵn môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS). Nuôi tế bào trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Sau 3–5 ngày, khi mật độ tế bào đạt 90 – 100% diện tích bề mặt giếng, tiến hành cấy chuyển sang đĩa 6 giếng theo quy trình tương tự. Mỗi giếng 6 giếng được chuẩn bị sẵn 3 ml môi trường DMEM + 10% FBS. Dùng pipet trộn đều, thu toàn bộ dịch tế bào từ đĩa 24 giếng và chuyển vào đĩa 6 giếng. Tiếp tục ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 2 – 4 ngày. Khi tế bào phát triển đạt độ phủ cao, tiếp tục cấy chuyển sang chai T25 có sẵn 4 ml môi trường DMEM + 10% FBS, nuôi ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 2 – 3 ngày. Sau đó, cấy chuyển sang chai T75 (3 chai), mỗi chai chứa 15 ml môi trường DMEM + 10% FBS. Khi tế bào phủ gần toàn bộ bề

mặt chai, lắc nhẹ hoặc gõ đáy chai để tách tế bào bám, thu toàn bộ dịch nuôi vào ống Falcon 15 ml, ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, hòa lại cặn tế bào trong 1 ml DMEM + 10% FBS, đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer và điều chỉnh nồng độ về 2×10^5 tế bào/ml. Toàn bộ quy trình nuôi và cấy chuyển tế bào được thực hiện trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS nhằm đảm bảo tốc độ tăng sinh ổn định và duy trì khả năng sống cao của tế bào myeloma.

Để bảo quản được tế bào trong thời gian dài, tiến hành trữ đông giống tế bào và bảo quản trong Nitơ lỏng. Khi quan sát dưới kính hiển vi thấy tế bào đã bám 80-90% diện tích bề mặt đáy chai nuôi cấy thì tiến hành trữ đông giống tế bào.

Tạo báng để thu tế bào lai sinh kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp được nuôi cấy trước đó. Quy trình tạo báng thu kháng thể đơn dòng được tiến hành theo phương pháp mô tả bởi Köhler và Milstein (1975) [97] và hướng dẫn thực nghiệm trong *Antibodies: A Laboratory Manual* (Harlow & Lane, 1988) [98]. Các dòng tế bào được rửa bằng môi trường DMEM (2 lần). Mỗi dòng tế bào được pha loãng và đếm bằng buồng đếm hồng cầu nhằm xác định số lượng tế bào thu được trong mỗi ống. Pha loãng tế bào bằng môi trường PBS, trong đó 500 μ l chứa 2×10^6 tế bào lai (Mỗi dòng tế bào được đếm bằng buồng đếm hồng cầu để xác định mật độ tế bào. Dựa trên kết quả đếm, huyền phù tế bào được điều chỉnh bằng PBS để đạt mật độ 4×10^6 tế bào/ml, tương ứng với 500 μ l chứa 2×10^6 tế bào lai). Lấy các tế bào vào trong một ống tiêm 1 ml. Các tế bào sẽ lắng xuống, do đó, ngay trước khi tiêm chuột, cần phải “lăn” ống tiêm một thời gian ngắn để trộn đều các tế bào trong ống [99]. Lựa chọn các nhóm chuột (tương ứng với số lượng các dòng tế bào lai thu được) mỗi nhóm 5 chuột cái BALB/c khỏe mạnh 4 - 6 tuần tuổi, không mang thai để gây báng. Tiêm 0.5 ml dung dịch pristane (2, 6, 10, 14 tetramethyl pentadecane, Sigma) vào trong khoang phúc mạc ở góc phần tư phía dưới bên phải của bụng mỗi chuột. Chờ 7 - 10 ngày, sau đó tiêm 0.5 ml dòng tế bào lai chứa 2×10^6 tế bào vào khoang phúc mạc của những con chuột đã được pristane trước đó. Theo dõi chuột sau tiêm hàng ngày, quan sát và đánh giá tình trạng của mỗi chuột, ghi lại thời điểm xuất hiện báng trong xoang phúc mạc của chuột. Khi xuất hiện báng, bụng chuột căng phồng, tiến hành thu dịch báng. Gây mê chuột bằng chloroform, sau đó sát trùng bề mặt ổ bụng chuột bằng cồn 70°. Tạo một đường cắt vào khoang bụng, không làm tụt cơ, đưa ống tiêm 1 ml (không có kim) dọc theo thành cơ và hút dịch báng. Dịch được cho vào ống falcon vô trùng. Để dịch báng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm để tách huyết thanh khỏi các thành phần máu khác. Chuyển dịch màu vàng (huyết thanh) vào ống bảo quản vô trùng bằng pipet hoặc ống tiêm vô trùng.

Dung dịch báng chuột sau khi thu nhận sẽ được pha loãng thành các độ pha loãng tăng dần theo cơ số 2 (100, 200, 400, 800, 1600), mỗi độ pha loãng được lặp lại 3 lần (triplet) để đánh giá hiệu giá kháng thể bằng ELISA, giá trị OD trung bình của các lần lặp lại, giá trị độ lệch chuẩn (SD) và hệ số biến thiên (CV) được tính để đánh giá độ tin cậy của kết quả, đảm bảo độ tin cậy cho việc xác định hiệu giá kháng thể và đánh giá sơ bộ khả năng trung hòa của các kháng thể đơn dòng.

+ Độ lệch chuẩn (Standard Deviation - SD):

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Trong đó: n là số lượng giá trị trong bộ dữ liệu (số lần lặp lại n = 3); x_i là giá trị quan sát thứ i; \bar{x} là giá trị trung bình của các quan sát.

+ Hệ số biến thiên (Coefficient of Variation - CV):

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn; \bar{x} là giá trị trung bình của các quan sát.

Sau khi xác định các dòng tế bào lai có khả năng sản xuất kháng thể đơn dòng trong dịch báng chuột thu được, tiến hành bảo quản dịch báng ở -80°C cho đến thời điểm tinh sạch.

2.3.4. Tinh sạch kháng thể đơn dòng

Nguyên tắc: Protein A và Protein G là các protein liên kết đặc hiệu với vùng Fc của kháng thể (IgG), giúp tinh sạch kháng thể từ mẫu huyết thanh, dịch nuôi cấy tế bào, hoặc các nguồn khác thông qua phương pháp sắc ký ái lực (Affinity Chromatography).

Tiến hành: Các dòng tế bào hybridoma được sàng lọc dương tính (tăng sinh ổn định trong môi trường HAT và tiết kháng thể đặc hiệu qua ELISA) được nuôi cấy mở rộng nhằm thu nhận dịch nuôi chứa kháng thể. Khi tế bào đạt mật độ thích hợp, dịch nuôi được thu và ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút tại 4°C để loại bỏ tế bào và mảnh vụn tế bào. Phần dịch nổi sau đó được lọc qua màng lọc 0,22 µm nhằm loại bỏ tạp chất nhỏ, thu dịch trong, phục vụ cho các bước tinh sạch và đánh giá kháng thể tiếp theo.

Sử dụng bộ kit tinh sạch NAb™ Protein A/G Spin Columns Kit (Thermo Fisher, Mỹ). Trước tiên, cột tinh sạch cần được chuẩn bị bằng cách tháo nắp trên và dưới, sau đó đặt vào ống thu thập mẫu. Để loại bỏ dung dịch bảo quản, ly tâm cột ở 1000 vòng/phút trong 1 phút. Tiếp theo, rửa cột bằng cách thêm 400 µl Binding Buffer, ly tâm ở 1000 vòng trong 1 phút, và lặp lại bước này hai lần để đảm bảo loại

bỏ hoàn toàn chất bảo quản. Sau khi chuẩn bị cột, tiến hành bước liên kết kháng thể bằng cách pha loãng dịch nuôi chứa kháng thể với Binding Buffer theo tỷ lệ 1:1. Mẫu sau đó được thêm vào cột đã rửa sạch và đặt vào một ống thu thập mới. Ủ cột ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để kháng thể có thể liên kết với resin.

Sau thời gian ủ, ly tâm cột ở 1000 vòng/phút trong 1 phút để loại bỏ các thành phần không liên kết. Tiếp theo, rửa cột để loại bỏ các protein không đặc hiệu. Thêm 400 µl Binding Buffer vào cột và ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 1 phút. Bước này được lặp lại hai lần để đảm bảo độ tinh khiết cao nhất cho kháng thể thu được.

Để rửa giải kháng thể, đặt cột vào một ống thu thập mới đã chứa sẵn 40 µl Neutralization Buffer. Sau đó, thêm 400 µl IgG Elution Buffer vào cột và ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 1 phút để thu thập kháng thể đã rửa giải. Mẫu kháng thể tinh sạch được bảo quản ở 4°C nếu sử dụng trong thời gian ngắn hoặc ở -20°C để bảo quản dài hạn.

Bảo quản đúng sẽ giúp duy trì hoạt tính và chất lượng của kháng thể trong các ứng dụng nghiên cứu và xét nghiệm.

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

Tiến hành kiểm tra phản ứng miễn dịch giữa các chỉ thị sinh học trong huyết thanh của nhóm bệnh nhân nghiên cứu với kháng thể đơn dòng tự tạo để đánh giá hoạt tính sinh học, độ nhạy và độ đặc hiệu. Nghiên cứu được thực hiện theo các bước sau:

1. Chuẩn bị Mẫu:

- Tiêu chuẩn đối tượng lấy mẫu nghiên cứu (03 nhóm):

+ Nhóm 1: *Tiêu chuẩn lựa chọn* gồm các bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc HCC theo hồ sơ bệnh án, tuổi ≥ 18 , có đầy đủ thông tin lâm sàng, cận lâm sàng và mẫu huyết thanh phục vụ nghiên cứu, và đồng ý tham gia nghiên cứu. *Tiêu chuẩn loại trừ* gồm các bệnh nhân nặng đang trong điều kiện cấp cứu; các bệnh nhân mắc HCC đã phẫu thuật và/hoặc điều trị bằng các thuốc chống ung thư, và có bệnh lý ung thư tại cơ quan khác; hoặc không có sự đồng ý tham gia nghiên cứu.

+ Nhóm 2: *Tiêu chuẩn lựa chọn* gồm bệnh nhân mắc bệnh gan mạn tính (viêm gan virus mạn, xơ gan,...) nhưng không có đủ tiêu chuẩn chẩn đoán HCC. *Tiêu chuẩn loại trừ* là bệnh nhân mà trong quá trình sàng lọc phát hiện có HCC hoặc ung thư khác, hoặc không đồng ý tham gia nghiên cứu.

+ Nhóm 3: *Tiêu chuẩn lựa chọn* là người trưởng thành khỏe mạnh, không có tiền sử bệnh gan hoặc bệnh mạn tính nghiêm trọng, kết quả kiểm tra lâm sàng và cận lâm sàng nằm trong giới hạn bình thường, và đồng ý tham gia nghiên cứu.

cứu. *Tiêu chuẩn loại trừ* là những người có dấu hiệu bất thường hoặc kết quả xét nghiệm, chẩn đoán hình ảnh gợi ý bệnh lý gan mật, người có bệnh lý gan cấp/mạn tính, hoặc không đồng ý tham gia nghiên cứu.

- Thu thập và xử lý mẫu: Các mẫu máu tĩnh mạch được thu thập theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện, tức là lựa chọn những đối tượng theo tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ đến khám tại Khoa Khám bệnh và điều trị tại Khoa A3B (Nội Gan, Mật, Tụy) - Bệnh viện Trung Ương Quân đội 108, từ tháng 6 năm 2023 đến tháng 6 năm 2024. Mỗi đối tượng được lấy khoảng 5 ml máu tĩnh mạch bằng bơm kim tiêm vô trùng, cho vào ống nghiệm sạch và để tự đông máu. Mẫu máu sau đó được bảo quản tạm thời ở 4°C và chuyển đến phòng thí nghiệm thuộc Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam để xử lý trong vòng 48 giờ. Quá trình xử lý bao gồm ly tâm máu để tách lấy huyết thanh (ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút) và thu phần huyết thanh. Huyết thanh thu được được chia vào các ống nhỏ và bảo quản ở 4 - 8°C nếu dự kiến phân tích trong vài ngày, hoặc đông lạnh ở nhiệt độ âm sâu (-20°C đến -80°C) nếu cần lưu trữ lâu dài. Toàn bộ quy trình thu thập và bảo quản mẫu tuân thủ chặt chẽ các quy chuẩn nhằm đảm bảo chất lượng mẫu huyết thanh, phục vụ cho việc phân tích các kháng thể đơn dòng trong nghiên cứu phát hiện HCC.

2. Tiến hành thí nghiệm:

- Kỹ thuật được sử dụng để kiểm tra phản ứng miễn dịch giữa AFP/DCP/TXN trong huyết thanh các nhóm nghiên cứu với kháng thể đơn dòng là kỹ thuật ELISA gián tiếp được tối ưu hóa để phát hiện kháng nguyên trong mẫu huyết thanh.

- Các bước tối ưu được thực hiện với từng loại nguyên liệu trong phản ứng:

+ Chuẩn độ kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng tạo được: Nồng độ kháng nguyên tái tổ hợp rAg-AFP/DCP/TXN sau khi tinh sạch được coi là đối chứng dương và được pha loãng trong đệm bicarbonate ở các tỷ lệ pha loãng nối tiếp là 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 và 1:128. Kháng thể đơn dòng mAb-AFP/DCP/TXN được pha loãng trong đệm pha loãng ở các tỷ lệ 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 và 1:512.

+ Tối ưu các thành phần của phản ứng: Xác định tỷ lệ huyết thanh pha loãng trong PBS; Tỷ lệ đệm blocking BSA hòa tan trong PBS; Kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột (H+L) gắn HRP được pha loãng.

- Quy trình thực hiện được tham khảo của tác giả Alice V. Lin năm 2015 được đăng trong cuốn sách Indirect ELISA [100]. Các bước thực hiện phản ứng ELISA được mô tả chi tiết như sau: Huyết thanh bệnh nhân được pha loãng trong đệm bicarbonate 0.2 M ở pH 9.4 theo tỷ lệ 1:1. Cố định 100 µl huyết thanh bệnh nhân các vị trí trên bề mặt giếng của đĩa ELISA (Costar Assay Plate, 96 Well, Corning, Mỹ).

Ủ 4°C qua đêm. Loại bỏ huyết thanh thừa bằng cách thêm 300 µl/giếng dung dịch PBS + 0.05% Tween 20 (lặp lại 3 lần). Khóa màng bằng 200 µl/giếng dung dịch blocking buffer, ủ tại 37°C trong 1 giờ. Loại bỏ dung dịch BSA blocking thừa và rửa các giếng bằng cách thêm 300 µl/giếng dung dịch PBS + 0.05% Tween 20 (lặp lại 3 lần). Bổ sung 100 µl kháng thể đơn dòng, ủ ở 37°C trong 1 giờ. Loại bỏ kháng thể đơn dòng thừa bằng 300 µl/giếng dung dịch PBS + 0.05% Tween 20 (lặp lại 3 lần). Bổ sung 100 µl kháng thể cộng hợp HRP, ủ tại 37°C/1 giờ. Loại bỏ kháng thể cộng hợp thừa bằng 300 µl/giếng dung dịch PBS + 0.05% Tween 20 (lặp lại 3 lần). Bổ sung 100 µl cơ chất phát màu TMB substrate (Life Science Technology, Mỹ), ủ trong tối 10 phút. TMB đã được đặt ổn định nhiệt độ phòng trước 30 phút. Dừng phản ứng bằng cách thêm 100 µl dung dịch HCl 1M vào mỗi giếng. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA (Biotek ELX808 ELISA plate reader, Biotek, Mỹ) ở bước sóng 450 nm.

Số lần lặp lại phản ứng ELISA: Để đảm bảo độ chính xác và độ tin cậy của kết quả, mỗi mẫu trong phương pháp ELISA sẽ được xét nghiệm ít nhất ba lần lặp lại (triplet), trong đó mỗi lần lặp sẽ là một phép đo riêng biệt. Điều này giúp đảm bảo tính ổn định và sự chính xác của kết quả thử nghiệm.

Các mẫu sẽ được kiểm tra với đối chứng dương và âm. Đối chứng dương được sử dụng là các kháng thể thương mại đặc hiệu cho AFP, DCP và TXN, với các thông tin về nhãn hiệu và nguồn gốc của kháng thể được trình bày trong Phụ lục 4. Đối chứng âm sử dụng mẫu huyết thanh từ người khỏe mạnh không mắc ung thư gan, nhằm loại trừ tất cả các trường hợp âm tính giả.

Trong các xét nghiệm lâm sàng việc xác định được ngưỡng phát hiện (cut-off value) đáng tin cậy là hết sức quan trọng để phân biệt giữa những người nhiễm bệnh và không nhiễm bệnh. Ngưỡng phát hiện tối ưu trong xét nghiệm ELISA được xác định bằng giá trị OD_{450nm} của các mẫu huyết thanh âm tính độc lập (đối chứng âm độc lập) đã được xác định. Công thức chung được giới thiệu bởi Lardeux (2016) [101] có dạng:

$$\text{Cut-off value} = \bar{X} + f \cdot SD$$

Trong đó: \bar{X} là giá trị trung bình mẫu, SD là độ lệch chuẩn của đối chứng âm độc lập, hệ số $f = 3$ được lựa chọn như một giá trị tương ứng với 3 lần độ lệch chuẩn ($3 \cdot SD$), tương đương mức tin cậy cao (99.7%) theo phân phối chuẩn, nhằm đảm bảo ngưỡng cut-off loại trừ tối đa các giá trị âm tính giả. Do đó công thức được sử dụng có dạng như sau:

$$\text{Cut-off value} = \bar{X} + 3 \cdot SD$$

Trong xét nghiệm ELISA, việc dựng đường cong chuẩn (standard curve) là một bước quan trọng để xác định nồng độ của mẫu chưa biết. Điều này giúp đảm bảo kết quả chính xác, đáng tin cậy và có thể tái lập. Luận án sử dụng mô hình logistic 4 tham số (4PL - Four Parameter Logistic Regression) nhằm kiểm soát chất lượng và

độ chính xác. Đường cong chuẩn được thực hiện dựa trên protein tái tổ hợp đã biết nồng độ.

Sau đó, sử dụng Python với các lệnh **numpy** (tạo thư viện số), **pandas** (xử lý số liệu bảng), **matplotlib.pyplot** (tạo đồ thị), **scipy.optimize.curve_fit** (tìm hàm cho công thức) để tìm ra giá trị với công thức:

$$OD = D + \frac{A-D}{1 + \left(\frac{Conc}{C}\right)^B}$$

Trong đó:

- OD: giá trị OD đo được của mẫu cần phân tích
- Conc: nồng độ của mẫu cần phân tích
- A: OD tối đa (OD max) – giá trị OD khi nồng độ cao nhất
- B: Độ dốc (Slope) – quyết định độ dốc của đường cong.
- C: EC₅₀ (Half-maximal effective concentration) – nồng độ tại đó OD đạt 50% giá trị tối đa.
- D: OD tối thiểu (OD min) – giá trị OD khi nồng độ gần bằng 0

Để xác định giá trị EC₅₀ của kháng thể đơn dòng, các phản ứng ELISA gián tiếp được thực hiện với các nồng độ kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP, TXN tinh sạch, được pha loãng theo dải nồng độ rộng. Mỗi thí nghiệm gồm 6 mức nồng độ kháng nguyên, trải đều trong khoảng tuyến tính của đường cong đáp ứng. Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần độc lập để tăng độ tin cậy và giảm sai số. Như vậy, tổng số 18 điểm dữ liệu cho mỗi đường cong EC₅₀ được sử dụng trong tính toán.

AUC (Area Under the Curve) là diện tích dưới đường cong có ý nghĩa trong việc đánh giá tổng quan về độ nhạy của phương pháp đo. Trong mô hình này, giá trị của AUC có thể tính toán thông qua việc tính diện tích dưới đường cong từ nồng độ thấp nhất (Conc = 0) đến nồng độ cao nhất. AUC được tính bằng cách sử dụng công cụ Python với thư viện **scipy.integrate.quad**.

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 VÀ BÀN LUẬN

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

+ AFP: Protein AFP bao gồm 609 axit amin (aa). Kết quả dự đoán epitope bằng BepiPred 2.0, ngưỡng (threshold) là 0.5 được trình bày trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Các đoạn epitope tiềm năng của AFP

Epitope	Vị trí	Trình tự peptide	Số aa	Điểm BepiPred
E1	17–39	ESRTLHRNEYGIASILDSYQCTA	23	0.52
E2	57–65	EATYKEVSK	9	0.58
E3	77–89	PTGDEQSSGCLN	13	0.55
E4	103–120	EILEKYGHSDCCSQSEEG	18	0.56
E5	129–147	KKPTPASIFLQVPEPVTS	19	0.60
E6	152–157	EEDRET	6	0.53
E7	206–215	AATVTKELRE	10	0.59
E8	229–233	NFGTR	5	0.50
E9	249–254	KVNFTE	6	0.55
E10	293–298	DTLSNK	6	0.54
E11	319–342	NDEKPEGLSPNLNRFLGDRDFNQF	24	0.67
E12	360–367	RRHPQLAV	8	0.64
E13	388–410	ENPLECQDKGEEELQKYIQESQA	23	0.65
E14	419–426	FQKLGEYY	8	0.62
E15	437–446	KKAPQLTSSE	10	0.56
E16	463–469	QLSEDKL	7	0.52
E17	488–496	HEMTPVNPG	9	0.53
E18	503–548	SSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFSDD KFIFHKDLCQAQGVALQTM	46	0.51
E19	558–568	KQKPQITEEQL	11	0.54
E20	586–594	QEQEVCFAE	9	0.57
E21	596–601	GQKLIS	6	0.55

AFP là một protein nội sinh và có biểu hiện chủ yếu ở giai đoạn bào thai, do đó thường bị cơ thể trưởng thành dung nạp miễn dịch, dẫn tới tính sinh miễn dịch thấp. Vì vậy, việc sử dụng ngưỡng 0.5, là cần thiết để không bỏ sót các vùng có tiềm năng epitope thấp nhưng vẫn có thể gắn kết kháng thể. Kết quả dự đoán cho thấy AFP

có tổng cộng 21 đoạn epitope với độ dài dao động từ 5 đến 24 aa. Các epitope nổi bật như, E11 (319–342), E12 (360–367), E13 (388–410) và E14 (419–426), đều có điểm BepiPred cao (từ 0.62 đến 0.67). Điều này cho thấy khả năng miễn dịch tương đối tốt và sẽ được ưu tiên trong thiết kế kháng nguyên tái tổ hợp vì vừa dài vừa có điểm trung bình cao.

+ DCP: Protein DCP bao gồm 622 axit amin. Kết quả dự đoán epitope bằng BepiPred 2.0 ở ngưỡng là 0.5 và được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Các đoạn epitope tiềm năng của DCP

Epitope	Vị trí	Trình tự peptide	Số aa	Điểm BepiPred
E1	28-46	FLAPQQARSLLRVRRANT	19	0.50
E2	49-81	EEVRKGNLERECVEETCSYEEAFEALE SSTATD	33	0.58
E3	90-105	CETARTPRDKLAACLE	16	
E4	123-165	TRSGIECQLWRSRYPHKPEINSTTHPGA DLQENFCRNPDSSTT	43	0.60
E5	171-192	TTDPTVRRQECSIPVCGQDQVT	22	0.54
E6	195-270	MTPRSEGSSVNLSPPLEQCVPDRGQQY QGRLAVTTHGLPCLAWASAQAKALSK HQDFNSAVQLVENFCRNPDGDEE	76	0.59
E7	281-361	GDFGYCDLNYCEEAVEEETGDGLDED SDRAIEGRTATSEYQTFNPRTFGSGEA DCGLRPLFEKKSLEDKTERELLESYID	81	0.63
E8	410-419	YPPWDKNFTE	10	0.50
E9	432-439	TRYERNIE	8	0.53
E10	450-460	HPRYNWRENLD	11	0.56
E11	486-494	RETAASLLQ	9	0.50
E12	508-521	KETWTANVGKGQPS	14	0.52
E13	533-539	RPVCKDS	7	0.55
E14	554-567	KPDEGKRGDACEGD	14	0.54
E15	590-598	WGEGCDRDG	9	0.51
E16	610-618	KKWIQKVID	9	0.55

DCP là dạng bất thường của prothrombin thiếu carboxyl hóa, có thể mang nhiều epitope lộ ra do cấu trúc không hoàn chỉnh hoặc thay đổi hình học bề mặt, tạo thuận lợi cho kháng thể nhận diện. Dù là protein huyết tương lớn, các đoạn epitope lại phân bố tương đối đều dọc theo chuỗi, cho thấy tính kháng nguyên trải rộng, đặc biệt có lợi khi thiết kế các bộ kit chẩn đoán ELISA hoặc kháng nguyên tái tổ hợp. Kết quả tổng cộng có 16 epitope được dự đoán, trong đó E7 (281–361) là đoạn dài và

giàu thông tin miễn dịch nhất với điểm BepiPred là 0.63. Vị trí 281–361 nằm gần trung tâm phân tử DCP (Trung tâm cấu trúc protein thường là vùng ổn định về mặt cấu hình, giúp kháng nguyên không bị mất epitope trong quá trình biểu hiện hoặc xử lý mẫu) [102], tránh các vùng đầu hoặc cuối chuỗi để biến đổi.

+ TXN: Từ phân tích với BepiPred 2.0 với ngưỡng là 0.6, chọn những epitope ≥ 10 aa được lựa chọn và giữ lại epitope có điểm BepiPred ≥ 0.65 để từ đó đã chọn được 2 đoạn epitope tiềm năng. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Các đoạn epitope tiềm năng của TXN

Epitope	Vị trí	Trình tự peptide	Số aa	Điểm BepiPred
E1	5-14	IESKTAFAQEA	10	0.72
E2	84-99	QKVGEGFSGANKEKLEA	16	0.68

TXN là protein nhỏ (105 aa), dễ biểu hiện, có tính bảo tồn cao, và có cấu trúc đơn giản, không xuyên màng. Việc lựa chọn ngưỡng cao hơn (0.6) phản ánh mục tiêu lọc bỏ epitope giả do TXN dễ cho tín hiệu nền cao trong các phần mềm dự đoán. Các epitope nổi bật có điểm > 0.65 đều nằm ở vị trí thuận lợi trên chuỗi, có nhiều axit amin tích điện (Glu, Lys, Asp), thể hiện tính chất bề mặt cao, dễ nhận diện bởi kháng thể. Trong đó, E1 nằm gần đầu N-terminal, còn E2 thuộc về vùng C-terminal giữa chuỗi, nơi thường có khả năng tiếp xúc với môi trường ngoại bào nhiều hơn.

3.1.1.2. Dự đoán epitope không liên tục

+ AFP: Cấu trúc tinh thể ba chiều của protein AFP (Alpha-fetoprotein) đã được công bố và lưu trữ trên cơ sở dữ liệu Protein Data Bank với mã số PDB ID: 7YIM, có độ phân giải 2.1 Å. Mô hình này mô tả rõ ba miền cấu trúc dạng xoắn alpha đặc trưng của AFP người trưởng thành và là cơ sở quan trọng để dự đoán epitope không liên tục [103]. Dựa trên mô hình 7YIM, cấu trúc bề mặt AFP được phân tích bằng phần mềm Discotope 2.0 nhằm xác định các vùng có tiềm năng tạo epitope không liên tục. Các epitope dự đoán tập trung chủ yếu tại các vùng giàu xoắn alpha lộ ra bề mặt, phù hợp với vị trí thường gắn kết của kháng thể. Kết quả này bổ sung cho các epitope liên tục được xác định từ trình tự bằng BepiPred 2.0, giúp chọn lọc các đoạn peptide phù hợp nhất cho thiết kế kháng nguyên tái tổ hợp. Toàn bộ 577 axit amin đã được mô hình hóa, trong đó mô hình 3D được xuất dưới định dạng .pdb và nhập vào Discotope 2.0 để tiến hành dự đoán epitope không liên tục. Discotope sử dụng ngưỡng là -3.7, tương ứng với độ đặc hiệu 75% và độ nhạy 47%. Ngưỡng này làm giảm tổng số epitope được phát hiện (tức giảm độ nhạy), nhưng lại giúp tăng độ tin cậy, nghĩa là phần lớn các epitope được dự đoán sẽ tương đương thực tế trong điều kiện sinh học [104].

Phân tích bằng Discotope 2.0, 12 axit amin được xác định có điểm số trên ngưỡng -3.7 và do đó được xem là có khả năng tham gia vào epitope không liên tục. Các axit amin này chủ yếu phân bố tại hai vùng không gian gần nhau trên bề mặt protein. Vùng 1: từ aa 321 đến 340; Vùng 2: từ aa 387 đến 391. Những axit amin này không nằm liền kề nhau trong trình tự, nhưng khi được gấp khúc trong không gian 3 chiều, chúng tạo thành một cụm bề mặt tiềm năng cho kháng thể gắn kết, đây là đặc trưng điển hình của epitope không liên tục [105] (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Epitope không liên tục của protein AFP dự đoán bởi Discotope 2.0

Vị trí	aa	Điểm Discotope	Vùng
321	K	-2.956	1
323	E	0.592	
324	G	-1.064	
325	L	-1.933	
326	S	-0.971	
327	P	-2.946	
330	N	-3.414	
336	R	-3.345	
340	Q	-3.532	
387	E	-1.426	2
388	N	-2.927	
391	E	-3.186	

+ DCP: Để dự đoán các epitope không liên tục của protein DCP, nghiên cứu đã tham chiếu với cấu trúc tinh thể 6BJR, là dạng đột biến S101C/A470C của prothrombin người, được xác định bằng phương pháp tán xạ tia X (X-ray diffraction). Chuỗi axit amin của 6BJR có độ tương đồng lên tới 99% với protein DCP, do đó có thể được xem là khuôn cấu trúc tin cậy, đại diện cho DCP trong các phân tích dựa trên không gian ba chiều.

Ngưỡng sử dụng là -3.7, tương ứng với độ nhạy 0.47 và độ đặc hiệu 0.75. Điều này có nghĩa: 75% các axit amin không phải epitope sẽ được loại bỏ, giúp giảm tỷ lệ dương tính giả. Tuy nhiên, chỉ 47% các epitope thực sự có thể được phát hiện, tức là giảm độ nhạy, đây là phương pháp phổ biến để tăng độ tin cậy khi xác định vị trí gắn kết kháng thể thực tế trên bề mặt protein [106].

Dự đoán bằng Discotope 2.0, kết quả thu được 70 axit amin có điểm Discotope lớn hơn -3.7, các axit amin này được xem là các epitope không liên tục (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Epitope không liên tục của protein DCP dự đoán bởi Discotope 2.0

Vị trí	aa	Điểm Discotope	Vị trí	aa	Điểm Discotope
126	G	-2.398	321	Q	-2.419
127	I	-2.314	322	T	-2.224
141	E	-2.757	345	K	-2.48
143	N	-3.528	346	S	-2.449
145	T	-2.474	350	K	-2.883
146	T	-2.299	353	R	-3.672
173	D	-2.678	361	D	-3.233
174	P	-3.207	366	E	-2.813
175	T	-0.782	369	D	-2.909
176	V	-1.014	385	S	-2.857
177	R	-1.358	386	P	-2.651
197	P	-2.248	411	P	-2.752
198	R	-2.364	414	D	-2.014
199	S	-0.631	416	N	-2.878
200	E	-0.28	430	S	-3.657
201	G	-0.801	432	T	-2.377
202	S	-1.613	433	R	-0.493
203	S	-2.063	434	Y	-1.568
204	V	-0.741	435	E	-2.96
205	N	-0.783	436	R	-0.184
206	L	-3.55	437	N	-1.124
207	S	-3.29	456	R	-1.963
208	P	-3.26	515	V	-2.617
248	H	-2.21	516	G	-2.006
250	D	-2.299	538	D	-3.368
251	F	-3.609	541	R	-1.056
252	N	-1.015	543	R	-3.358
300	G	-1.74	556	D	-2.496
301	D	-1.685	557	E	-0.175
309	R	-1.957	558	G	-0.666
311	I	-1.234	559	K	-2.705
312	E	-2.457	598	G	-3.127
313	G	-3.089	621	G	-3.414
314	R	-2.542	624	L	-2.078
315	T	-2.562	625	E	-0.915

Các epitope này phân bố rải rác khắp chiều dài chuỗi protein, nhưng đáng chú ý là tập trung thành từng cụm liên tục, gồm các chuỗi: Vị trí 173–177 (5 aa); Vị trí 197–208 (12 aa); Vị trí 311–315 (5 aa); Vị trí 432–437 (6 aa); Vị trí 556–559 (4 aa). Các chuỗi này là epitope không liên tục, rời rạc về cấu trúc sơ cấp nhưng gần nhau trong không gian ba chiều, tạo nên vùng gắn kháng thể liên tục trên bề mặt. Các cụm epitope không liên tục này đều nằm trùng trong các vùng đã được dự đoán là epitope liên tục bởi BepiPred 2.0 (Bảng 3.2), bao gồm các peptide: E5 (171–192): trùng với vùng 173–177; E6 (195–270): trùng với vùng 197–208; E11 (311–342): trùng với vùng 311–315; E9 (432–439): trùng với vùng 432–437; E14 (554–567): trùng với vùng 556–559. Kết quả này khẳng định độ tin cậy của các epitope được lựa chọn. Những vùng này có thể được khai thác ưu tiên trong các ứng dụng miễn dịch học, đặc biệt là trong phát triển chẩn đoán sớm HCC dựa trên chỉ thị DCP.

+ TXN: Dự đoán bằng Discotope 2.0, sử dụng mô hình cấu trúc bậc ba của TXN từ cơ sở dữ liệu PDB (mã 1ERT hoặc tương đương) và ngưỡng là -3.7 (tương ứng đặc hiệu 75%, độ nhạy 47%).

Kết quả cho thấy chỉ có ba axit amin có điểm Discotope cao nhất, nhưng đều thấp hơn ngưỡng -3.7, thể hiện trong Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Epitope không liên tục của protein TXN dự đoán bởi Discotope 2.0

Vị trí	aa	Điểm Discotope
47	E	-8.973
50	S	-8.666
95	E	-8.913

Kết quả trên cho thấy, không có epitope không liên tục đáng tin cậy nào được dự đoán, điều này hoàn toàn phù hợp với đặc điểm là protein nhỏ, cấu trúc gấp chặt, không bộc lộ bề mặt liên tục. Trong khi đó, kết quả từ BepiPred 2.0 (Bảng 3.3) xác định được hai epitope liên tục (E1 và E2) có điểm cao và vị trí thuận lợi, phù hợp với các ứng dụng kỹ thuật miễn dịch dựa trên peptide liên tục. TXN do đó được chọn khai thác dưới dạng epitope liên tục, hơn là epitope không liên tục.

3.1.1.3. Kết quả lựa chọn đoạn peptide giàu epitope

Từ 2 công cụ dự đoán epitope là BepiPred 2.0 và DiscoTope 2.0, các đoạn peptide được chọn từ 3 trình tự gốc đã được chọn để làm protein tái tổ hợp phục vụ nghiên cứu.

+ Đoạn peptide AFP gồm 108 axit amin ở vị trí 319 đến 426 so với trình tự gốc. Các epitope liên tục từ E11 – E14 (theo kết quả BepiPred) và các epitope không liên tục tập trung quanh vùng E11 và E13 (theo kết quả Discotope) cho thấy AFP có một cụm epitope miễn dịch tiềm năng cho thiết kế kháng nguyên tái tổ hợp.

+ Đoạn peptide DCP gồm 81 axit amin ở vị trí 281 đến 361 (epitope E7) so với trình tự gốc được chọn, là epitope liên tục có chiều dài lớn nhất, đồng thời có điểm BepiPred trung bình 0.63, vượt mức ngưỡng 0.5 đáng kể. Phân bố nhiều vùng điểm cao liên tiếp, cho thấy khả năng mang nhiều epitope cận nhau, tạo nên cụm epitope (Cụm epitope liên tục như vậy có thể tạo thành một vùng bề mặt rộng, giúp tăng độ nhạy khi làm kháng nguyên phủ trong ELISA) [107].

+ Đoạn peptide TXN gồm 95 axit amin ở vị trí 5 đến 99 so với trình tự gốc. Khi lấy toàn bộ đoạn từ aa 5 đến 99 sẽ bao phủ toàn bộ hai vùng epitope chính (E1, E2). Đồng thời giữ nguyên khoảng cách, cấu trúc giúp bảo toàn hoạt tính kháng nguyên, và cũng tránh được các vùng đầu và cuối dễ bị cắt/biến tính trong quá trình xử lý mẫu hoặc biểu hiện [108]. Phần lớn vùng từ aa 5–99 nằm ở lõi cấu trúc protein TXN, nơi ổn định hơn về mặt cấu hình, ít bị ảnh hưởng bởi biến tính khi xử lý mẫu, bộc lộ tốt các epitope bề mặt thực tế mà không cần cấu trúc gấp hoàn chỉnh [109]. Điều này đặc biệt quan trọng trong ELISA hoặc khi dùng để sàng lọc kháng thể đơn dòng. Kích thước 95 aa, tương đương khoảng 10 kDa, cũng là lý tưởng cho tái tổ hợp kháng nguyên [110]. Trình tự protein được chọn thể hiện đầy đủ ở Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Trình tự protein được chọn của AFP, DCP, TXN

Kí hiệu protein	Vị trí	Số aa	Trình tự lựa chọn
P-AFP	319-426	108	NDEKPEGLSPNLNRFLGDRDFNQFSSGEKNIFLA SFVHEYSRRHPQLAVSVILRVAKGYQELLEKCF QTENPLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGL FQKLGEYY
P-DCP	281-361	81	GDFGYCDLNYCEEAVEEETGDGLDESDRAIEG RTATSEYQTFNPRTFGSGEADCGLRPLFEKKS EDKTERELLESYID
P-TXN	5-99	95	VKQIESKTAHQEALDAAGDKLVVVDIFSATWCGP CKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAP KYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSQKGLKEF LDANLA

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

Hai công cụ VaxiJen 2.0 và AntigenPro, mang tính độc lập nhưng bổ sung lẫn nhau, được sử dụng để xác định tiềm năng kháng nguyên của các đoạn protein đã chọn (P-AFP, P-DCP, P-TXN). Hai công cụ này đều được sử dụng ngưỡng 0.4 - 0.5, là thước đo tiêu chuẩn trong nhiều nghiên cứu về thiết kế vaccine hoặc phát triển kháng nguyên tái tổ hợp nhằm đảm bảo độ tin cậy và khả năng ứng dụng thực tế [111].

+ VaxiJen 2.0 (chế độ Khối u (Tumor), Ngưỡng = 0.4 - 0.5)

P-AFP: 0.3207 (< 0.4): Chưa đạt ngưỡng nhưng đây là mô hình dùng cho khối u nên nghiêng về giá trị cảnh báo khối u. P-DCP: 0.3995: gần đạt mức ngưỡng, cho thấy khả năng kháng nguyên ở mức trung bình cao. P-TXN: 0.7091 (> 0.5): Nhận định đây là kháng nguyên mạnh, phù hợp để phát triển kháng thể hoặc ứng dụng ELISA với mục tiêu HCC.

+ AntigenPro (chế độ Khối u, Ngưỡng = 0.5)

P-AFP: 0.654858 (> 0.5): Trên ngưỡng, cho thấy khả năng kháng nguyên ở mức cao, trái ngược với kết quả từ VaxiJen. P-DCP: 0.439031 (< 0.5): Dưới ngưỡng, tương ứng với đánh giá ở mức trung bình-thấp. P-TXN: 0.518777 (> 0.5): Trên ngưỡng, khẳng định tính kháng nguyên mạnh, khớp với kết quả VaxiJen.

Kết quả trên cho thấy, P-TXN có tính kháng nguyên cao nhất cho thấy đây là kháng nguyên mạnh và đáng tin cậy. Tính kháng nguyên của P-AFP cũng khá cao khi đánh giá bằng AntigenPro. Tuy có sự khác nhau giữa 2 công cụ nhưng có tiềm năng lớn khi kết hợp với P-TXN; hoàn toàn phù hợp khi dùng chung trong kháng nguyên đa đoạn. P-DCP có tính kháng nguyên trung bình. Tuy nhiên, đoạn này sở hữu cụm epitope liên tục và không liên tục chồng nhau, có khả năng biểu hiện miễn dịch ổn định khi dùng làm kháng nguyên tái tổ hợp. Như vậy, lựa chọn ba đoạn peptide này không chỉ dựa vào giá trị thống kê của từng công cụ, mà còn vì chúng bổ trợ lẫn nhau, tạo nên kháng nguyên đặc hiệu, phù hợp với xu hướng thiết kế multi-epitope trong nghiên cứu miễn dịch học hiện đại cho dù điểm số đơn lẻ không vượt ngưỡng [112].

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

Để lựa chọn đoạn peptide kháng nguyên phù hợp phục vụ biểu hiện và tạo kháng thể đơn dòng, công cụ ExPASy được sử dụng nhằm phân tích các đặc tính vật lý-sinh học quan trọng. Kết quả thể hiện trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Đánh giá các tính chất vật lý của 3 đoạn protein P-AFP, P-DCP, P-TXN bằng ExPASy

Đặc điểm	P-AFP	P-DCP	P-TXN
Số axit amin (a.a)	108	81	95
Khối lượng	14935.04	10075.78	11950.00
Số a.a tích điện âm	17	23	14
Số a.a tích điện dương	14	8	12
pI lý thuyết	5.42	4.03	5.18
Hệ số tắt	7575	6085	6750

Thời gian bán hủy <i>in vivo</i> trong tế bào động vật	1.4 giờ	30 giờ	18 giờ
Chỉ số bất ổn	59.98	43.55	34.87
Chỉ số béo	73.15	51.85	66.90
Giá trị kỵ nước GRAVY	-0.774	-0.944	-0.168

Ba đoạn peptide P-AFP, P-DCP và P-TXN có những đặc điểm tính chất vật lý khác nhau, phản ánh vai trò và khả năng tồn tại của chúng trong môi trường sinh lý.

P-AFP (peptide từ AFP): Là đoạn peptide dài nhất (108 aa), có khối lượng phân tử lớn nhất (khoảng 15 kDa). Tuy nhiên, thời gian bán hủy rất ngắn (1.4 giờ) và chỉ số bất ổn cao (59.98), phản ánh tính không ổn định và dễ bị phân giải. Chỉ số GRAVY (-0.774) cho thấy mức độ kỵ nước vừa phải, nghĩa là protein có thể hòa tan tương đối trong môi trường nước nhưng vẫn cần tối ưu điều kiện biểu hiện. Như vậy, mặc dù P-AFP tiềm năng cho chức năng sinh học, nhưng P-AFP cần lưu ý khi thiết kế và xử lý tinh sạch vì độ ổn định thấp.

P-DCP (peptide từ DCP): Là peptide ngắn nhất (81 aa) và có khối lượng thấp nhất (khoảng 10 kDa), nhưng lại có thời gian bán hủy dài nhất (30 giờ) và chỉ số bất ổn tương đối thấp (43.55), cho thấy độ ổn định cao trong điều kiện sinh lý. Tuy nhiên, GRAVY thấp nhất (-0.944) chứng tỏ protein rất kỵ nước, dẫn đến khả năng hòa tan kém trong môi trường phân cực như huyết thanh. Ngoài ra, P-DCP có số lượng axit amin tích điện âm cao, có thể ảnh hưởng đến tính tương tác khi gắn vào bề mặt ELISA hoặc kết hợp kháng thể.

P-TXN (peptide từ TXN): Có độ dài trung bình (95 aa) và khối lượng khoảng 12 kDa, chỉ số bất ổn thấp nhất (34.87); thời gian bán hủy 18 giờ, đủ dài để đảm bảo sự tồn tại trong tế bào nhưng không quá dài gây tích tụ; GRAVY -0.168 gần bằng 0 cho thấy tính kỵ nước-trung tính, đồng nghĩa P-TXN có khả năng hòa tan tốt nhưng vẫn giữ được cấu trúc không gian ổn định; Giá trị pI 5.18 gần pH sinh lý, cho phép dễ dàng tinh sạch bằng các phương pháp trao đổi ion hoặc điện di. Những đặc điểm này chứng minh P-TXN là lựa chọn kháng nguyên lý tưởng nhất trong 3 peptide, cân bằng được tính ổn định, độ bền không gian và khả năng hòa tan.

Từ các kết quả trên cho thấy:

P-DCP là lựa chọn lý tưởng để phát triển kháng nguyên do độ ổn định cao và tồn tại lâu, tuy nhiên cần cải tiến về khả năng hòa tan.

P-TXN cân đối giữa tính ổn định, độ bền và khả năng hòa tan.

P-AFP, dù không ổn định, lại có cấu trúc dài và tiềm năng sinh miễn dịch cao, có thể sử dụng khi được tối ưu hóa điều kiện biểu hiện và tinh sạch.

Như vậy, việc lựa chọn peptide không chỉ dựa trên tính kháng nguyên mà còn cần xét đến các đặc điểm vật lý-sinh học để đảm bảo hiệu quả trong các ứng dụng chẩn đoán.

*** Kết luận về độ tin cậy của quy trình dự đoán epitope**

Quy trình dự đoán epitope cho ba protein AFP, DCP và TXN đã được thực hiện theo các bước phân tích chi tiết và hệ thống, bao gồm:

Dự đoán epitope liên tục bằng BepiPred 2.0 và epitope không liên tục bằng Discotope 2.0, kết hợp với mô hình cấu trúc 3D được dựng hoặc tham chiếu từ cơ sở dữ liệu tinh thể (PDB), nhằm đảm bảo tính chính xác hình học bề mặt. Sử dụng ngưỡng ở mức 0.5 – 0.6 cho BepiPred và -3.7 cho Discotope tương ứng với mức độ nhạy, độ đặc hiệu được công bố trong các nghiên cứu quốc tế, đảm bảo không bỏ sót các epitope tiềm năng. Vị trí các epitope được dự đoán trùng khớp với các vùng giàu hoạt tính miễn dịch (ví dụ, vùng giữa chuỗi DCP, vùng C-terminal của TXN), cũng có thêm độ tin cậy của kết quả.

Phân tích tính kháng nguyên bằng hai công cụ VaxiJen 2.0 và AntigenPro, giúp xác định khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch của các đoạn peptide được chọn, với P-TXN thể hiện độ tin cậy cao nhất khi vượt ngưỡng ở cả hai công cụ, P-DCP đạt mức trung bình, còn P-AFP dù thấp ở VaxiJen nhưng cao ở AntigenPro, khẳng định tiềm năng khi kết hợp đa epitope.

Phân tích tính chất lý-sinh bằng ExPASy cho thấy cả ba đoạn peptide được chọn đều có đặc điểm kích thước, pI, độ ổn định và thời gian bán hủy phù hợp cho quá trình biểu hiện, tinh sạch và ứng dụng thực tế, đặc biệt P-TXN có sự cân bằng tốt nhất.

Các cơ sở trên cho thấy kết quả dự đoán epitope của các protein AFP, DCP và TXN trong nghiên cứu này có độ tin cậy cao, đủ tiêu chuẩn để sử dụng làm cơ sở thiết kế peptide kháng nguyên tái tổ hợp.

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

Dựa vào trình tự nucleotide gốc kết hợp với sử dụng phần mềm chuyển đổi trình tự axit amin thành trình tự nucleotide (DNA/mRNA) dựa trên bảng mã di truyền từ phần mềm MEGA X, trình tự nucleotide được sử dụng để làm biểu hiện được trình bày ở Bảng 3.9. Trong đó, các trình tự nucleotide được thêm 2 điểm cắt giới hạn ở đầu và cuối trình tự là *NdeI* (5'-CATATG-3') và *XhoI* (5'-CTCGAG-3'). Trình tự nucleotide của P-AFP dài 348 bp, P-DCP dài 267 bp và P-TXN dài 309 bp.

Bảng 3.9. Trình tự nucleotide của các đoạn peptide P-AFP, P-DCP và P-TXN

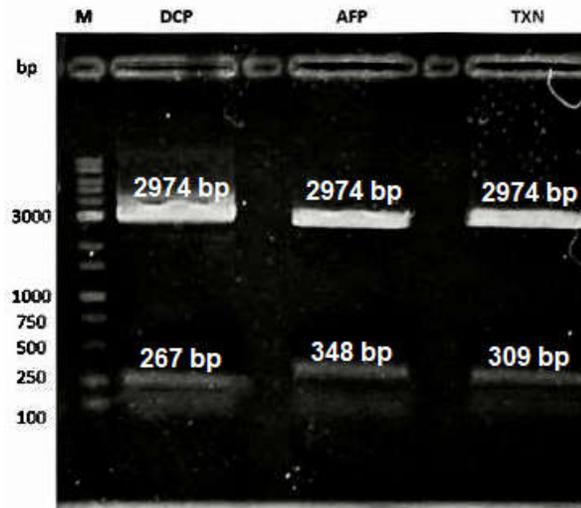
AFP	5' CATATGA .ATGATGA.AA.AACCCGAGGGACTATCACCA.AATCTGA.ATCGTTTTTTGGGCGACCGCGACTTCA.ACCAGTTTAGCTCCGGTGAGA.AGA.ACATCTTCCTTGCCTCTTTTCGTGCATGA.ATACAGCCGTCGCCACCCGCGAGTTAGCAGTTAGCGTTATTCTGCGTGTGGCGA.AAGGTTATCAGGAGCTGCTGGA.AA.AGTGCTTTC A.AACCGA.AA.ACCCGTTGGAGTGCCAGGATA.AAGGCGAGGA.AGA.ATTGCA.AA.AGTATATCCA.AGAGTCGCAGGCTCTGGCGA .AACGTAGCTGTGGCCTGTTCCA.AA.AACTGGGTGAGTACTACCTCGAG-3'
DCP	5' CATATGGGGG ATTTTGGATATTGTGACCTA.AATTACTGCGA.AGAGGCTGTGGA.AGAGGAGACGGGTGACGGCCTGGATGA.AGACAGCGACCGCGCA.ATTGAGGGCCGTA CTGCGACCTCTGA.ATACCAGACCTTCTTTA.ACCCGCGTACCTTCGGCAGCGGTGA.AGCCGATTGTGGTCTGCGTCCGTTGTTTGA.AA.AGA.AA.AGCTTG GAGGACA.AGACCGAGCGCGA.ACTGCTGGAGTCCTATATCGA TCTCGAG-3'
TXN	5' CATATGATAGAGTCA .AA.AACAGCATTTC.AGA.AGCTTTA GATGCCGCAGGCGATA.AATTGGTTGTCGTGGACTTCTCGGCG ACCTGGTGTGGTCCGTGTA.AA.ATGATCA.AACCGTTCTTCCAC AGCCTGTCCGAGA.AGTACAGCA.ATGTTATTTTTCTGGAGGTT GACGTGGACGACTGCCA.AGATGTTGCTAGCGAGTGCGA.AGT GA.AGTGCATGCCGACGTTTTCAGTTTTTCA.AA.AAGGGTCAGA. AAGTGGGCGA.ATTTTCTGGTGC GA.ACA.AAGA.AA.AGCTGGA GGCGCTCGAG-3'

3.1.2. Kết quả biến nạp vào *E. coli*

Vector tạo dòng pJET1.2 mang gen mục tiêu (được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics, Việt Nam.) có hai enzym cắt giới hạn *NdeI* và *XhoI* phục vụ cho việc cắt gen. Đoạn gen đích *AFP/DCP/TXN* được chèn vào giữa. Trong đó, pBR322 Ori là nguồn gốc tái bản. LacI là trình tự khởi động tự nhiên của *E. coli* và trình tự mã hóa cho lac repressor. T7 promoter thúc đẩy quá trình phiên mã ở mức độ cao của gen quan tâm khi có mặt T7 RNA polymerase. Amp^R gen kháng kháng sinh ampicillin.

Quá trình cắt thu hồi gen đã thu được các cặp gồm hai mảnh gen tương ứng với kích thước là pJET1.2 có kích thước 2974 bp và gen mục tiêu là: *AFP* (kích thước

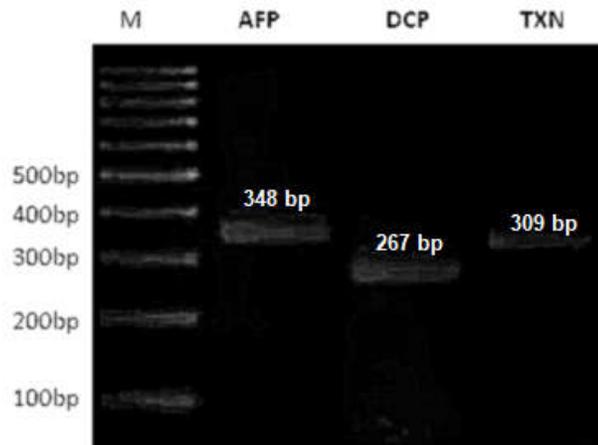
348 bp) hoặc *DCP* (kích thước 267 bp) hoặc *TXN* (kích thước 309 bp) (Hình 3.1). Đây là bước quan trọng để đảm bảo chất lượng gen mục tiêu trước khi chuyển sang vector biểu hiện tái tổ hợp. Kết quả này cũng khẳng định rằng đoạn gen mục tiêu được chèn và vị trí enzym cắt giới hạn là phù hợp, không bị lỗi đột biến, sai khung đọc hay mất trình tự.



Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid chứa gen *AFP*, *DCP* và *TXN* ra khỏi vector pJET1.2 bằng hai loại enzym cắt giới hạn là *NdeI* và *XhoI*.

M1: Thang DNA chuẩn GeneRuler 1 Kb Plus

Đoạn gen mục tiêu được thu hồi bằng bộ kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Mỹ), cho phép tinh sạch sản phẩm DNA tái tổ hợp.



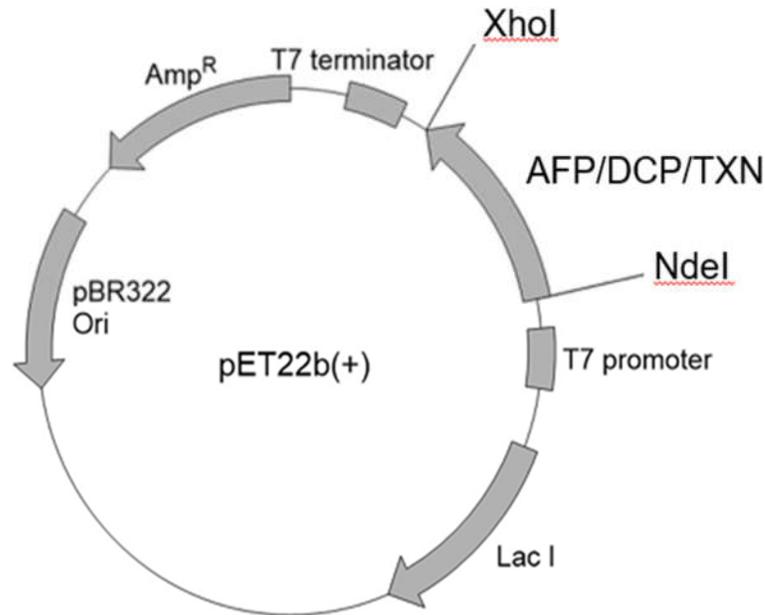
Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm cắt gen sau tinh sạch

M2: Thang DNA chuẩn GeneRuler 100 bp;

AFP: 348 bp, *DCP*: 267 bp, *TXN*: 309 bp.

Sản phẩm thu được sau tinh sạch chỉ có một băng duy nhất đúng kích thước dự đoán, không đứt gãy, không bị vệt kéo dài (Hình 3.2). Sản phẩm này đủ điều kiện để tiếp tục được sử dụng trong quá trình biến nạp nhằm tạo vector tái tổ hợp, phục vụ cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

- Vector biểu hiện pET22b+ (Hình 3.3) được xử lý mở vòng bằng hai enzym cắt *NdeI* và *XhoI*, sau đó ghép gen mục tiêu vào vector biểu hiện pET22b+ và nối bằng T4 ligase.

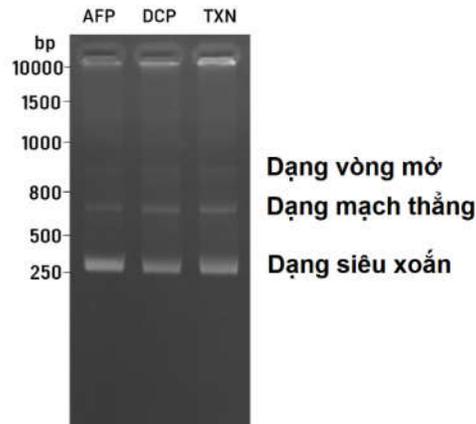


Hình 3.3. Sơ đồ vector biểu hiện pET22b+ với hai enzym *NdeI* và *XhoI*.

Biến nạp vector biểu hiện pET22b+ chứa gen mục tiêu vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau khi thực hiện biến nạp, các khuẩn lạc được nuôi phục hồi trên môi trường thạch LB-agar có bổ sung kháng sinh chọn lọc ampicillin ở nồng độ 100 µg/ml nhằm sàng lọc dòng chuyển gen thành công.

Kết quả cho thấy có xuất hiện khuẩn lạc mọc ở đĩa LB-agar chứa kháng sinh ampicillin ở nồng độ 100 µg/ml và khá rời rạc. Một số khuẩn lạc trên đĩa được lựa chọn đem đi nuôi tăng sinh trong môi trường LB lỏng có ampicillin ở nồng độ 100 µg/ml để tiến hành tách DNA plasmid và PCR với mỗi đặc hiệu.

- Kết quả điện di DNA plasmid cho thấy khi xuất hiện rõ nét của một băng DNA dạng siêu xoắn (supercoiled) nằm thấp nhất trong các băng plasmid. Các băng phụ như dạng vòng mở (open circular) hoặc dạng mạch thẳng (linear) có xuất hiện nhưng không chiếm ưu thế (Hình 3.4).

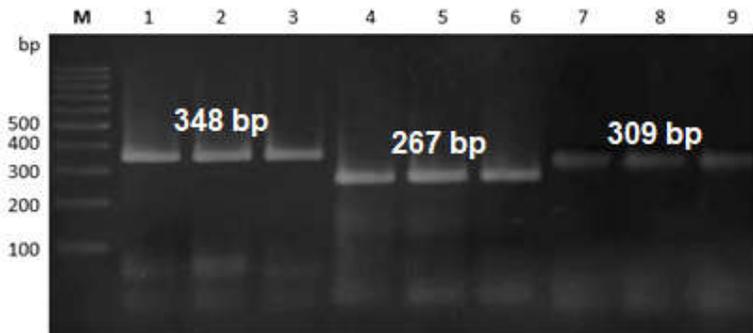


Hình 3.4. Điện di đồ sản phẩm DNA plasmid tái tổ hợp từ các khuẩn lạc mọc trên đĩa LB-agar chứa kháng sinh.

M1: Thang DNA chuẩn GeneRuler 1 Kb Plus; Các giếng AFP, DCP, TXN chứa plasmid với 3 dạng nhận diện gồm: dạng vòng mở (open circular), dạng mạch thẳng (linear) và dạng siêu xoắn (supercoiled).

- Kết quả điện di kiểm tra PCR khuẩn lạc đã được biến nạp gen mục tiêu ở nhiệt độ gắn mồi 58°C, cho một băng vạch duy nhất có kích thước *AFP* khoảng 348 bp, *DCP* khoảng 267 bp, *TXN* khoảng 309 bp tương đương với trình tự gen đã thiết kế ban đầu (Hình 3.5).

Như vậy, đoạn gen *AFP*, *DCP*, *TXN* đã được chèn đầy đủ vào vector biểu hiện.



Hình 3.5. Điện di đồ kiểm tra gen mục tiêu từ các khuẩn lạc chọn lọc

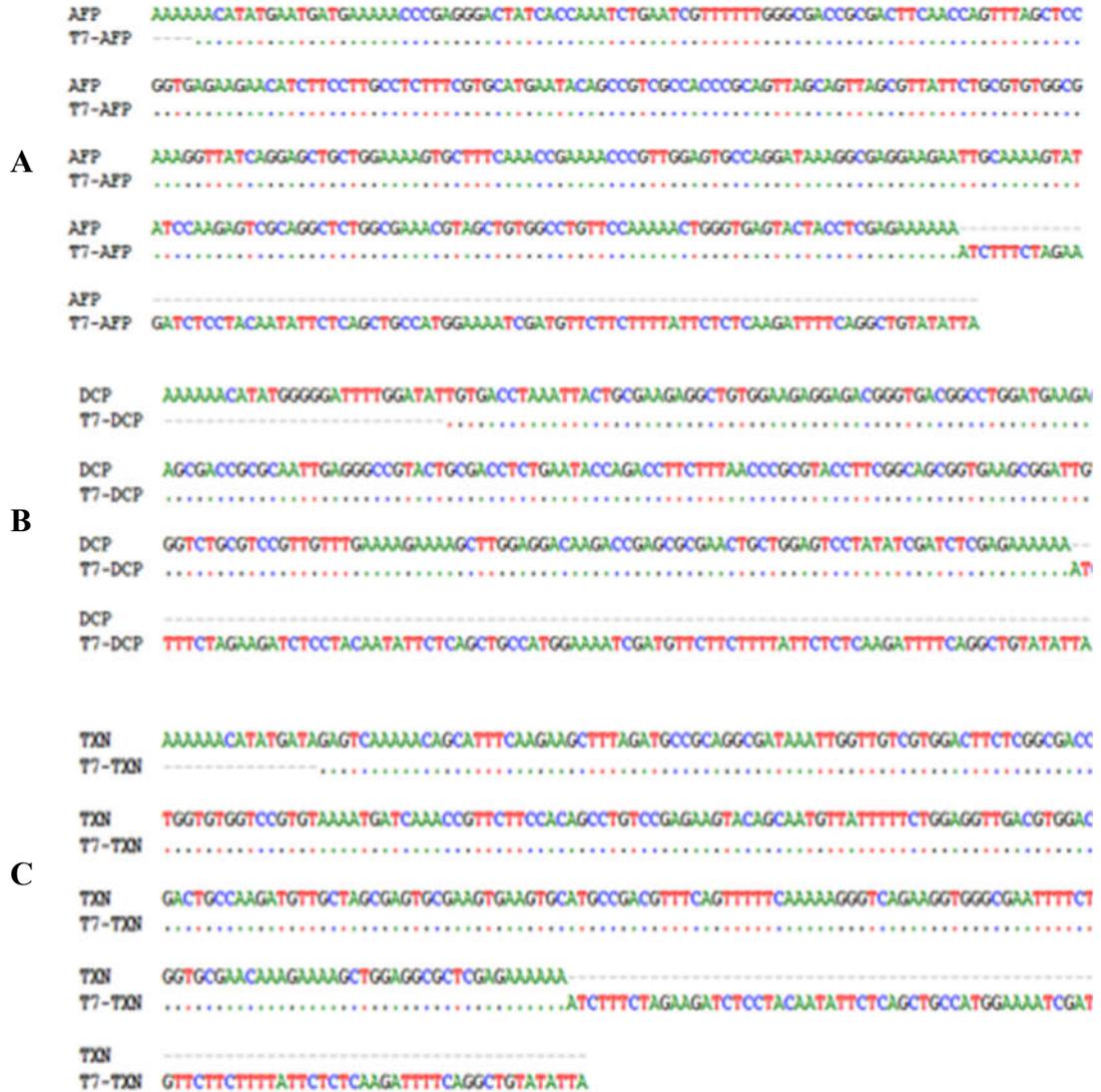
M2: Thang DNA chuẩn GeneRuler 100 bp; Giếng 1-3: sản phẩm PCR của *AFP* có kích thước 348 bp; Giếng 4-6: sản phẩm PCR của *DCP* có kích thước 267 bp; Giếng 7-9 sản phẩm PCR của và *TXN* có kích thước 309 bp.

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

Sau khi thu nhận các khuẩn lạc dương tính (kháng ampicillin) có khả năng mang plasmid chứa gen mục tiêu, những mẫu cho kích thước chèn đúng dự đoán được

lựa chọn để tiến hành giải trình tự Sanger sử dụng môi phổ biến là T7 promoter. Kết quả giải trình tự được minh họa trong Hình 3.6.

Dữ liệu trình tự thu được được phân tích bằng phần mềm ClustalW trên BioEdit 7.2, cho phép căn chỉnh và so sánh với trình tự thiết kế ban đầu nhằm đánh giá tính toàn vẹn và chính xác của đoạn DNA tái tổ hợp.



Hình 3.6. Kết quả giải trình tự với môi thương mại T7 promoter.

A: đoạn gen có chứa *AFP*; B: đoạn gen có chứa *DCP*;

C: đoạn gen có chứa *TXN*.

Trình tự thu được từ vector T7-*AFP/DCP/TXN* hoàn toàn khớp với trình tự gen *AFP* thiết kế ban đầu. Không xuất hiện bất kỳ sai sót về nucleotide, thiếu đoạn, thêm đoạn hay đột biến nào, kể cả ở đầu 5' lẫn cuối 3'.

Toàn bộ vùng mã hóa gen *AFP/DCP/TXN* (gồm cả codon khởi đầu ATG và các codon tiếp theo) đã được chèn chính xác vào vector biểu hiện. Vùng T7 promoter đã hoạt động đúng vai trò làm môi giải trình tự và vùng gen nằm liền kề promoter T7 trong vector pET22b+.

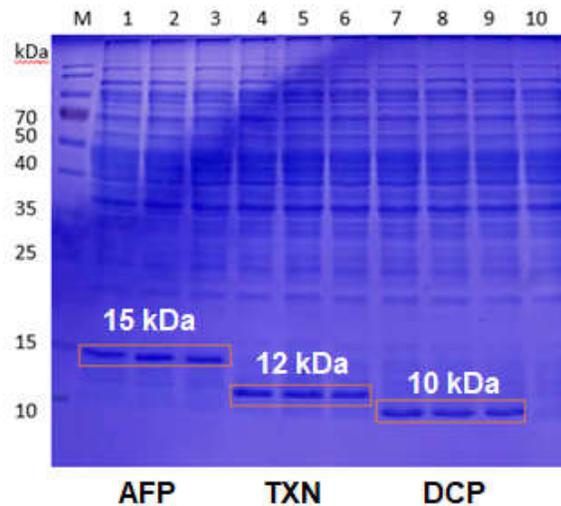
Kết quả giải trình tự khẳng định rằng quá trình ghép gen vào vector pET22b+ đã diễn ra chính xác, không đột biến và không lệch khung đọc, đảm bảo khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp về sau.

Chỉ những khuẩn lạc đạt các tiêu chí này mới được giữ chủng, bảo quản ngắn hạn trên môi trường LB-agar có chứa ampicillin, hoặc bảo quản đông sâu trong môi trường LB-amp + 30% glycerol để sử dụng trong các bước tiếp theo như biểu hiện và tinh sạch protein.

3.1.4. Biểu hiện protein tái tổ hợp

3.1.4.1 Kết quả biểu hiện protein tổng số

Để biểu hiện protein tái tổ hợp, ba khuẩn lạc đại diện cho mỗi loại gen *AFP*, *DCP*, *TXN* đã được chọn để tiến hành biểu hiện theo như mô tả trong phần Phương pháp nghiên cứu.



Hình 3.7. Điện di đồ sản phẩm protein tổng số của các khuẩn lạc sau khi đã được nuôi biểu hiện với chất cảm ứng IPTG.

M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm; Giếng 1-3: protein tổng số mang gen *AFP*; Giếng 4-6: protein tổng số mang gen *TXN*; Giếng 7-9: protein tổng số mang gen *DCP*; Giếng 10: protein tổng số của khuẩn lạc không có gen biến nạp.

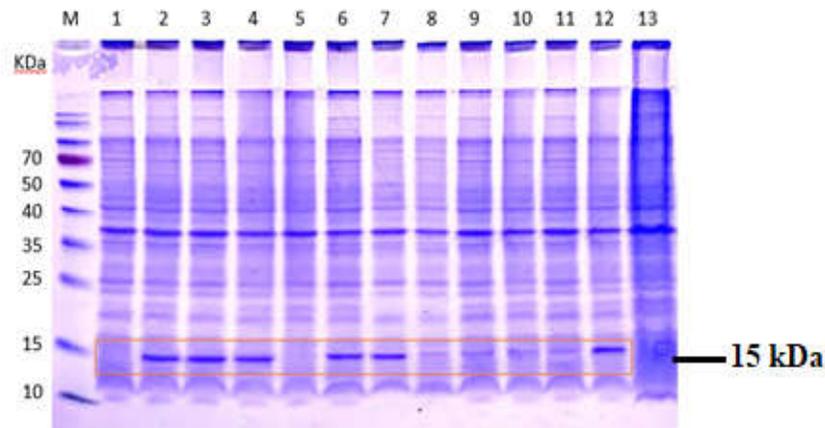
Kết quả điện di kiểm tra protein tổng số trên gel acrylamide của cả 3 nhóm khuẩn lạc mang gen mục tiêu so với khuẩn lạc không mang gen biến nạp đều cho thấy xuất hiện thêm các đoạn protein tái tổ hợp: AFP có kích thước khoảng 15 kDa, DCP

có kích thước khoảng 10 kDa và TXN có kích thước khoảng 12 kDa (Hình 3.7). Như vậy, các *E. coli* mang gen *AFP*, *DCP* và *TXN* đã biểu hiện thành công protein tái tổ hợp, với kích thước phù hợp thiết kế lý thuyết và không xuất hiện trong mẫu đối chứng.

3.1.4.2. Tối ưu biểu hiện *AFP*, *DCP*, *TXN*

Sau khi đã biểu hiện và thu nhận thành công protein tái tổ hợp *AFP*, *DCP*, *TXN*; một số điều kiện như nồng độ chất cảm ứng IPTG, nhiệt độ và thời gian nuôi đã được tối ưu để thu nhận số lượng lớn 3 loại protein tái tổ hợp, phục vụ cho tinh sạch và sử dụng cho các mục đích nghiên cứu tiếp theo.

+ *AFP*: Kết quả tối ưu các điều kiện biểu hiện của *AFP* được trình bày trong Hình 3.8.



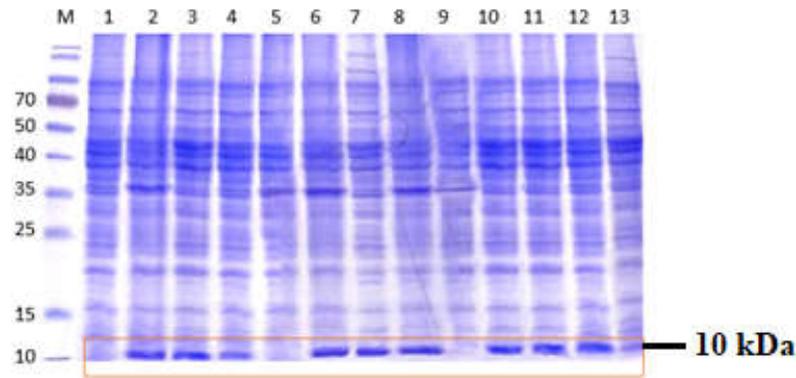
Hình 3.8. Kết quả tối ưu điều kiện biểu hiện của protein *AFP*.

M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm; Giếng 1-4 khảo sát nồng độ chất cảm ứng IPTG lần lượt ở 0.05 mM; 0.1 mM; 0.2 mM; 0.4 mM. Giếng 5-8 khảo sát thời gian nuôi biểu hiện lần lượt ở 9 giờ, 12 giờ, 15 giờ, 18 giờ. Giếng 9-12 khảo sát nhiệt độ nuôi biểu hiện lần lượt ở 25°C, 30°C, 33°C, 37°C. Giếng 13 là protein tổng số của khuẩn lạc không mang gen biến nạp.

Kết quả trên cho thấy điều kiện tối ưu biểu hiện của *AFP* như sau: nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0.1 mM, nhiệt độ biểu hiện tối ưu là 37°C và thời gian thích hợp cho quá trình biểu hiện là 12 giờ.

+ *DCP*: Tương tự như *AFP*, 3 điều kiện cơ bản để tối ưu biểu hiện của *DCP* được minh họa trong Hình 3.9.

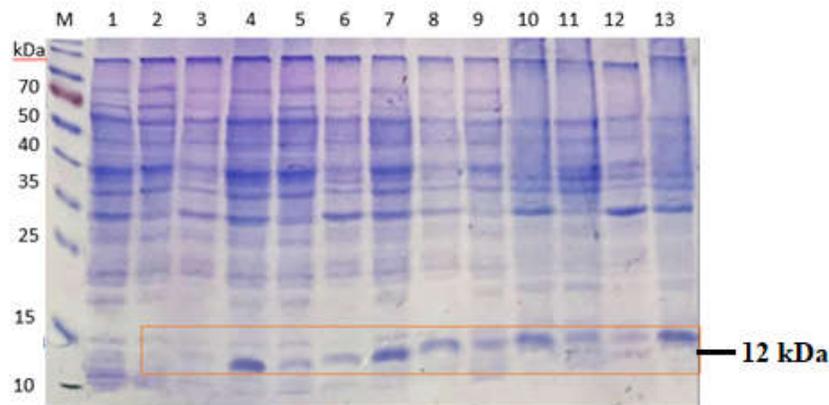
Kết quả từ Hình 3.9 cho thấy, nồng độ IPTG là 0.1 mM và 9 giờ nuôi ở 25°C đạt kết quả tốt nhất.



Hình 3.9. Kết quả tối ưu điều kiện biểu hiện của protein DCP.

M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm; Giếng 2-5 khảo sát nồng độ chất cảm ứng IPTG lần lượt ở 0.05 mM; 0.1 mM; 0.2 mM; 0.4 mM. Giếng 6-9 khảo sát thời gian nuôi biểu hiện lần lượt ở 9 giờ, 12 giờ, 15 giờ, 18 giờ. Giếng 10-13 khảo sát nhiệt độ nuôi biểu hiện lần lượt ở 25°C, 30°C, 33°C, 37°C. Giếng 1 là protein tổng số của khuẩn lạc không mang gen biến nạp.

+ TXN: Thực hiện các bước tương tự như 2 protein tái tổ hợp AFP, DCP. Kết quả cho thấy ở nhiệt độ 37°C, 12 giờ nuôi cấy, có bổ sung chất cảm ứng IPTG đến nồng độ 0.2 mM, đạt kết quả tốt nhất (Hình 3.10).



Hình 3.10. Kết quả tối ưu điều kiện biểu hiện của protein TXN.

M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm; Giếng 2-5 khảo sát nồng độ chất cảm ứng IPTG lần lượt ở 0.05 mM; 0.1 mM; 0.2 mM; 0.4 mM. Giếng 6-9 khảo sát thời gian nuôi biểu hiện lần lượt ở 9 giờ, 12 giờ, 15 giờ, 18 giờ. Giếng 10-13 khảo sát nhiệt độ nuôi biểu hiện lần lượt ở 25°C, 30°C, 33°C, 37°C. Giếng 1 là protein tổng số của khuẩn lạc không mang gen biến nạp.

(Do đặc điểm của thang chuẩn nhuộm màu sẵn (M3), sau quá trình điện di xảy ra hiện tượng vạch thang chuẩn không đều màu,.. nhưng điều này không ảnh hưởng đến việc xác định đúng vị trí protein mục tiêu TXN = 12 kDa)

*** Kết luận chung về điều kiện tối ưu cho AFP, DCP, TXN**

+ Nồng độ IPTG: AFP và DCP đạt mức biểu hiện cao nhất tại 0.1 mM IPTG, cho thấy chỉ cần nồng độ cảm ứng thấp đã đủ kích hoạt vùng promoter T7. Ở nồng độ IPTG cao hơn (0.2 – 0.4 mM), mức biểu hiện giảm nhẹ, có thể do hình thành thể vùi hoặc ức chế tăng trưởng. Bãng TXN ở nồng độ IPTG 0.2 mM vẫn sắc nét và không bị mờ đi như AFP/DCP ở nồng độ cao hơn. Do tính chất sinh học đặc trưng, TXN là protein nhỏ kích thước nhỏ (khoảng 12 kDa), có cấu trúc bền vững, dễ gấp cuộn đúng trong môi trường tế bào chất, do đó vẫn có thể biểu hiện hiệu quả ở mức IPTG cao hơn mà không làm tăng đáng kể nguy cơ hình thành thể vùi (điều thường thấy ở các protein lớn hơn như AFP hoặc DCP). Nghiên cứu của Sahdev và cộng sự (2008) cũng chỉ ra rằng những protein có trọng lượng phân tử nhỏ, cấu trúc gọn và ít cầu nối disulfide tương tự TXN, thường dễ biểu hiện ở dạng hòa tan trong *E. coli* [113].

+ Thời gian nuôi: Mức biểu hiện protein AFP và TXN đạt tối đa sau 12 giờ cảm ứng IPTG, sau đó không tăng đáng kể hoặc thậm chí giảm nhẹ ở các thời điểm 15 và 18 giờ. Hiện tượng này có thể liên quan đến việc *E. coli* bước sang pha suy thoái sau thời gian cảm ứng kéo dài, làm giảm tốc độ tổng hợp protein, đồng thời tăng hoạt động của các protease nội sinh [114]. Do đó, 12 giờ sau cảm ứng được xem là mốc thời gian tối ưu cho thu nhận protein tái tổ hợp AFP và TXN trong nghiên cứu này. Riêng DCP đạt mức biểu hiện cao nhất tại 9 giờ sau cảm ứng, rút ngắn thời gian so với AFP và TXN. Điều này cho thấy DCP dễ bị ảnh hưởng bởi stress tế bào nếu nuôi kéo dài, có thể dẫn đến sai gấp cuộn hoặc giảm chất lượng protein.

+ Nhiệt độ: AFP và TXN biểu hiện tối ưu ở 37°C, điều kiện nhiệt độ cao giúp *E. coli* tăng trưởng nhanh, tăng tốc độ tổng hợp protein; đồng thời cấu trúc của hai protein này đơn giản, dễ gấp cuộn, ít bị kết tủa. DCP biểu hiện tối ưu ở 25°C, do DCP có cấu trúc phức tạp, nhiều cầu disulfide, dễ sai gấp ở nhiệt độ cao; nuôi ở nhiệt độ thấp tạo điều kiện cho protein gấp cuộn chính xác, hạn chế hình thành thể vùi.

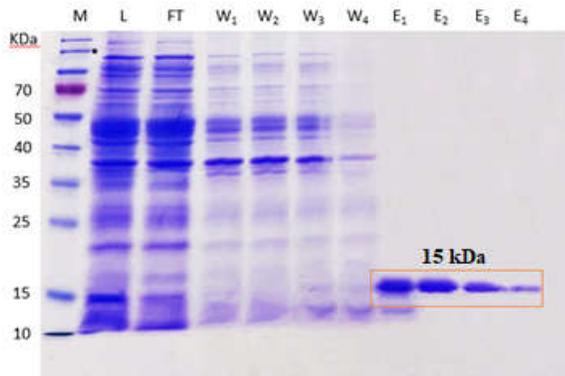
3.1.5. Tinh sạch các protein tái tổ hợp

- *Tinh sạch protein tái tổ hợp AFP:*

Sau khi tinh sạch qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA, protein tái tổ hợp AFP kích thước khoảng 15 kDa được thu nhận rõ ràng trong 4 phân đoạn rửa giải E₁–E₄ (Hình 3.11). Vạch protein mục tiêu thể hiện đậm, sắc nét và đồng đều, cho thấy AFP được biểu hiện chủ yếu ở dạng hòa tan và có khả năng gắn kết hiệu quả với cột Ni-NTA thông qua đuôi His-tag. Phân tích ảnh gel SDS-PAGE bằng phần mềm ImageJ cho

thấy: 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%.

So với các nghiên cứu trước, kết quả này cho thấy hệ thống biểu hiện và quy trình tinh sạch trong nghiên cứu hiện tại có hiệu quả cao hơn. Trong khi AFP toàn phần trước đây thường biểu hiện dưới dạng thể vùi và đòi hỏi quá trình hòa tan – tái gấp nếp phức tạp [115], thì AFP tái tổ hợp ở nghiên cứu này được biểu hiện chủ yếu ở dạng hòa tan và thu hồi trực tiếp sau nuôi cấy. So với báo cáo của Li (2022), trong đó chỉ thu được protein sau 2 phân đoạn rửa giải [116], AFP trong nghiên cứu này được thu đều ở 4 phân đoạn, phản ánh mức độ gắn kết tốt và khả năng thu hồi protein cao hơn.



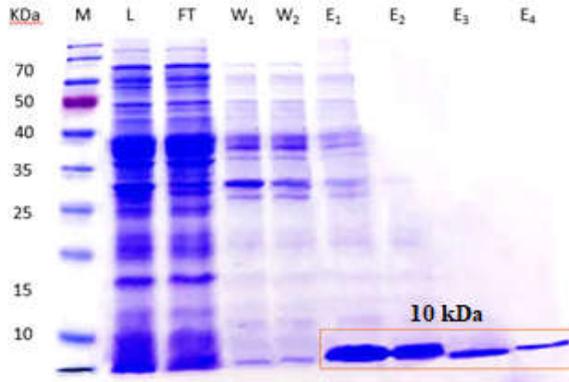
Hình 3.11. Sản phẩm protein tái tổ hợp AFP tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm; L (Lysate): dịch protein tổng số; FT (Flow Through): dịch qua cột; W (Wash): dịch rửa rã; E (Elution): các phân đoạn rửa giải chứa protein AFP.

- Tinh sạch protein tái tổ hợp DCP:

Protein DCP kích thước khoảng 10 kDa được thu nhận rõ ràng trong 4 phân đoạn rửa giải E₁–E₄ sau khi tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA (Hình 3.12). Vạch protein mục tiêu xuất hiện đậm, rõ ràng, thể hiện khả năng gắn kết tốt với cột Ni thông qua đuôi His-tag. Phân tích mật độ vạch trên ảnh gel bằng phần mềm ImageJ cho thấy: Độ tinh khiết của các phân đoạn E₁–E₄ 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.

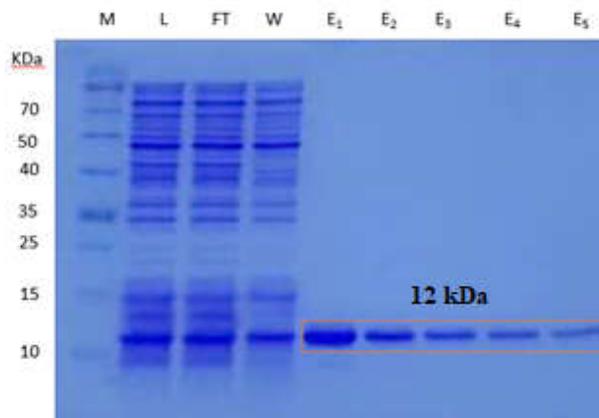
Hiệu suất thu hồi này phụ thuộc đáng kể vào điều kiện biểu hiện. Cụ thể, khi nuôi cấy ở 37°C, DCP chủ yếu tích lũy ở dạng không hòa tan, dẫn đến hiệu suất thấp.

Tuy nhiên, khi giảm nhiệt độ cảm ứng xuống 25°C, lượng protein hòa tan tăng đáng kể, cho phép thu nhận trực tiếp protein ở pha lỏng mà không cần tái cấu trúc. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước cho thấy cảm ứng ở nhiệt độ thấp giúp cải thiện gấp nếp và độ hòa tan của protein ngoại lai [116]. Với kích thước nhỏ (10 kDa), DCP cho thấy khả năng tinh sạch dễ dàng và bền vững, đặc biệt khi được biểu hiện ở điều kiện nhiệt độ tối ưu.



Hình 3.12. Sản phẩm protein tái tổ hợp DCP tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm; L (Lysate): dịch protein tổng số; FT (Flow Through): dịch qua cột; W (Wash): dịch rửa rã; E (Elution): các phân đoạn rửa giải chứa protein DCP.

- *Tinh sạch protein tái tổ hợp TXN:*



Hình 3.13. Sản phẩm protein tái tổ hợp TXN tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm; L (Lysate): dịch protein tổng số; FT (Flow Through): dịch qua cột; W (Wash): dịch rửa rã; E (Elution): các phân đoạn rửa giải chứa protein TXN.

Protein TXN kích thước 12 kDa là một protein nhỏ có bản chất hòa tan cao và bền vững [117]. Sau khi tinh sạch qua cột Ni-NTA, protein mục tiêu được thu rõ ràng

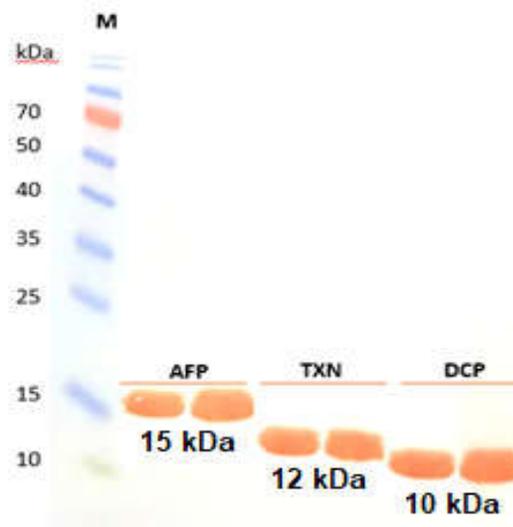
trong 5 phân đoạn rửa giải E₁–E₅ (Hình 3.13), phản ánh tổng lượng protein thu hồi lớn và quá trình gắn kết, rửa giải hiệu quả. Phân tích ảnh gel bằng phần mềm ImageJ cho thấy: Độ tinh khiết của các phân đoạn E₁–E₅ đạt từ 85 – 90%, với băng TXN rõ, đậm, sắc nét. Hiệu suất thu hồi tổng thể so với mẫu lysate thô đạt khoảng 93 – 96%, cao nhất trong ba protein được tinh sạch.

Điều kiện cảm ứng bằng IPTG có ảnh hưởng rõ rệt đến kết quả biểu hiện. So sánh các nồng độ IPTG cho thấy mức 0,5 – 1 mM cho năng suất TXN cao hơn rõ rệt so với các nồng độ thấp hơn, phù hợp với nhận định rằng nồng độ IPTG cao thường thúc đẩy mức phiên mã mạnh hơn mà không ảnh hưởng đến hòa tan ở các protein nhỏ bền vững như TXN [117].

Tính ổn định nhiệt và cấu trúc vững của TXN cũng là yếu tố then chốt giúp protein không bị biến tính hoặc kết tủa trong quá trình tinh sạch, đảm bảo thu hồi ở hiệu suất cao [118].

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

Kết quả thu được như trong Hình 3.14 cho thấy, protein (kháng nguyên) tái tổ hợp AFP thể hiện một băng protein rõ nét ở kích thước khoảng 15 kDa, phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của đoạn AFP tái tổ hợp đã thiết kế.



Hình 3.14. Kết quả kiểm tra Western blot cho các protein (kháng nguyên) tái tổ hợp M3: 10-100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm

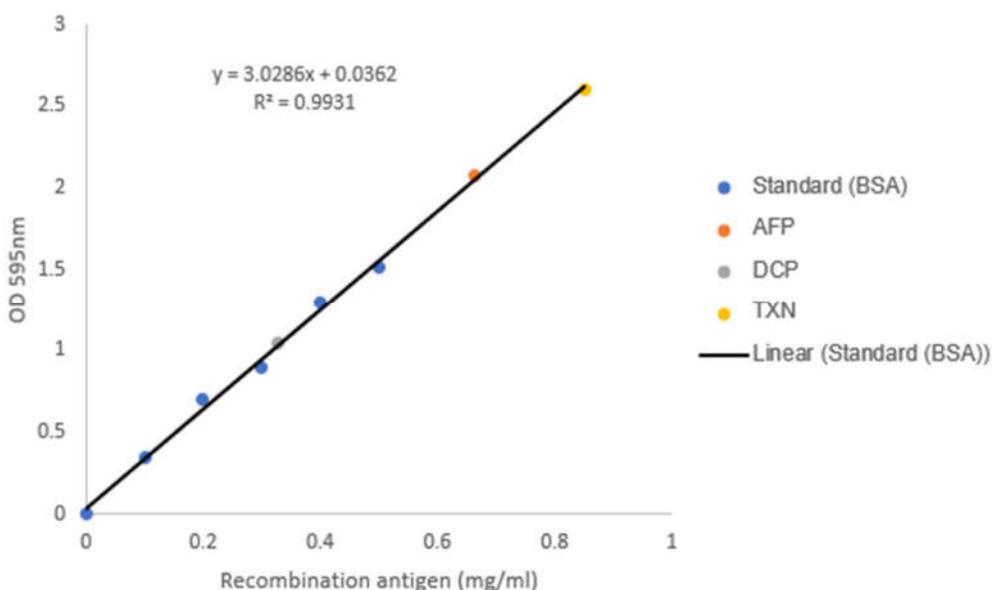
Việc chỉ quan sát duy nhất một dải đặc hiệu cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp AFP thu được có độ tinh sạch cao và giữ nguyên cấu trúc quyết định kháng nguyên, phù hợp với thiết kế ban đầu. Kháng nguyên DCP tái tổ hợp cho ra một băng ở 10 kDa với độ rõ nét cao. Mặc dù khối lượng này thấp hơn so với kết quả của nghiên cứu được thực hiện bởi Shen và cộng sự (2013) với DCP khoảng 23 kDa [119]. Nhưng

kết quả nghiên cứu này thu được tương đồng ở việc chỉ có một dải riêng biệt trong Western blot. Điều này khẳng định thành công trong việc biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên DCP tái tổ hợp, đồng thời tương tự với báo cáo đã công bố khi kháng thể kháng DCP đơn dòng chỉ nhận diện một protein đặc hiệu. Kháng nguyên TXN có băng protein ở 12 kDa chỉ ra thành công trong biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên TXN tái tổ hợp. Đặc điểm nổi bật là chỉ có một băng duy nhất, chứng tỏ không xuất hiện sản phẩm phân giải hay phiên mã sai. TXN vốn là protein rất ổn định, và kết quả này phù hợp với báo cáo trước cho thấy TXN gắn nhãn TAP duy trì băng đơn trên Western blot, minh chứng cho tính ổn định cao (không bị phân mảnh) của protein [120].

Hình ảnh Western blot với ba băng sắc nét tương ứng với AFP, TXN, và DCP chỉ ra rằng các protein này được biểu hiện đúng kích thước, giữ được epitope đặc hiệu và không bị phân mảnh rõ rệt. Mặc dù Western blot không dùng để đánh giá độ tinh sạch tổng thể, việc chỉ quan sát một băng duy nhất trong mỗi mẫu phản ánh mức độ tinh sạch tương đối cao và tính đặc hiệu miễn dịch tốt, đủ điều kiện để sử dụng trong các bước nghiên cứu tiếp theo.

3.1.7. Đo nồng độ protein tái tổ hợp

Đường chuẩn Bradford (Hình 3.15) được dựng và xử lý bằng Excel, với giá trị $R^2 > 0.98$ cho thấy độ sai số của thí nghiệm trong ngưỡng chấp nhận.



Hình 3.15. Đo nồng độ protein tái tổ hợp tinh sạch bằng phương trình đường chuẩn Bradford

Nồng độ đo được của AFP là 0.663 mg/ml, DCP là 0.328 mg/ml và TXN là 0.851 mg/ml. Kết quả này cho thấy mức độ chính xác cao trong việc xác định nồng

độ protein, cho phép khẳng định các kết quả thu được là đáng tin cậy. Tuy nhiên, các nồng độ thấp hơn so với các nghiên cứu trước đó từ 5-6 lần [121, 122, 123]. Có sự khác biệt về nồng độ trên có thể là do đa phần protein tái tổ hợp trong nghiên cứu này đều ở dạng thể vùi nhưng không sử dụng ure để hoà tan và tái gấp cuộn lại. Nồng độ protein tái tổ hợp thu được chỉ dùng đồng thời tác nhân vật lý là sóng siêu âm và chất xúc tác sinh học là enzym lysozyme để phá vỡ màng tế bào. Do đó hiệu quả thu hồi không được cao như các kết quả dùng ure [122]. Tuy nhiên, để đảm bảo động vật thí nghiệm không bị ngộ độc ure và kết quả thu được vẫn đạt nồng độ tối thiểu nên nghiên cứu này không dùng ure để biến tính và tái gấp cuộn thể vùi.

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

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

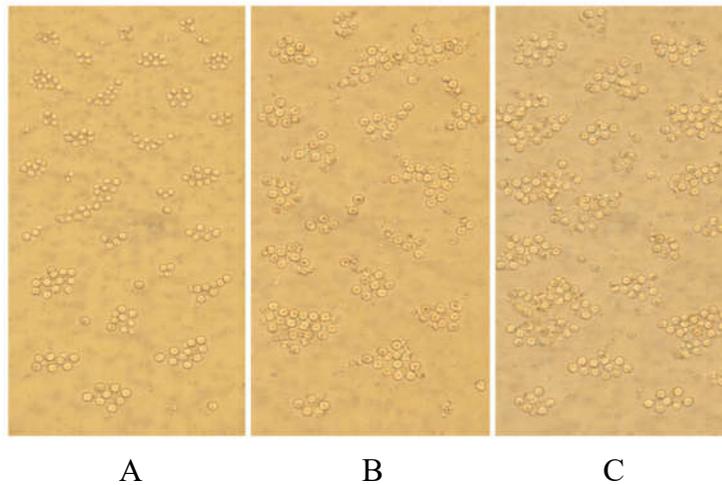
Chuột được gây miễn dịch lần đầu với kháng nguyên tái tổ hợp (nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) phối trộn với tá chất FCA. Sau 24 giờ gây miễn dịch lần 1 với kháng nguyên tái tổ hợp AFP/DCP/TXN cho thấy chuột ăn uống, hoạt động bình thường, cân nặng không thay đổi, không có biểu hiện bệnh lý, lông mượt, phản xạ tốt. Tiếp tục gây miễn dịch lần 2 (sau 3 ngày gây miễn dịch lần 1) và lần 3 (sau 6 ngày miễn dịch lần 1). Kháng nguyên tái tổ hợp AFP/DCP/TXN (nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) được phối trộn với tá chất FIA, tiêm vào chuột với tổng thể tích là 50 $\mu\text{l/ con}$.

Sau 24 giờ mỗi lần gây miễn dịch, quan sát thấy chuột ăn uống, hoạt động bình thường, không thay đổi cân nặng, không có bất thường về biểu hiện bệnh lý, lông mượt, phản xạ tốt. Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài (so sánh với 01 chuột đối chứng cho các nhóm chỉ được tiêm nước cất vô trùng cho thấy chuột đối chứng ăn uống, hoạt động bình thường, phát triển bình thường, không có biểu hiện bất thường về bệnh lý). Kết quả theo dõi sau tiêm cho thấy nồng độ kháng nguyên tái tổ hợp cũng như tá chất FCA, FIA được chuột dung nạp tốt, không ghi nhận dấu hiệu độc tính cấp hoặc bất thường rõ rệt. Việc sử dụng FCA ở mũi tiêm đầu là phù hợp với nguyên tắc “một mũi FCA duy nhất” để tối đa hóa phản ứng miễn dịch ban đầu. Sau đó, mũi tiêm nhắc lại sử dụng FIA đúng như khuyến cáo để giảm tác dụng phụ. Như vậy, thiết kế nghiên cứu này (FCA lần đầu, FIA lần sau) là đúng theo tiêu chuẩn trong các quy trình gây miễn dịch tạo kháng thể và đã được áp dụng rộng rãi [124]. Thiết kế này cũng phù hợp với lý thuyết và thực tiễn sản xuất kháng thể đơn dòng. Liều kháng nguyên đã dùng là 400 $\mu\text{g/ml}$ (tương đương 20 μg kháng nguyên trong thể tích tiêm 50 μl). Mức này nằm trong khoảng khuyến nghị chung (10–100 μg mỗi lần tiêm) cho các quy trình tạo kháng thể [124].

Kết quả mổ chuột kiểm tra thấy rằng chuột trong nhóm chứng có lách và hạch bẹn kích thước bình thường. 100% chuột trong 3 nhóm được tiêm kháng nguyên tái tổ hợp AFP/DCP/TXN có lách và hạch bẹn sưng to (là những phản ứng điển hình của hệ thống miễn dịch khi bị kích thích bởi kháng nguyên) cho thấy hiệu quả của quy trình tiêm và khả năng tạo phản ứng miễn dịch mạnh từ hệ miễn dịch của chuột. Kết quả này cũng tương tự như trong các nghiên cứu miễn dịch chứng minh khi kháng nguyên được tiêm vào chuột sẽ kích hoạt hệ thống miễn dịch, dẫn đến sự tăng sinh của tế bào lympho B, đồng thời gây ra phản ứng phù nề ở các hạch bạch huyết và lách, đây là dấu hiệu của việc tế bào lympho B đang sản xuất kháng thể đặc hiệu [124]. Như vậy, lựa chọn sử dụng chuột BALB/c để tiêm kháng nguyên protein tái tổ hợp AFP/DCP/TXN gây miễn dịch là phù hợp và tương đồng với các nghiên cứu đã khuyến cáo sử dụng chuột BALB/c do rất nhiều tế bào tủy xương (myeloma) dùng để ghép có nguồn gốc từ chủng này. Liều kháng nguyên 20 μg bổ sung tá chất FCA/FIA là tương đồng với các nghiên cứu đã được thực hiện [125]. Như vậy, quy trình này an toàn và khả năng dung nạp miễn dịch tốt, đáp ứng yêu cầu về tiêu chuẩn sản xuất kháng thể.

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



Hình 3.16. Quan sát nuôi cấy phục hồi tế bào myeloma (400x).

(A) Tế bào myeloma khi mới được nuôi cấy phục hồi;

(B) Tế bào myeloma sau 24 giờ nuôi cấy phục hồi;

(C) Tế bào myeloma sau 48 giờ nuôi cấy phục hồi.

- Phục hồi tế bào myeloma: Ống cryo bảo quản tế bào myeloma ở -196°C trong bình nitơ lỏng, sau đó được mang ra rã đông ở 37°C , loại bỏ phần dịch trong ống, rửa

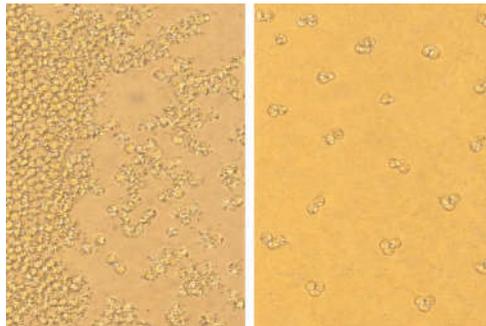
lại tế bào và ly tâm. Kết quả tế bào sau khi ly tâm cho thấy có cặn tế bào, tiến hành kiểm tra bằng buồng đếm hồng cầu (với độ phóng đại 400x) thấy có các tế bào myeloma, sau đó chia tế bào vào chai nuôi cấy T75, kết bào myeloma khi mới nuôi cấy phục hồi được thể hiện ở Hình 3.16 A.

Sau 24 giờ nuôi cấy phục hồi, các tế bào myeloma được rửa đông từ bảo quản nitơ lỏng cho thấy hình dạng tròn, tập trung thành từng cụm nhỏ. Một phần tế bào sống bám dính vào đáy chai nuôi cấy, trong khi một số tế bào chết hoặc chưa bám dính vẫn lơ lửng trong môi trường nuôi cấy (Hình 3.16 B).

Sau 48 giờ, xung quanh các cụm tế bào myeloma ban đầu xuất hiện nhiều tế bào mới tăng sinh, mật độ tế bào gia tăng rõ rệt (Hình 3.16 C). Tế bào tiếp tục được nuôi trong tủ ấm ở 37°C, 5% CO₂ để đạt mật độ thích hợp cho cấy chuyển.

- Cấy chuyển và nhân giống tế bào myeloma: Sau 72 giờ nuôi cấy phục hồi, mật độ tế bào đạt khoảng 80% diện tích bề mặt chai nuôi. Quan sát dưới kính hiển vi quang học (400x) cho thấy tế bào có hình tròn, tập trung thành cụm dày, điển hình cho hình thái của dòng myeloma (Hình 3.17A).

Tế bào myeloma là dòng bán bám dính, thường bám yếu vào bề mặt chai nuôi cấy. Khi lắc nhẹ hoặc gõ đáy chai, các tế bào sẽ bong ra và phân tán trong môi trường, thuận lợi cho việc thu hoạch và cấy chuyển sang chai mới (Hình 3.17B) nhằm nhân sinh khối tế bào phục vụ cho quá trình dung hợp tạo hybridoma (lai giữa tế bào myeloma và tế bào B).

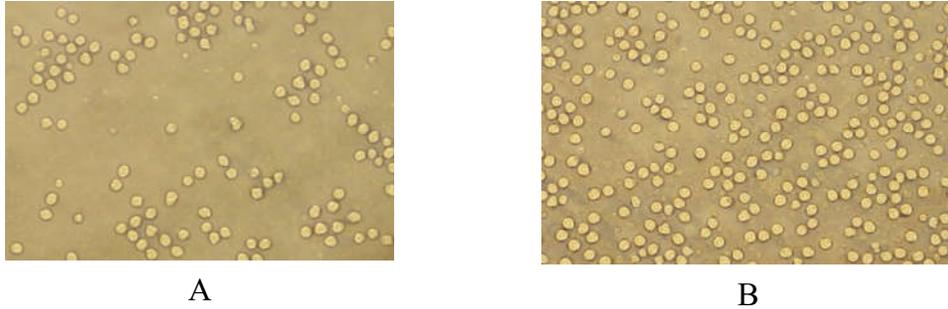


Hình 3.17. Quan sát tế bào myeloma dưới kính hiển vi (400x)

A) Trước khi cấy chuyển; B) Sau khi cấy chuyển

Sau 24 giờ nuôi tăng lượng trong chai mới, tế bào sống tiếp tục bám dính dưới đáy chai, trong khi tế bào chết vẫn lơ lửng trong môi trường nuôi cấy (Hình 3.18A).

Sau 48 giờ, mật độ tế bào tăng nhanh, các cụm tế bào mở rộng và liên kết với nhau, dần phủ kín bề mặt chai nuôi cấy. Tiếp tục ủ tế bào ở 37°C, 5% CO₂ và quan sát hằng ngày. Khi tế bào đạt độ phủ khoảng 80% (sau 72 giờ), tiến hành thu hoạch tế bào để chuẩn bị dung hợp với tế bào lympho B được phân lập từ chuột (Hình 3.18B).



Hình 3.18. Quan sát quá trình nuôi cấy tăng lượng tế bào myeloma (400x)
 (A) Tế bào myeloma sau khi nuôi cấy tăng lượng 24 giờ;
 (B) Tế bào myeloma sau khi nuôi cấy tăng lượng 72 giờ

Sau khi khôi phục, tế bào myeloma được bảo quản trong nitơ lỏng. Kết quả quan sát trên kính hiển vi (với độ phóng đại 400x) cho thấy tế bào tập trung thành từng cụm, có hình thái của tế bào myeloma.

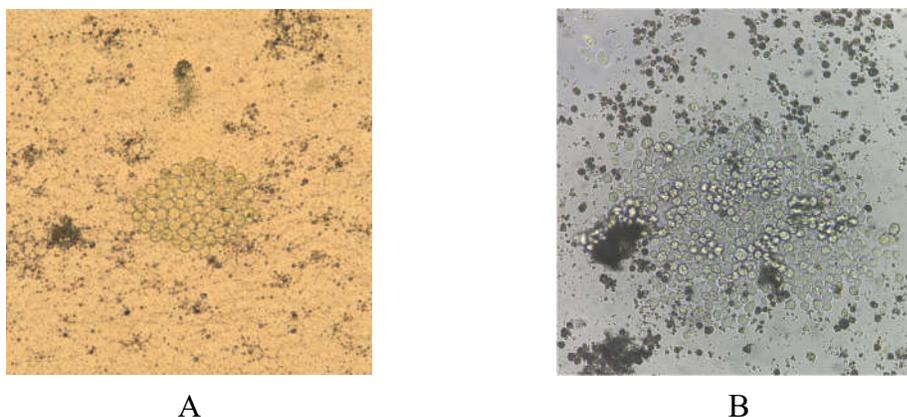
Kết quả trên cho thấy tế bào myeloma đã cấy chuyển thành công. Nhân giống, tăng sinh được số lượng lớn tế bào myeloma để dùng cho quá trình dung hợp tế bào myeloma với lympho B.

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

Tế bào lympho B được dung hợp với tế bào myeloma và nuôi cấy trong môi trường HAT trên đĩa 96 giếng, theo dõi hàng ngày để phát hiện sự hình thành tế bào lai. Sau 7 ngày nuôi cấy lần dung hợp thứ nhất không quan sát thấy tế bào lai, thí nghiệm được tiến hành dung hợp lại lần thứ hai giữa tế bào myeloma và tế bào lympho B thu được từ lách chuột. Kết quả quan sát ở các mốc 5 và 10 ngày nuôi cấy của lần dung hợp thứ hai được trình bày trong Hình 3.19.

Sau 5 ngày nuôi cấy, ở một số giếng bắt đầu quan sát thấy các cụm tế bào lai xuất hiện sớm, chiếm khoảng 30% số giếng, với hình thái các tế bào tròn, tăng sinh và tồn tại trong môi trường HAT, trong khi các tế bào lympho B và myeloma không dung hợp bị loại bỏ dần.

Đến ngày thứ 10 nuôi cấy, các cụm tế bào lai phát triển ổn định, tỷ lệ giếng có hybridoma đạt khoảng 70% (65–70/96 giếng), với mật độ tế bào cao, sẵn sàng cho các bước sàng lọc khả năng tiết kháng thể bằng ELISA. Thời gian xuất hiện và phát triển của hybridoma trong nghiên cứu này phù hợp với các báo cáo cho thấy hybridoma thường được quan sát rõ và đủ điều kiện sàng lọc trong khoảng 7–10 ngày nuôi cấy trong môi trường HAT [126, 127].



Hình 3.19. Cụm tế bào lai được quan sát trên kính hiển vi quang học (400x)
(A) Sau 5 ngày nuôi cấy và (B) Sau 10 ngày nuôi cấy

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

Kết quả trong bảng 3.10 cho thấy:

+ Blank là giếng chỉ chứa tất cả thành phần phản ứng (đệm, chất nền TMB,...) nhưng không có kháng nguyên hoặc không có kháng thể. OD blank đo được ở cả kháng nguyên tái tổ hợp (0.0500) và kháng nguyên *E. coli* BL21 (0.0480) rất thấp, tiệm cận giá trị lý tưởng cho tín hiệu nền. Kết quả này chứng minh độ sạch, độ chính xác cao của kỹ thuật ELISA được sử dụng trong nghiên cứu.

+ Đối chứng Âm (Negative) là giếng ELISA chứa tất cả thành phần như mẫu thử (kháng nguyên gắn bản, chất nền, dung dịch rửa...) nhưng không có kháng thể đơn dòng đặc hiệu. OD negative ở cả kháng nguyên tái tổ hợp và *E. coli* BL21 đều thấp (0.07), với SNR = 0.97, khẳng định độ đặc hiệu, tránh dương tính giả.

+ Đối chứng Dương (Positive) là giếng ELISA được xử lý với kháng thể đơn dòng thương mại đã biết đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp. Giá trị OD positive của mẫu kháng nguyên tái tổ hợp đạt 1.50, trong khi OD ở mẫu *E. coli* BL21 chỉ 0.06, với SNR = 25.0. Kết quả này thể hiện độ nhạy và tính đặc hiệu cao của hệ thống ELISA cũng như của kháng thể thương mại được dùng làm đối chứng.

Trong quá trình sàng lọc, mỗi kháng nguyên tái tổ hợp đều chọn được hai dòng tế bào lai sinh kháng thể tốt nhất. Các dòng tế bào lai này được kiểm tra song song với kháng nguyên *E. coli* BL21, cho thấy phản ứng mạnh với kháng nguyên mục tiêu, tuy nhiên vẫn còn tín hiệu đáng kể khi phản ứng với kháng nguyên *E. coli* BL21 (OD dao động từ 0.24 – 0.38).

Theo hướng dẫn của Thermo Fisher Scientific [128], giá trị SNR là chỉ số quan trọng phản ánh khả năng phân biệt tín hiệu đặc hiệu so với tín hiệu nền trong phản ứng ELISA. Trong nghiên cứu này, các dòng tế bào lai cho giá trị SNR dao động từ

3.6–6.4, cho thấy các kháng thể đơn dòng thu được đã có khả năng nhận diện rõ rệt kháng nguyên tái tổ hợp so với nền âm, đáp ứng yêu cầu sàng lọc ban đầu các dòng hybridoma tiết kháng thể. So với kháng thể đơn dòng thương mại sử dụng làm đối chứng (SNR = 25.0), các kháng thể thu được trong nghiên cứu có giá trị SNR thấp hơn, phản ánh thực tế rằng các kháng thể này mới ở giai đoạn sàng lọc ban đầu, chưa trải qua các bước tinh sạch, chọn lọc ái lực và loại bỏ phản ứng chéo như các sản phẩm thương mại. Tín hiệu ELISA ghi nhận được khi phản ứng với kháng nguyên *E. coli* BL21 cho thấy vẫn còn mức độ phản ứng nền nhất định, đây là hiện tượng thường gặp khi sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp biểu hiện trong hệ vi khuẩn và kháng thể chưa được tối ưu hóa. Mặc dù vậy, các kết quả này khẳng định quy trình sàng lọc và tách dòng đã thành công trong việc tạo ra các tế bào lai có khả năng tiết kháng thể nhận diện kháng nguyên mục tiêu. Đặc biệt, các dòng TXN1 và TXN2 cho giá trị SNR cao hơn so với các dòng AFP và DCP, cho thấy tiềm năng tốt về độ nhạy và tính đặc hiệu, là cơ sở quan trọng để lựa chọn các dòng phù hợp cho bước tạo báng, tinh sạch và nâng cao độ đặc hiệu ở các giai đoạn nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.10. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra tính đặc hiệu của các dòng tế bào lai sử dụng kháng nguyên gắn bản tương ứng và kháng nguyên *E. coli* BL21 trước khi tiêm chuột tạo báng.

Dòng tế bào lai	Kháng nguyên gắn bản		SNR
	OD _{450nm} - kháng nguyên tái tổ hợp	OD _{450nm} - kháng nguyên <i>E. coli</i> chủng BL21	
Blank	0.0500	0.0480	-
Negative	0.0700	0.0720	0.97
Positive	1.5000	0.0600	25.0
Dòng AFP1	1.4706	0.3152	4.67
Dòng AFP2	1.6747	0.3455	4.85
Dòng DCP1	1.4869	0.3498	4.25
Dòng DCP2	1.3895	0.3818	3.64
Dòng TXN1	1.5419	0.2423	6.36
Dòng TXN2	1.2936	0.2391	5.41

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

Sau 6-7 ngày tiêm dòng tế bào lai AFP1, một số chuột thí nghiệm đã xuất hiện báng tại xoang bụng. Biểu hiện xuất hiện báng được thể hiện khi bụng chuột bắt đầu phình to, da bụng căng lên, bên trong chứa nhiều dịch báng. Tuy nhiên vẫn còn 1 trong tổng số 5 chuột không thấy sự xuất hiện báng. Các chuột được tiếp tục theo dõi,

sau đó tiến hành thu dịch báng của mỗi chuột sau 3-4 ngày xuất hiện báng. Như vậy, đánh giá hiệu quả tiêm tạo báng trên chuột được thể hiện rất tốt khi tiêm dòng tế bào lai AFP1 với liều tiêm 2×10^6 tế bào/con. Bốn trong tổng số năm chuột xuất hiện báng sau tiêm khi sử dụng dòng tế bào lai AFP1 với liều lượng này. Thời gian xuất hiện báng cũng khá ngắn từ 6-7 ngày. Đồng thời, đối với các chuột xuất hiện báng thì lượng dịch báng trung bình thu được là cao nhất khoảng 3 ml/con cho thấy lượng dịch báng thu được là khá tốt. Kết quả cho ta thấy rằng, đã gây báng thành công trên chuột thí nghiệm BALB/c khi tiêm dòng tế bào lai AFP1 với tổng lượng dịch báng thu được là 11 ml.

Đối với dòng tế bào lai AFP2 cũng được lựa chọn liều tiêm 0,5 ml pristane/con và lượng tế bào tiêm vào chuột là 2×10^6 tế bào/con để cho hiệu quả gây báng tốt nhất. Kết quả cả 5 chuột đều tạo báng tốt và thu nhận được dịch báng sau 9-10 ngày. Tổng lượng dịch báng khi tiêm dòng tế bào lai dòng AFP2 là 12 ml. Các dịch báng đã thu nhận được đem ly tâm để loại bỏ cặn tế bào và các thành phần máu khác. Dịch báng sau ly tâm được chứa trong các ống bảo quản và được bảo quản lạnh tại 4°C trong thời gian ngắn nhằm sử dụng đánh giá hiệu quả kháng thể thu được chứa trong dịch báng chuột và tại -80°C cho tới khi thu nhận và tinh sạch kháng thể đơn dòng chứa trong dịch báng.

Kết quả trên cho thấy, việc tiêm các dòng tế bào lai AFP1 và AFP2 đã cho kết quả gây báng rất tốt, với tỷ lệ thành công lần lượt là 80% và 100%. Thời gian xuất hiện báng trong thời gian ngắn và lượng dịch báng thu được nhiều (lần lượt là 11 ml và 12 ml) cho thấy nghiên cứu đã phát triển thành công hai dòng tế bào lai AFP1 và AFP2 khi nuôi cấy các dòng tế bào này trong khoang phúc mạc của chuột.

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

Sau 5-6 ngày tiêm dòng tế bào lai DCP1, một số chuột thí nghiệm đã xuất hiện báng tại xoang bụng. Tuy nhiên vẫn còn 1 trong tổng số 5 chuột không thấy sự xuất hiện báng. Các chuột được tiếp tục theo dõi, sau đó tiến hành thu dịch báng của mỗi chuột sau 3 - 4 ngày xuất hiện báng. Đánh giá hiệu quả tiêm tạo báng trên chuột được thể hiện rất tốt khi tiêm dòng tế bào lai DCP1 với liều tiêm 2×10^6 tế bào/con. Bốn trong tổng số năm chuột xuất hiện báng sau tiêm khi sử dụng dòng tế bào lai DCP1 với liều lượng này. Thời gian xuất hiện báng cũng khá ngắn từ 5-6 ngày. Đồng thời, đối với các chuột xuất hiện báng thì lượng dịch báng trung bình thu được là cao nhất khoảng 3.5 ml/con cho thấy lượng dịch báng thu được là khá tốt. Kết quả cho ta thấy rằng, đã gây báng thành công trên chuột thí nghiệm BALB/c khi tiêm dòng tế bào lai DCP1 với tổng lượng dịch báng thu được là 12 ml.

Đối với dòng tế bào lai DCP2 cũng được lựa chọn liều tiêm 0.5 ml pristane/con và lượng tế bào tiêm vào chuột là 2×10^6 tế bào/con để cho hiệu quả gây báng tốt nhất. Kết quả thu nhận được tổng lượng dịch báng khi tiêm dòng tế bào lai dòng DCP2 là 14 ml. Các dịch báng đã thu nhận được đem ly tâm để loại bỏ cặn tế bào và các thành phần máu khác. Dịch báng sau ly tâm được chứa trong các ống bảo quản và được bảo quản tại -80°C cho tới khi thu nhận và tinh sạch kháng thể đơn dòng trong dịch báng.

Kết quả này cho thấy, hai dòng tế bào lai DCP1 và DCP2 đã gây báng tốt khi được tiêm vào trong khoang phúc mạc của chuột với lượng dịch báng thu được lần lượt là 12 ml và 14 ml.

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

Sau khoảng 6 ngày tiêm dòng tế bào lai TXN1, một số chuột thí nghiệm bắt đầu có dấu hiệu xuất hiện báng tại xoang bụng. Tất cả 5 chuột đều có dấu hiệu xuất hiện báng. Các chuột tiếp tục được theo dõi, và dịch báng được thu từ mỗi chuột sau 3 - 4 ngày khi báng xuất hiện. Kết quả thu được cho thấy lượng dịch báng thu được từ các chuột khác nhau khi tiêm dòng tế bào lai TXN1 có sự biến đổi rõ rệt. Lượng dịch báng thu được từ các chuột từ 2 ml đến 3 ml khi tiêm cùng một lượng tế bào lai với liều 2×10^6 tế bào/con. Hiệu quả tiêm tạo báng trên chuột đạt kết quả rõ rệt khi tiêm dòng tế bào lai TXN1 với liều tiêm 2×10^6 tế bào/con. Năm chuột đã xuất hiện báng sau khi tiêm dòng tế bào lai TXN1 ở liều này. Thời gian xuất hiện báng cũng khá nhanh, 6 ngày sau tiêm. Đối với các chuột có báng, lượng dịch báng thu được trung bình cao nhất là khoảng 2.5 ml/con, cho thấy lượng dịch báng thu được là khá ổn định. Kết quả này chứng minh rằng tiêm dòng tế bào lai TXN1 thành công, với tổng lượng dịch báng thu được lên tới 11 ml.

Đối với dòng tế bào lai TXN2, liều tiêm 0.5 ml pristane/con và lượng tế bào 2×10^6 tế bào/con cũng được sử dụng, đem lại hiệu quả tạo báng tốt nhất. Tổng lượng dịch báng thu được khi tiêm dòng tế bào lai TXN2 là 13 ml. Dịch báng sau khi thu được sẽ được ly tâm để loại bỏ cặn tế bào và các thành phần máu khác. Sau khi ly tâm, dịch báng được bảo quản ở 4°C trong thời gian ngắn để đánh giá hiệu giá kháng thể có trong dịch báng chuột và sẽ được bảo quản ở -80°C cho tới khi thu nhận và tinh sạch kháng thể đơn dòng.

Như vậy, hai dòng tế bào lai TXN1 và TXN2 đã gây báng tốt với tỷ lệ chuột tạo báng là 100%, dịch báng được tạo ra với thời gian ngắn và số lượng nhiều trong khoang phúc mạc chuột, với lượng dịch báng thu được lần lượt là 11 ml và 13 ml.

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 ở các chuột dao động trong khoảng 5 – 10 ngày sau khi tiêm tế bào. Đây là khoảng thời gian tương đối ngắn so với một số báo cáo trước đây. Nghiên cứu của Jones và cộng sự (1990) cho biết cần tới khoảng 17 ngày để đạt 90% tỉ lệ chuột tạo báng với mô hình sử dụng pristane [129]. Trong khi đó, nghiên cứu của Hoogenraad và cộng sự (1983) chứng minh rằng nếu tiêm 0.5 ml pristane 10 ngày trước sau đó tiêm 5×10^5 tế bào hybridoma, chỉ sau 2 ngày đã có dịch báng ở 100% chuột thử nghiệm [130]. Điều này cho thấy thời điểm và khoảng cách giữa tiêm pristane và tiêm tế bào ảnh hưởng lớn đến tốc độ hình thành dịch báng.

Liều tiêm tế bào cũng đóng vai trò quan trọng để đảm bảo tạo báng ổn định. Lacy và cộng sự (1986) sử dụng 10^6 tế bào loại Sp2/0-Ag14 để gây báng và thu được dịch với hàm lượng kháng thể lớn [131]. Ngược lại, liều thấp hơn thường dẫn đến tỷ lệ thành công giảm. Ngoài ra, tính ổn định của dòng hybridoma là một yếu tố then chốt: các dòng ổn định và có năng suất cao thường tạo báng dễ dàng hơn.

Như kết quả trên, ở các dòng AFP1 và DCP1 đạt hiệu suất thành công là 80%, có thể do khả năng tăng sinh hoặc sản xuất kháng thể kém hơn so với các dòng còn lại nhưng cũng có thể là nguyên nhân đến từ khả năng đáp ứng miễn dịch của cá thể chuột thí nghiệm.

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

Bảng 3.11. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra hiệu giá kháng thể trong dịch báng chuột từ dòng tế bào AFP1 và AFP2 tại các tỷ lệ pha loãng khác nhau

Tỷ lệ pha loãng	AFP1 (OD _{450nm})	AFP1 (SD)	AFP1 (CV %)	AFP2 (OD _{450nm})	AFP2 (SD)	AFP2 (CV %)
1:100	2.871	0.035	1.22	2.851	0.032	1.12
1:200	2.894	0.042	1.45	2.812	0.038	1.35
1:400	1.791	0.064	3.57	1.954	0.058	2.97
1:800	0.934	0.071	7.61	1.094	0.065	5.94
1:1600	0.532	0.051	9.58	0.671	0.060	8.94

Kết quả trong Bảng 3.11 cho thấy:

+ Phản ứng miễn dịch mạnh ở tỷ lệ pha loãng thấp

Cả hai dòng tế bào AFP1 và AFP2 đều cho giá trị OD_{450nm} rất cao tại các tỷ lệ pha loãng thấp (1:100 và 1:200), lần lượt đạt:

AFP1: 2.871 (1:100), 2.894 (1:200)

AFP2: 2.851 (1:100), 2.812 (1:200)

Các giá trị CV% thấp tại các tỷ lệ pha loãng này (AFP1: 1.22%–1.45%; AFP2: 1.12%–1.35%) cho thấy các phép đo có độ lặp lại tốt, kết quả đáng tin cậy.

+ Giá trị OD_{450nm} giảm dần khi tỷ lệ pha loãng tăng

Khi tỷ lệ pha loãng tăng lên (1:400, 1:800, 1:1600), cả hai dòng tế bào đều ghi nhận sự giảm rõ rệt giá trị OD_{450nm}

AFP1: 1.791 (1:400) giảm xuống 0.532 (1:1600)

AFP2: 1.954 (1:400) giảm xuống 0.671 (1:1600)

Điều này phản ánh đúng quy luật thay đổi nồng độ kháng thể khi tăng pha loãng mẫu.

+ AFP2 duy trì phản ứng mạnh hơn AFP1

Tại các tỷ lệ pha loãng cao (1:800 và 1:1600), dòng AFP2 có giá trị OD_{450nm} cao hơn AFP1 (1.094 so với 0.934 ở tỷ lệ pha loãng 1:800; 0.671 so với 0.532 ở tỷ lệ pha loãng 1:1600). Điều này cho thấy dòng AFP2 có khả năng tạo ra lượng kháng thể đặc hiệu cao hơn, hoặc kháng thể có ái lực mạnh hơn với kháng nguyên ở cùng nồng độ.

Kết luận: Cả hai dòng tế bào lai AFP1 và AFP2 đều thể hiện khả năng sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu với số lượng lớn trong dịch báng chuột thu được. Kết quả này chứng tỏ tính hiệu quả của quy trình gây miễn dịch, cũng như khả năng của các dòng tế bào AFP1 và AFP2 trong việc tạo ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu, đáp ứng tốt yêu cầu cho các bước nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo.

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

Bảng 3.12. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra hiệu giá kháng thể trong dịch báng chuột từ dòng tế bào DCP1 và DCP2 tại các tỷ lệ pha loãng khác nhau.

Tỷ lệ pha loãng	DCP1 (OD _{450nm})	DCP1 (SD)	DCP1 (CV %)	DCP2 (OD _{450nm})	DCP2 (SD)	DCP2 (CV %)
1:100	2.843	0.041	1.44	2.203	0.055	2.50
1:200	2.887	0.049	1.70	2.210	0.052	2.36
1:400	1.978	0.061	3.09	1.463	0.042	2.87
1:800	0.923	0.056	6.06	0.801	0.057	7.11
1:1600	0.563	0.045	7.99	0.501	0.048	9.59

Kết quả Bảng 3.12 cho thấy:

+ Cả DCP1 và DCP2 đều cho thấy phản ứng kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên DCP, với mức độ phản ứng giảm dần khi tỷ lệ pha loãng tăng:

DCP1: OD_{450nm} giảm từ 2.843 (1:100) xuống 0.563 (1:1600).

DCP2: OD_{450nm} giảm từ 2.203 (1:100) xuống 0.501 (1:1600).

+ DCP1 tạo ra kháng thể mạnh hơn DCP2, với OD_{450nm} cao hơn ở mọi tỷ lệ pha loãng. DCP2 tuy có đáp ứng kém hơn DCP1, nhưng vẫn duy trì độ ổn định tốt với CV% luôn < 10%.

Kết luận: Cả hai dòng tế bào là DCP1 và DCP2 đã được phát triển thành công khi nuôi cấy trong khoang phúc mạc của chuột, và phù hợp để tiếp tục phát triển kháng thể đơn dòng đặc hiệu đối với DCP.

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

Kết quả Bảng 3.13 cho thấy:

+ Ở tất cả các tỷ lệ pha loãng, TXN1 có giá trị OD_{450nm} cao hơn so với TXN2, chứng tỏ TXN1 tạo ra kháng thể mạnh hơn. Mặc dù OD_{450nm} của TXN2 thấp hơn TXN1, CV% của TXN2 có xu hướng thấp hơn TXN1 ở các tỷ lệ pha loãng thấp (2.05% và 2.77% so với 2.19% và 2.48% của TXN1), cho thấy TXN2 có sự ổn định cao hơn trong các phản ứng.

+ Cả hai dòng đều có sự suy giảm rõ rệt trong phản ứng miễn dịch khi tỷ lệ pha loãng tăng lên, nhưng TXN1 duy trì phản ứng mạnh hơn ở các tỷ lệ pha loãng thấp và trung bình. TXN2 có sự suy giảm mạnh hơn khi ở tỷ lệ pha loãng cao (đặc biệt tại tỷ lệ pha loãng 1:1600 với CV% lên đến 10.47%). Tuy nhiên, điều này là bình thường và phù hợp với quy trình ELISA.

Bảng 3.13. Kết quả phản ứng ELISA kiểm tra hiệu giá kháng thể trong dịch báng chuột từ dòng tế bào TXN1 và TXN2 tại các tỷ lệ pha loãng khác nhau.

Tỷ lệ pha loãng	TXN1 (OD _{450nm})	TXN1 (SD)	TXN1 (CV %)	TXN2 (OD _{450nm})	TXN2 (SD)	TXN2 (CV %)
1:100	1.919	0.042	2.19	1.851	0.038	2.05
1:200	1.892	0.047	2.48	1.624	0.045	2.77
1:400	1.563	0.053	3.39	1.268	0.051	4.02
1:800	1.021	0.065	6.36	0.988	0.070	7.07
1:1600	0.654	0.053	8.11	0.562	0.059	10.47

Kết luận: Các kết quả này cho thấy cả TXN1 và TXN2 đều có khả năng sản xuất kháng thể đặc hiệu và đều phù hợp để tiếp tục trong quá trình sàng lọc và phát triển kháng thể đơn dòng.

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng AFP1, AFP2, DCP1 đạt nồng độ OD_{450nm} > 2.8 ở tỷ lệ pha loãng 1:200 và vẫn duy trì >1.7 ở tỷ lệ pha loãng 1:400, cho thấy khả năng gắn kháng nguyên mạnh mẽ. Các dòng này vẫn duy trì tín hiệu rõ ràng ở tỷ lệ pha loãng 1:800 – 1:1600, chứng tỏ khả năng sản xuất kháng thể của chúng là rất cao.

Trong khi đó, dòng DCP2, TXN1, TXN2 có giá trị OD_{450nm} thấp hơn, nhưng vẫn duy trì OD_{450nm} > 1.2 ở tỷ lệ pha loãng 1:400, cho thấy các kháng thể này vẫn có khả năng phát hiện tốt, mặc dù mức độ kháng thể không mạnh như các dòng AFP1/AFP2/DCP1.

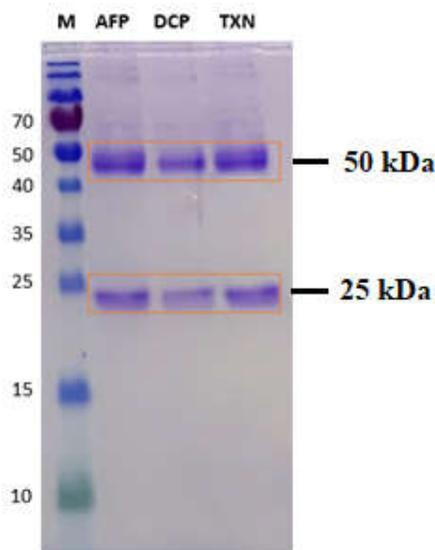
So với các nghiên cứu khác, ở tỷ lệ pha loãng 1:400 – 1:800, mức OD_{450nm} trong nghiên cứu của chúng tôi là khá cao. Cụ thể, dòng AFP1/AFP2/DCP1 đạt OD_{450nm} trong khoảng 1.7 – 2.8 tại tỷ lệ pha loãng 1:400, cao hơn nhiều so với ngưỡng OD_{450nm} 0.2–0.3 được nhiều tác giả sử dụng làm tiêu chuẩn [131]. Nếu sử dụng ngưỡng OD_{450nm} cắt là 0.3, hiệu giá kháng thể từ AFP1/AFP2/DCP1 sẽ có hiệu giá \geq 1:800. Trong các nghiên cứu về hiệu giá kháng thể cao (10^5 – 10^6), OD_{450nm} thường phải \leq 0.3 ở tỷ lệ pha loãng cao nhất [132], nhưng ở đây giá trị OD_{450nm} từ AFP1/AFP2/DCP1 cao rõ rệt, dao động từ 1.7 đến 2.8, cho thấy khả năng gắn kháng nguyên rất mạnh.

Mặc dù DCP2/TXN1/TXN2 có OD_{450nm} thấp hơn (khoảng 1.2 tại 1:400), nhưng xét về tỉ lệ pha loãng và ngưỡng OD_{450nm}, các kháng thể từ các dòng này vẫn có hiệu giá cao so với ngưỡng dương thông thường.

Kết luận chung: Xét về ngưỡng OD_{450nm} và tỷ lệ pha loãng, kháng thể từ AFP1/AFP2/DCP1 có hiệu giá cao hơn, với tín hiệu mạnh duy trì ở tỷ lệ pha loãng lớn, trong khi DCP2/TXN1/TXN2 vẫn có kháng thể có hiệu giá đáng kể, mặc dù thấp hơn.

3.2.6. Kết quả tinh sạch kháng thể đơn dòng

Hình 3.20 minh họa kết quả điện di SDS-PAGE của ba kháng thể đơn dòng kháng AFP, DCP và TXN sau tinh sạch.



Hình 3.20. Kết quả tinh sạch kháng thể đơn dòng bằng cột sắc ký ái lực qua cột protein G.

M3: 100 kDa Thang chuẩn Protein đã nhuộm.

Dựa vào thang marker Protein, có thể quan sát được hai băng protein chính trong mỗi mẫu, nằm ở khoảng 50 kDa và 25 kDa. Hai băng này tương ứng với chuỗi

nặng (50 kDa) và chuỗi nhẹ (25 kDa) của kháng thể IgG [133]. Không có dải protein phụ nào khác xuất hiện, cho thấy hầu như không còn tạp chất trong các mẫu tinh sạch. Kết quả thực nghiệm trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với tiêu chuẩn thực hành và tài liệu quốc tế đã công bố khi SDS-PAGE của kháng thể tinh sạch thường ghi nhận độ tinh khiết trên 95% [134]. Chúng tôi quy trình tinh sạch bằng cột Protein A/G của nghiên cứu đã thu được kháng thể với độ tinh khiết rất cao.

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

- Đặc điểm về tuổi và giới:

+ Phân bố các nhóm tuổi: Bệnh nhân mắc HCC được chia thành 3 nhóm tuổi (Trẻ: < 45 tuổi; Trung niên 45-59 tuổi; Cao tuổi, già \geq 60).

Bảng 3.14. Phân bố tuổi của nhóm bệnh nhân HCC

Nhóm tuổi	n	Tỷ lệ %
Trẻ (< 45)	5	10.64
Trung niên (45 – 59)	8	17.02
Cao tuổi, già (\geq 60)	34	72.34
Tổng	47	100

Kết quả phân bố tuổi của bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) cho thấy, nhóm bệnh nhân cao tuổi (\geq 60 tuổi) chiếm tỷ lệ cao nhất, lên đến 72.34% tổng số ca bệnh. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó bệnh nhân mắc HCC thường có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất ở độ tuổi \geq 60 tuổi. Cụ thể, theo một nghiên cứu của Kim (2011), tỷ lệ mắc HCC ở nhóm bệnh nhân trên 60 tuổi chiếm khoảng 65% tổng số ca bệnh [135]. Xu hướng này cũng được xác nhận trong nghiên cứu của Weinmann (2014), với việc tỷ lệ mắc HCC cao nhất được ghi nhận ở nhóm tuổi cao hơn, với độ tuổi trung bình tăng từ 63.4 tuổi lên 65.7 tuổi trong giai đoạn 1998-2009 [136]. Điều này có thể giải thích phần nào do sự gia tăng các yếu tố nguy cơ ở nhóm người cao tuổi, chẳng hạn như béo phì, đái tháo đường, và hội chứng chuyển hóa, dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ mắc HCC. Mặc dù nhóm bệnh nhân cao tuổi chiếm tỷ lệ lớn, tỷ lệ mắc HCC cũng không hề thấp ở nhóm bệnh nhân dưới 45 tuổi. Trong một số nghiên cứu khác, như của Ha (2016), đã chỉ ra rằng HCC vẫn có thể xảy ra ở những người trẻ tuổi dưới 45, với tỷ lệ khoảng 16% trong một số nghiên cứu ở Mỹ [137]. Điều này khẳng định rằng HCC không phải là bệnh chỉ xảy ra ở người cao tuổi mà còn có thể

xảy ra ở nhóm tuổi trẻ, mặc dù tỷ lệ này không cao. Trong khi đó, theo nghiên cứu của Rich (2020), tỷ lệ mắc HCC ở nhóm người dưới 50 tuổi đang có xu hướng giảm trong những năm gần đây, đặc biệt là ở các quốc gia phát triển [138]. Một yếu tố quan trọng có thể giải thích điều này là sự cải thiện trong việc phát hiện và điều trị viêm gan virus, đặc biệt là viêm gan virus B và C, dẫn đến giảm tỷ lệ chuyển sang ung thư gan. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy sự gia tăng tỷ lệ mắc bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, béo phì và đái tháo đường ở nhóm tuổi trẻ dưới 45, có thể sẽ làm đảo ngược xu hướng này trong tương lai [139].

+ Phân bố về giới: Kết quả Bảng 3.15 cho thấy bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan đa số là nam giới, chiếm đến 87.2% tổng số ca bệnh. Tỷ lệ nam/nữ mắc HCC trong nghiên cứu này là khoảng 7:1.

Bảng 3.15. Phân bố giới tính của nhóm bệnh nhân HCC

Giới tính	n	Tỷ lệ %
Nam	41	87.2
Nữ	6	12.8
Tổng	47	100

Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới, cho rằng HCC có sự khác biệt rõ rệt về giới tính, với tỷ lệ mắc bệnh cao hơn ở nam giới so với nữ giới, thường trong khoảng từ 2:1 đến 8:1 [137, 138, 139]. Các nghiên cứu này đã chỉ ra một số yếu tố có thể giải thích sự khác biệt về giới tính trong mắc HCC, bao gồm: Yếu tố lối sống: Nam giới thường có tỷ lệ sử dụng rượu, hút thuốc lá và tiếp xúc với các chất gây ung thư cao hơn nữ giới; Yếu tố nội tiết: Estrogen được cho là có tác dụng bảo vệ đối với sự phát triển của HCC, trong khi androgen lại có thể thúc đẩy sự tiến triển của bệnh; Yếu tố miễn dịch: Các nghiên cứu trên động vật cho thấy androgen có thể làm tăng viêm và ức chế miễn dịch, từ đó thúc đẩy sự phát triển của HCC [139].

- Đặc điểm dịch tễ và các yếu tố nguy cơ: Bệnh nhân mắc ung thư biểu mô gan có yếu tố nguyên nhân thường gặp là nhiễm HBV với tỷ lệ 81% trong nhóm nghiên cứu.

Bảng 3.16. Thống kê các yếu tố nguyên nhân trên nhóm bệnh nhân HCC

Yếu tố nguyên nhân	Số lượng	Tỷ lệ %
HBV	38	81
HCV	5	10.6
Đồng nhiễm HBV,HCV	1	2.1
Xơ gan do rượu	3	6.3
Tổng	47	100

Đồng nhiễm với HCV là 1 trường hợp, chiếm 2.1%. Xơ gan do rượu cũng là một nguyên nhân thường gặp với tỷ lệ 6.3% trong nhóm nghiên cứu. Trong nhóm nghiên cứu không có bệnh nhân mắc HCC do nguyên nhân khác (Bảng 3.16).

Các nghiên cứu trên thế giới cũng đã chỉ ra rằng nhiễm HBV và HCV là những yếu tố nguy cơ hàng đầu góp phần vào sự phát triển của HCC. Nhiễm HBV được xem là nguyên nhân chính, đặc biệt ở các nước châu Á, trong khi nhiễm HCV là yếu tố nguy cơ chính ở các nước phương Tây [139, 140].

Ngoài ra, xơ gan do rượu cũng là một yếu tố nguy cơ quan trọng, đặc biệt ở các nước phương Tây [141]. Một số yếu tố nguy cơ khác cũng được các nghiên cứu chỉ ra, bao gồm béo phì, tiểu đường, hội chứng chuyển hóa, tiền sử gia đình mắc bệnh nhân mắc HCC, phơi nhiễm với aflatoxin [142]. Tuy nhiên, vai trò của các yếu tố này vẫn chưa được xác định rõ ràng.

- Sự phân chia các nhóm theo giai đoạn bệnh:

Bảng 3.17. Thống kê các giai đoạn HCC của nhóm bệnh nhân nghiên cứu

Giai đoạn		Số lượng	Tỷ lệ %
Sớm	Sớm	8	17
Muộn	Trung gian	23	48.9
	Tiến triển	11	23.4
	Cuối	5	10.6
Tổng		47	100

Chỉ có 8 bệnh nhân được phát hiện ở giai đoạn sớm, chiếm 17% tổng số bệnh nhân mắc HCC thu thập được. Số bệnh nhân ở các giai đoạn trung gian, tiến triển hoặc cuối được coi là giai đoạn muộn, chiếm 83%, và gấp ≈ 5 lần so với số bệnh nhân giai đoạn sớm.

Tỷ lệ chẩn đoán HCC giai đoạn muộn cao trong nhóm nghiên cứu (83%) phù hợp với xu hướng toàn cầu, trong đó hầu hết các trường hợp HCC được phát hiện ở giai đoạn tiến triển [143]. Điều này thường là do thiếu các chương trình sàng lọc và giám sát hiệu quả, đặc biệt là ở những nơi có nguồn lực y tế hạn chế. Phát hiện sớm HCC là rất quan trọng, vì nó cho phép thực hiện các phương pháp điều trị chữa khỏi và cải thiện đáng kể kết quả của bệnh nhân.

Một số yếu tố góp phần vào chẩn đoán giai đoạn muộn của HCC, bao gồm bản chất bệnh không có triệu chứng ở giai đoạn đầu, những hạn chế của các công cụ sàng lọc hiện tại (như siêu âm và xét nghiệm AFP) và bệnh gan tiềm ẩn nguy cơ cao (ví dụ, xơ gan, viêm gan virus) thường xảy ra trước khi phát triển HCC [144].

Những nỗ lực cải thiện việc phát hiện sớm, như sử dụng các dấu ấn sinh học và kỹ thuật hình ảnh mới, là rất quan trọng để tăng tỷ lệ bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn sớm có thể điều trị được.

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

Đặc điểm nhóm bệnh nhân có bệnh lý tại gan (n = 10) bao gồm các bệnh như xơ gan (4 bệnh nhân), absces gan (2 bệnh nhân), viêm gan B mạn tính (3 bệnh nhân) và đồng nhiễm HBV/HCV (1 bệnh nhân) (Bảng 3.18). Mặc dù các bệnh lý này là yếu tố nguy cơ quan trọng đối với ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), nhưng không có bệnh nhân nào trong nhóm này mắc HCC. Kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu gần đây của Zhang (2024), cho thấy rằng một tỷ lệ đáng kể bệnh nhân mắc HCC không có tiền sử xơ gan, đặc biệt là ở những bệnh nhân có nhiễm HBV mạn tính mà không có xơ gan [145]. Điều này nhấn mạnh rằng HCC có thể phát triển ngay cả khi không có xơ gan, đặc biệt là ở những bệnh nhân có tải lượng virus cao hoặc nhiễm các chủng HBV có nguy cơ cao.

Bảng 3.18. Thống kê đặc điểm nhóm có bệnh lý tại gan

Nguyên nhân	Số lượng
Xơ gan	4
Absces gan	2
HBV	3
Đồng nhiễm HBV, HCV	1
Tổng	10

Đặc điểm nhóm bệnh nhân không có bệnh lý tại gan (n = 15) có độ tuổi tương đồng với nhóm bệnh nhân có bệnh lý tại gan, dao động từ 38 đến 79 tuổi.

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

Kết quả Bảng 3.19 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của giá trị các chỉ số sinh hóa giữa 3 nhóm: nhóm HCC, nhóm bệnh gan nhưng không ung thư và nhóm không mắc bệnh gan với $p < 0.001$. Đặc biệt nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư có chỉ số AST, ALT, Bilirubin và PT-INR trung bình cao nhất. Trong khi giá trị trung bình Albumin ở nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư là thấp nhất, giá trị này ở nhóm HCC và nhóm không mắc bệnh gan là khá tương đương.

Bảng 3.19. Các chỉ số sinh hóa đánh giá chức năng gan

Các chỉ số sinh hóa	Nhóm HCC	Nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư	Nhóm không mắc bệnh gan	P
AST (U/l)	73.01 ± 47.09	190.93 ± 319.34	40.92 ± 27.31	<0.001
ALT (U/l)	59.06 ± 36.97	312.2 ± 760.11	69.86 ± 91.47	<0.001
Bilirubin (μmol/l)	15.94 ± 7.47	92.15 ± 96.31	22.32 ± 20.03	<0.001
Albumin (g/l)	39.40 ± 4.66	29.88 ± 4.77	39.6 ± 2.5	<0.001
PT-INR	1.08 ± 0.14	1.25 ± 0.24	0.997 ± 0.092	<0.001

Giá trị AST và ALT phản ánh mức độ tổn thương tế bào gan. Giá trị cao ở nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư (đặc biệt ALT \pm 760.11) gợi ý tổn thương gan cấp tính (viêm gan virus cấp, tổn thương do rượu cấp, hoặc hoại tử tế bào gan mạnh). Trong viêm gan cấp, ALT thường tăng cao hơn AST, phù hợp với kết quả này. Độ lệch chuẩn lớn cho thấy sự không đồng nhất trong nhóm là do bao gồm cả bệnh nhân viêm gan cấp nặng và viêm gan mạn tính. Đối với nhóm HCC, HCC thường phát triển trên nền gan xơ hoặc viêm gan mạn. Tổn thương tế bào gan ở giai đoạn này thường ít hơn so với tổn thương cấp tính, dẫn đến AST/ALT tăng vừa phải. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng trong HCC, tỷ lệ AST/ALT thường >1 do thoái hóa tế bào gan và giải phóng AST từ ti thể [146].

Bilirubin tăng do ứ mật (tắc nghẽn đường mật) hoặc suy gan nặng (giảm khả năng chuyển hóa Bilirubin). Điều này thường gặp trong xơ gan mất bù, viêm đường mật, hoặc hội chứng gan thận điển hình cho nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư. Đối với nhóm HCC, Bilirubin chỉ tăng rõ khi HCC gây tắc mật (khối u lớn chèn ép đường mật) hoặc di căn.

Albumin ở nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư thấp nhất. Albumin thấp phản ánh suy giảm chức năng tổng hợp của gan, điển hình ở bệnh nhân xơ gan mất bù hoặc suy gan mạn tính. Gan không còn khả năng sản xuất đủ protein, dẫn đến phù và cổ trướng. Đối với nhóm HCC, Albumin bình thường cho thấy chức năng gan còn được bảo tồn, phù hợp với HCC ở những giai đoạn đầu hoặc trên nền gan xơ còn bù.

PT-INR của nhóm có bệnh gan nhưng không ung thư cao nhất, phản ánh tình trạng thiếu hụt các yếu tố đông máu (phụ thuộc vào gan như II, VII, IX, X). Điều này cho thấy rối loạn đông máu nghiêm trọng, thường gặp trong suy gan cấp hoặc xơ gan tiến triển. PT-INR của nhóm HCC cao hơn nhóm không mắc bệnh gan nhưng thấp hơn nhóm bệnh gan nhưng không ung thư, điều này có thể do gan suy giảm chức năng tổng hợp vừa phải, phù hợp với tổn thương gan mạn tính nhưng chưa đến mức mất bù [147].

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

Nhận xét và kết luận dựa vào kết quả bảng ma trận chuẩn độ pha loãng kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng tương ứng (Bảng 3.20; 3.21; 3.22):

Bảng 3.20. Ma trận chuẩn độ kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng AFP

Tỷ lệ pha loãng		<i>rAg AFP</i>						
		<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>	<i>1:32</i>	<i>1:64</i>	<i>0</i>
<i>mAb AFP</i>	<i>1:8</i>	1.313 \pm 0.025	1.386 \pm 0.018	1.424 \pm 0.020	1.578 \pm 0.030	0.997 \pm 0.022	0.687 \pm 0.019	0.132 \pm 0.007
	<i>1:16</i>	1.370 \pm 0.031	1.470 \pm 0.027	1.526 \pm 0.024	1.573 \pm 0.028	1.277 \pm 0.033	0.949 \pm 0.021	0.102 \pm 0.006

	<i>1:32</i>	1.530± 0.020	1.234± 0.023	1.507± 0.025	1.516± 0.019	1.473± 0.029	0.846± 0.018	0.103± 0.008	OD_{450nm}
	<i>1:64</i>	1.632± 0.027	1.453± 0.025	1.611± 0.026	1.642± 0.031	1.532± 0.028	0.942± 0.022	0.236± 0.015	
	<i>1:128</i>	1.521± 0.021	1.532± 0.020	1.763± 0.033	1.849± 0.025	1.569± 0.028	1.501± 0.029	0.335± 0.017	
	<i>1:256</i>	1.496± 0.024	1.642± 0.022	1.875± 0.034	1.953± 0.029	1.407± 0.027	1.239± 0.021	0.563± 0.022	
	<i>1:512</i>	1.163± 0.028	1.323± 0.026	1.542± 0.023	1.739± 0.031	1.313± 0.030	1.013± 0.027	0.237± 0.013	
	<i>0</i>	0.329± 0.015	0.377± 0.017	0.302± 0.012	0.523± 0.014	0.520± 0.016	0.356± 0.012	0.231± 0.011	

Kết quả Bảng 3.20 cho thấy, AFP – mAb AFP: OD cao nhất đạt tại tỷ lệ pha loãng kháng thể 1:128, kháng nguyên 1:16 → OD = 1.849 ± 0.025. Mẫu trắng (rAg 0, mAb 0) có OD thấp 0.231 ± 0.011 cho thấy độ nền thấp. Các tỷ lệ kháng thể từ 1:64 đến 1:256 đều cho OD >1.5 trong vùng kháng nguyên từ 1:8 đến 1:32.

Kết luận: Tương tác kháng nguyên – kháng thể rất mạnh, có thể chọn mAb 1:128 hoặc 1:256, rAg 1:8 hoặc 1:16 cho phản ứng tối ưu với tín hiệu mạnh và độ nền thấp.

Bảng 3.21. Ma trận chuẩn độ kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng DCP

Tỷ lệ pha loãng		rAg DCP							
		<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>	<i>1:32</i>	<i>1:64</i>	<i>0</i>	
mAb DCP	<i>1:8</i>	1.216± 0.023	1.199± 0.019	1.315± 0.026	1.106± 0.022	0.973± 0.017	0.889± 0.019	0.095± 0.008	OD_{450nm}
	<i>1:16</i>	1.079± 0.021	1.197± 0.024	1.398± 0.027	1.353± 0.020	1.304± 0.029	0.846± 0.018	0.102± 0.006	
	<i>1:32</i>	1.360± 0.020	1.234± 0.022	1.507± 0.024	1.516± 0.025	1.273± 0.028	0.846± 0.021	0.103± 0.007	
	<i>1:64</i>	1.576± 0.027	1.453± 0.025	1.865± 0.032	1.503± 0.021	1.115± 0.020	1.012± 0.018	0.115± 0.009	
	<i>1:128</i>	1.745± 0.023	1.461± 0.021	1.583± 0.028	1.397± 0.019	0.887± 0.016	1.150± 0.023	0.119± 0.010	
	<i>1:256</i>	1.563± 0.020	1.323± 0.024	1.467± 0.027	1.110± 0.022	0.825± 0.020	0.766± 0.021	0.012± 0.006	
	<i>1:512</i>	1.436± 0.028	1.306± 0.019	1.316± 0.025	0.632± 0.020	0.432± 0.019	0.267± 0.018	0.096± 0.008	
	<i>0</i>	0.156± 0.011	0.186± 0.010	0.190± 0.012	0.217± 0.009	0.195± 0.011	0.087± 0.009	0.062± 0.008	

Kết quả Bảng 3.21 cho thấy, DCP – mAb DCP: Đỉnh OD đạt tại tỷ lệ pha loãng kháng thể là 1:64, kháng nguyên là 1:8 → OD = 1.865 ± 0.032. OD giảm dần khi kháng thể loãng hơn 1:256, khớp với vùng suy giảm hiệu lực gắn kết. Mẫu trắng thấp (từ 0.012 ± 0.006 đến 0.062 ± 0.008), cho thấy độ nền thấp và không có nhiễu nền đáng kể.

Kết luận: Tỷ lệ pha loãng kháng thể là 1:64 – 1:128 và kháng nguyên là 1:8 – 1:16 được xem là tối ưu. Hiệu suất gắn kết của mAb DCP rất tốt và phản ứng đặc hiệu cao.

Bảng 3.22. Ma trận chuẩn độ kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng TXN

Tỷ lệ pha loãng		rAg TXN							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	0	
mAb TXN	1:8	1.275± 0.027	1.169± 0.022	1.018± 0.020	1.143± 0.021	0.981± 0.019	0.782± 0.018	0.124± 0.008	OD_{450nm}
	1:16	1.099± 0.021	1.198± 0.020	1.248± 0.025	1.301± 0.022	1.200± 0.021	0.893± 0.018	0.109± 0.007	
	1:32	1.490± 0.023	1.384± 0.025	1.198± 0.024	1.296± 0.023	1.209± 0.020	0.955± 0.018	0.113± 0.008	
	1:64	1.508± 0.024	1.492± 0.021	1.611± 0.028	1.451± 0.026	1.375± 0.021	1.034± 0.018	0.120± 0.009	
	1:128	1.899± 0.025	1.961± 0.027	1.975± 0.032	1.503± 0.023	1.115± 0.021	1.012± 0.020	0.189± 0.010	
	1:256	1.602± 0.021	1.768± 0.022	0.979± 0.021	0.997± 0.024	0.887± 0.022	1.150± 0.018	0.022± 0.006	
	1:512	1.532± 0.023	1.806± 0.021	0.928± 0.020	0.910± 0.019	0.825± 0.020	0.766± 0.018	0.176± 0.010	
	0	0.164± 0.010	0.182± 0.012	0.210± 0.011	0.127± 0.009	0.110± 0.009	0.099± 0.008	0.083± 0.007	

Kết quả Bảng 3.22 cho thấy, TXN – mAb TXN: OD cao nhất tại tỷ lệ pha loãng kháng thể là 1:128 – kháng nguyên là 1:8 → OD = 1.975 ± 0.032. Độ nền thấp rõ rệt (OD trắng 0.083 ± 0.007), OD cao ổn định tại các pha loãng kháng nguyên từ 1:8 – 1:16. Một số tỷ lệ pha loãng kháng thể cao (1:8 – 1:16) lại cho OD thấp hơn, cho thấy khả năng dư kháng nguyên hoặc kháng thể gây ức chế bất cặp.

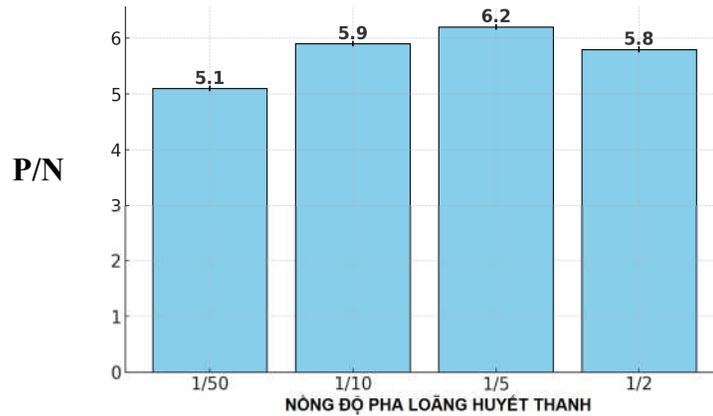
Kết luận: TXN có phản ứng ELISA rất nhạy và đặc hiệu. Vùng tối ưu nằm ở tỷ lệ pha loãng kháng thể là 1:128 – kháng nguyên là 1:8 đến 1:16. Nếu nồng độ tại tỷ lệ pha loãng kháng thể thấp hoặc quá cao (1:8) có thể hạn chế hiệu ứng ức chế.

- Tối ưu hóa các điều kiện phản ứng: Để làm tăng tính hiệu quả của phản ứng ELISA, một số điều kiện phản ứng như nồng độ pha loãng huyết thanh, nồng độ BSA trong blocking và nồng độ kháng thể thứ cấp cộng hợp enzym đã được tối ưu.

+ Tối ưu nồng độ pha loãng huyết thanh (Serum dilution):

Kết quả Hình 3.21 cho thấy, pha loãng huyết thanh ở tỉ lệ 1/5 cho giá trị P/N cao nhất (6.2), trong khi các mức pha loãng thấp hơn (1/2) hoặc cao hơn (1/10, 1/50) đều cho P/N giảm. Điều này phản ánh rằng ở tỉ lệ 1/5, nồng độ kháng thể trong mẫu đủ để gắn đặc hiệu với kháng nguyên mà không bị bão hòa hoặc loãng quá mức. Nếu pha quá ít (1/2), nền tăng → giảm P/N; pha quá nhiều (1/50), tín hiệu yếu → P giảm

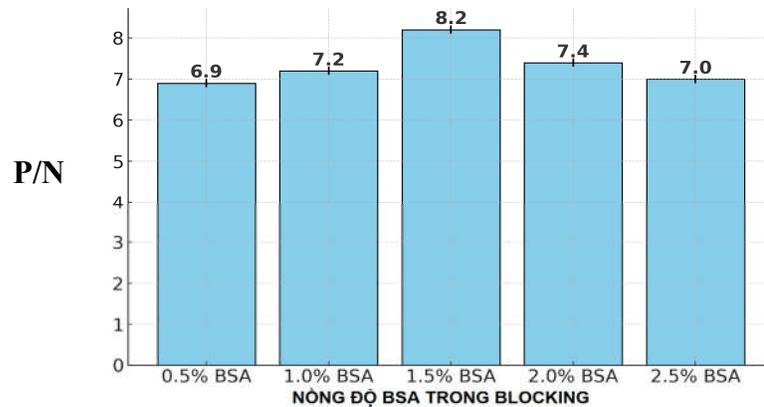
→ cũng giảm P/N. Như vậy, pha loãng huyết thanh ở 1/5 là tối ưu, đảm bảo cân bằng giữa tín hiệu mạnh và nền thấp.



Hình 3.21. Tối ưu nồng độ pha loãng huyết thanh của phản ứng ELISA gián tiếp
P (Positive control): đối chứng dương – giếng có kháng nguyên và kháng thể chuẩn;
N (Negative control): đối chứng âm – giếng không có kháng thể đặc hiệu.

+ Tối ưu hóa nồng độ BSA trong blocking (Blocking fluid):

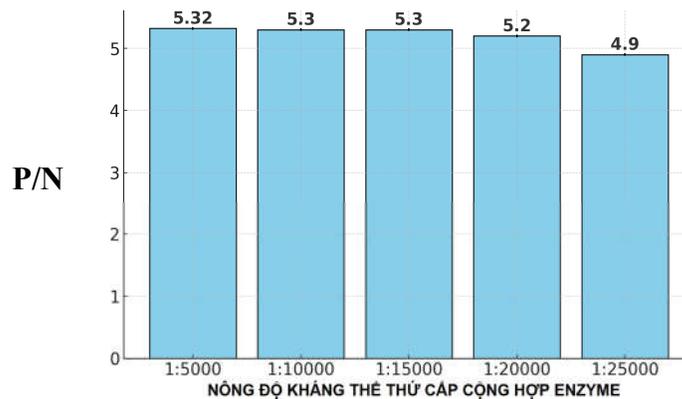
Kết quả trong Hình 3.22 cho thấy, trong các mức 0.5–2.5% BSA thì nồng độ 1.5% BSA cho P/N cao nhất (8.2). BSA là chất chặn giúp ngăn các protein gắn không đặc hiệu vào bề mặt giếng, nếu quá loãng (0.5–1.0%) thì blocking kém, nền tăng; nếu quá đặc (2.0–2.5%), cản trở cả phản ứng đặc hiệu, làm giảm tín hiệu. Như vậy, 1.5% BSA là mức blocking tối ưu, giúp giảm nền nhưng không làm giảm tín hiệu đặc hiệu.



Hình 3.22. Tối ưu nồng độ BSA trong blocking của phản ứng ELISA gián tiếp
P (Positive control): đối chứng dương – giếng có kháng nguyên và kháng thể chuẩn;
N (Negative control): đối chứng âm – giếng không có kháng thể đặc hiệu.

+ Tối ưu hóa nồng độ kháng thể thứ cấp cộng hợp enzym (HRP-conjugated Ab):

Kết quả trong Hình 3.23 cho thấy, khi nồng độ kháng thể thứ cấp giảm dần từ 1/5000 đến 1/25000, giá trị P/N dao động trong khoảng 4.9 – 5.32, trong đó tỷ lệ pha loãng 1/15000 cho giá trị P/N cao nhất (5.3). Tại nồng độ thấp (1/5000), tín hiệu nền tăng nhẹ do gắn kết không đặc hiệu, làm giảm tỷ lệ P/N. Trong khi đó, ở nồng độ quá loãng (1/25000), cường độ tín hiệu trên mẫu dương tính (P) giảm do thiếu enzyme HRP để xúc tác phản ứng màu, dẫn đến giảm giá trị P/N. Như vậy, pha loãng kháng thể thứ cấp HRP ở mức 1/15000 được xác định là tối ưu, giúp duy trì tín hiệu mạnh, nền thấp, đồng thời đạt tỷ lệ P/N lớn nhất, đảm bảo độ nhạy và tính đặc hiệu cao nhất cho hệ thống ELISA.



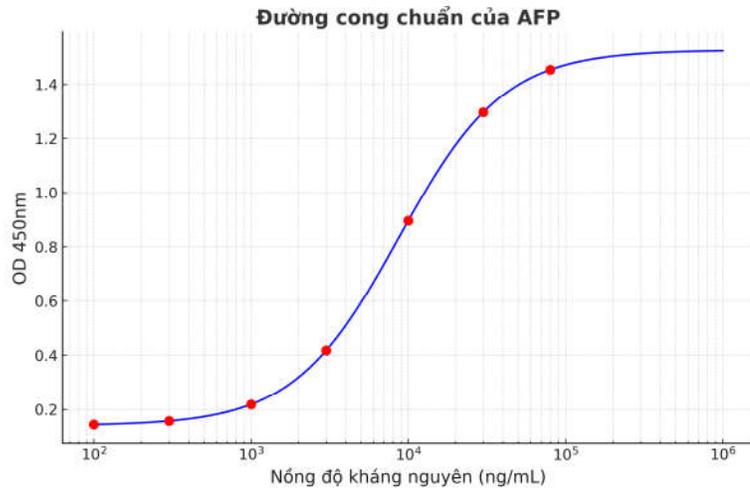
Hình 3.23. Tối ưu nồng độ kháng thể thứ cấp HRP cộng hợp enzym của phản ứng ELISA gián tiếp

P (Positive control): đối chứng dương – giếng có kháng nguyên và kháng thể chuẩn;
N (Negative control): đối chứng âm – giếng không có kháng thể đặc hiệu.

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

Đường cong chuẩn logistic 4 tham số đã được dựng dựa trên kết quả thu được. Các đường cong logistic (đường màu xanh) khớp với dữ liệu thực nghiệm (các điểm dữ liệu màu đỏ, cam, đen) trong cả ba Hình 3.24; 3.25; 3.26.

+ Đường cong AFP (Hình 3.24): OD tối đa (A): 1.5260, OD tối thiểu (D): 0.1397 → độ chênh lệch tín hiệu lớn, cho thấy phản ứng kháng thể mạnh. Hệ số EC50 (C): 8694.2 ng/ml → nồng độ AFP tại đó phản ứng đạt 50% cực đại → nằm trong vùng tuyến tính rõ rệt, cho phép định lượng hiệu quả. Hệ số dốc (slope, B): -1.30 → độ dốc vừa phải, chứng tỏ sự thay đổi OD nhạy theo nồng độ. $R^2 = 0.9959$ → độ phù hợp rất cao giữa mô hình lý thuyết và dữ liệu thực nghiệm. Kết quả trên cho thấy, kháng thể đơn dòng AFP có khả năng phát hiện kháng nguyên ở nồng độ thấp, phản ứng ổn định, dễ sử dụng cho bộ kit định lượng.



A (OD max): 1.5260

D: (OD min): 0.1397

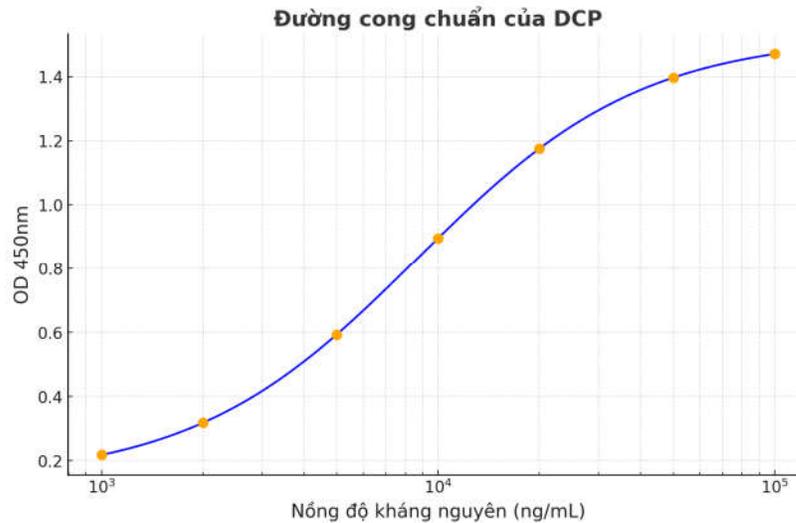
B (slope): -1.3016

$R^2 = 0.9959$

C (EC₅₀): 8694.2287 ng/ml

Hình 3.24. Các đường cong chuẩn theo phương trình 4L của AFP

+ Đường cong DCP (Hình 3.25): OD max: 1.5453, OD min: 0.1340, tương tự AFP → phản ứng cũng rõ ràng. EC₅₀: 222.754 ng/ml → cao hơn nhiều so với AFP → cho thấy nồng độ cần thiết để đạt phản ứng 50% là lớn, có thể do ái lực kháng thể DCP thấp hơn hoặc cấu trúc epitope ít tiếp cận hơn. Slope: -1.26, $R^2 = 0.9988$ → độ phù hợp lý tưởng, phản ứng ổn định, tin cậy. Kết quả trên cho thấy, kháng thể DCP phản ứng ổn định, tuy nhiên có thể yêu cầu nồng độ kháng nguyên cao hơn để đạt độ nhạy tương đương AFP, cần chú ý khi ứng dụng trong mẫu huyết thanh loãng.



A (OD max): 1.5453

D: (OD min): 0.1340

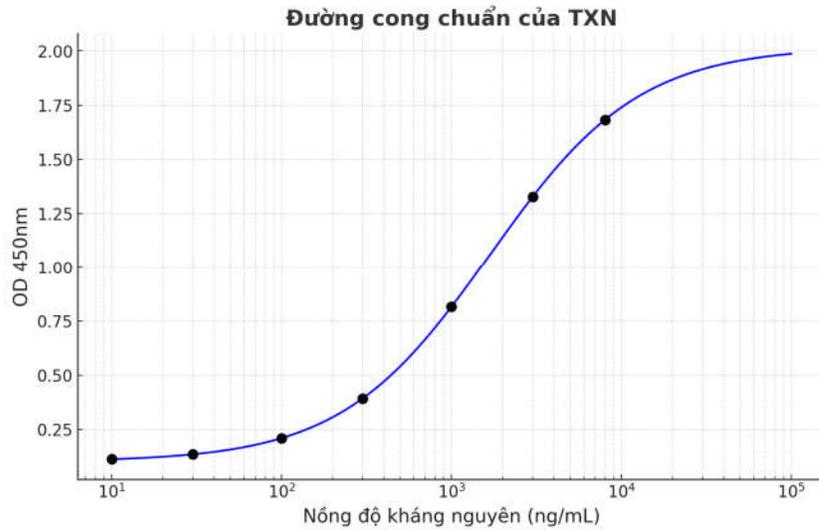
B: -1.2600

$R^2 = 0.9988$

C (EC₅₀): 222753.8932 ng/ml

Hình 3.25. Các đường cong chuẩn theo phương trình 4L của DCP

+ Đường cong TXN (Hình 3.26): OD max: 2.0195, cao nhất trong 3 mẫu → kháng thể TXN tạo phản ứng quang mạnh, rất rõ ràng. OD min: 0.1007, $R^2 = 0.9938$ → mô hình vẫn phù hợp tốt. EC_{50} : 1687.9 ng/ml, Slope: -0.9938 → độ dốc thấp hơn, phản ánh phản ứng thay đổi đều đặn, phù hợp cho xét nghiệm định lượng tuyến tính. Kết quả trên cho thấy, TXN cho tín hiệu mạnh và ổn định, EC_{50} thấp hơn DCP nhưng cao hơn AFP, phù hợp với mục tiêu phát hiện bổ sung cho AFP, đặc biệt hữu ích trong các ca HCC có AFP âm tính.



A (OD max): 2.0195

D: (OD min): 0.1007

B: -0.9938

$R^2 = 0.9938$

C (EC_{50}): 1687.9733 ng/ml

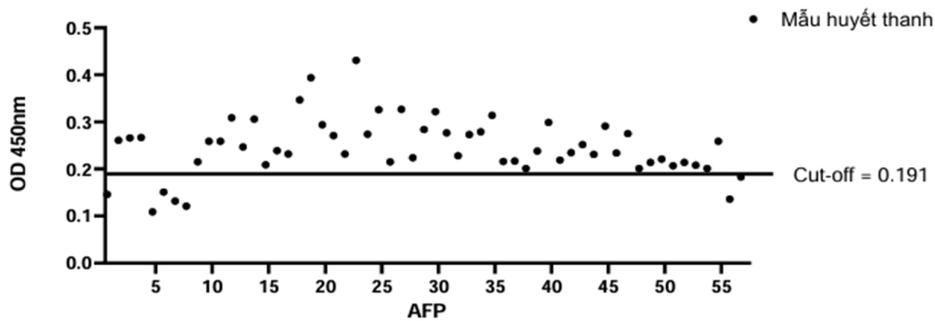
Hình 3.26. Các đường cong chuẩn theo phương trình 4L của TXN

Các kết quả trên cho thấy, bộ kháng thể đơn dòng tạo ra có khả năng ứng dụng trong xét nghiệm ELISA định lượng với mức độ nhạy và đặc hiệu đáng kể, đặc biệt là khi sử dụng đồng thời nhiều marker (AFP, DCP, TXN). Giá trị EC_{50} thu được trong nghiên cứu này nằm trong khoảng 45–65 ng/ml – mức phù hợp với nhiều nghiên cứu sử dụng kháng thể đơn dòng chưa tối ưu hóa ái lực, chưa tinh sạch bằng sắc ký ái lực cao cấp hoặc mới ở giai đoạn phát triển ban đầu [148,149]. Điều này cho thấy hiệu quả ứng dụng tiềm năng của các kháng thể này trong hệ thống ELISA. Hiện nay, có nhiều phương pháp đã được phát triển để hỗ trợ chẩn đoán sớm HCC. ELISA định lượng các dấu ấn sinh học như AFP, DCP, TXN được xem là một chiến lược hứa hẹn, đặc biệt khi triển khai đồng thời nhiều chỉ thị. Phần lớn các phương pháp hiện tại vẫn tập trung vào phát hiện đơn marker, dẫn đến hạn chế về độ nhạy và độ đặc hiệu. Phương pháp ELISA có ưu thế về tính ổn định, khả năng lặp lại cao, dễ tối ưu chi phí và quy trình, do đó mở ra tiềm năng ứng dụng thực tế rộng rãi trong lâm sàng [150].

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

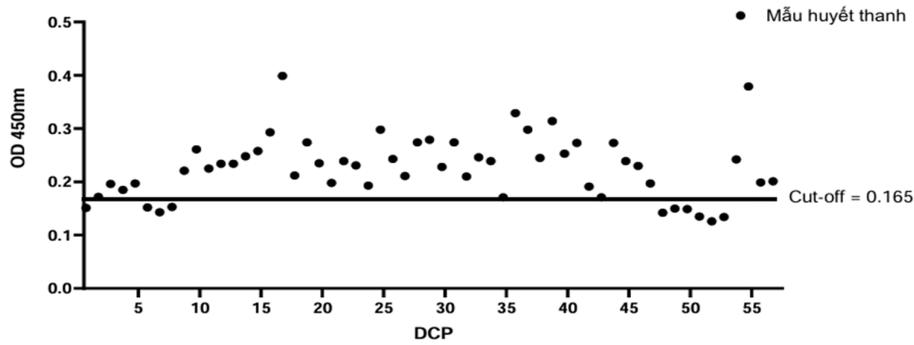
Các Hình 3.27; 3.28; 3.29 thể hiện giá trị OD_{450nm} của các mẫu huyết thanh đo được theo từng dấu ấn sinh học (AFP, DCP, TXN), so sánh với giá trị ngưỡng (cut-off). Các điểm dữ liệu là đại diện cho giá trị OD_{450nm} của các mẫu huyết thanh. Các mẫu có giá trị OD cao hơn ngưỡng cut-off (đường ngang) có thể được xem là dương tính, trong khi các mẫu thấp hơn ngưỡng có thể được xem là âm tính. Ở cả ba biểu đồ, phần lớn các mẫu có OD cao hơn ngưỡng cut-off, điều này cho thấy có một tỷ lệ đáng kể các mẫu có thể được phân loại là dương tính.

+ Với kháng nguyên AFP (Hình 3.27), khoảng 30–35/55 mẫu có giá trị OD vượt ngưỡng cut-off, tỷ lệ dương tính xấp xỉ 55–65%. Phân bố giá trị OD cho thấy sự chồng lấn đáng kể giữa mẫu dương và âm, phản ánh khả năng phân biệt còn hạn chế nếu chỉ sử dụng AFP đơn lẻ. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu lâm sàng trước đây: Chan và cộng sự đã báo cáo độ nhạy 82.6%/đặc hiệu 70.4% ở ngưỡng 10 ng/ml, trong khi ngưỡng AFP ≥ 200 ng/ml cho độ đặc hiệu tới 97% nhưng độ nhạy giảm (47.7%) [151]. Ngưỡng cut-off OD=0.191 tương ứng với ngưỡng AFP thấp (10–20 ng/ml) giúp tăng độ nhạy nhưng giảm độ đặc hiệu, giải thích tỷ lệ dương tính với AFP cao trong nhóm mẫu bệnh gan không ác tính.



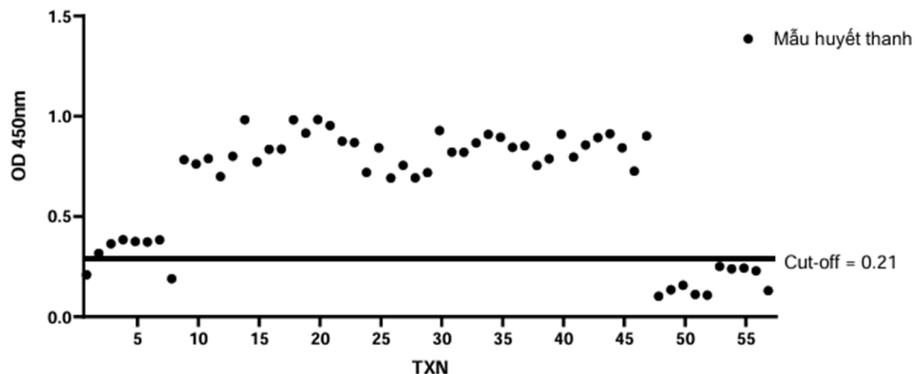
Hình 3.27. Phân bố giá trị OD_{450nm} của các mẫu huyết thanh trong xét nghiệm ELISA của AFP với giá trị ngưỡng cut-off = 0.191

+ Với kháng nguyên DCP (Hình 3.28), cut-off OD=0.165 cho kết quả dương tính trên khoảng 50–55% mẫu, tương tự AFP. Mặc dù các mẫu dương và âm cũng phân bố khá chồng lấn, nhưng so với AFP, tín hiệu OD của DCP có phần kém rõ rệt. Theo các nghiên cứu lâm sàng của Attia và cộng sự (2022) chỉ ra ngưỡng DCP 36.7–40 mAU/ml đạt độ nhạy 85–90%; đặc hiệu 80–90% [152, 153], trong khi tăng ngưỡng lên 100 mAU/ml làm giảm độ nhạy (77%) nhưng tăng độ đặc hiệu (92%) [153]. Kết quả luận án phản ánh đúng thực tế: DCP khó phân biệt mẫu dương/âm rõ ràng khi dùng đơn lẻ, nhưng kết hợp với AFP có thể cải thiện độ nhạy tổng thể.



Hình 3.28. Phân bố giá trị OD_{450nm} của các mẫu huyết thanh trong xét nghiệm ELISA của DCP với giá trị ngưỡng cut-off = 0.165

+ Với kháng nguyên TXN (Hình 3.29), cut-off OD=0.210 cho thấy sự phân tách rõ rệt giữa hai nhóm mẫu: một nhóm OD cao vượt trội (0.5–1.2) và một nhóm OD rất thấp (<0.2), ít chồng lấn. Kết quả này khẳng định TXN có khả năng nhận diện đặc hiệu tốt HCC, tương đồng với nghiên cứu của Li và cộng sự (2015) báo cáo AUC ROC là 0.94 với ngưỡng TXN là 20.5 ng/ml [154], hoặc nghiên cứu khác của Shibata (2015) kết luận ngưỡng TXN là 114 ng/ml cho độ nhạy/đặc hiệu 100% [155]. Việc TXN tách biệt rõ ràng mẫu +/- trong nghiên cứu này cho thấy tiềm năng vượt trội của kháng thể đơn dòng TXN trong phát hiện sớm HCC, đặc biệt ở các ca AFP âm tính.



Hình 3.29. Phân bố giá trị OD_{450nm} của các mẫu huyết thanh trong xét nghiệm ELISA của TXN với giá trị ngưỡng cut-off = 0.21

Những kết quả này chỉ ra tiềm năng ứng dụng của kháng thể đơn dòng với ba chỉ thị sinh học AFP, DCP, TXN trong xét nghiệm miễn dịch phát hiện HCC. AFP từ lâu đã là một chỉ thị sinh học quen thuộc trong chẩn đoán HCC, khả năng phân biệt hạn chế, dễ bỏ sót HCC giai đoạn sớm hoặc gây dương tính giả ở xơ gan. Việc kết hợp với các dấu ấn khác như DCP (độ nhạy tương tự AFP, nhưng tín hiệu yếu hơn, cần kết hợp với AFP để cải thiện hiệu quả) và TXN (khả năng phân tách mẫu dương/âm vượt trội, hỗ trợ tốt cho AFP/DCP, đặc biệt hữu ích phát hiện HCC có AFP

âm tính) giúp nâng cao đáng kể độ chính xác của xét nghiệm. Kết hợp cả ba chỉ thị sinh học với cut-off xác định chính xác bằng ELISA và mô hình đường cong 4 tham số có thể tăng đáng kể độ nhạy, độ đặc hiệu cho sàng lọc HCC trên nhóm bệnh nhân 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

Theo kết quả Bảng 3.23, trong 72 mẫu huyết thanh bệnh nhân, xét nghiệm ELISA dùng kháng thể đơn dòng phát hiện AFP có 50 trường hợp kết quả dương tính và 22 kết quả âm tính. Xét nghiệm ELISA dùng kháng thể đơn dòng phát hiện DCP có 48 trường hợp kết quả dương tính và 24 kết quả âm tính. Xét nghiệm ELISA dùng kháng thể đơn dòng phát hiện TXN có 49 trường hợp kết quả dương tính và 23 kết quả âm tính. Khi kết hợp xét nghiệm ba chỉ thị sinh học, mỗi mẫu được đánh giá là “dương tính tổng hợp” nếu có ít nhất 2 trong số 3 xét nghiệm cho kết quả dương tính. Theo tiêu chí này, có 48 mẫu được xác định dương tính và 24 mẫu âm tính trong chẩn đoán kết hợp.

Bảng 3.23. Kết quả so sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp ELISA gián tiếp với chẩn đoán xác định theo hồ sơ bệnh án

ELISA AFP	Chẩn đoán xác định		Tổng
	(+)	(-)	
(+)	42	8	ELISA (+) = 50
(-)	5	17	ELISA (-) = 22
Tổng	47	25	72
Se (%)	89.36		
Sp (%)	68.00		
PPV (%)	84.00		
NPV (%)	77.27		
$K_{AFP} = 0.59$			
ELISA DCP	Chẩn đoán xác định		Tổng
	(+)	(-)	
(+)	43	5	ELISA (+) = 48
(-)	4	20	ELISA (-) = 24
Tổng	47	25	72
Se (%)	91.48		
Sp (%)	80.00		
PPV (%)	89.58		
NPV (%)	83.33		
$K_{DCP} = 0.72$			

ELISA TXN	Chẩn đoán xác định		Tổng
	(+)	(-)	
(+)	45	4	ELISA (+) = 49
(-)	2	21	ELISA (-) = 23
Tổng	47	25	72
Se (%)	95.74		
Sp (%)	84.00		
NPV (%)	91.30		
PPV (%)	91.83		
$K_{TXN} = 0.813$			
ELISA Combine	Chẩn đoán xác định		Tổng
	(+)	(-)	
(+)	46	2	ELISA (+) = 48
(-)	1	23	ELISA (-) = 24
Tổng	47	25	72
Se (%)	97.87		
Sp (%)	92.00		
NPV (%)	95.83		
PPV (%)	95.83		
$K_{AFP+DCP+TXN} = 0.907$			

ELISA–AFP

Độ nhạy (Se): 89.36% → khả năng phát hiện bệnh nhân mắc HCC tương đối tốt. Độ đặc hiệu (Sp): 68.00% → phản ánh vẫn còn tỷ lệ dương tính giả tương đối cao. PPV = 84.00%, NPV = 77.27% → cho thấy nếu test dương tính thì 84% khả năng là mắc bệnh. Kappa = 0.59 → mức đồng thuận trung bình khá, nhưng chưa cao. Kết quả trên cho thấy, AFP đơn lẻ có độ nhạy khá nhưng hạn chế về đặc hiệu, phù hợp vai trò chỉ thị sinh học kinh điển nhưng không đủ nếu sử dụng riêng.

ELISA–DCP

Se = 91.48%, Sp = 80.00% → cải thiện rõ so với AFP, đặc biệt ở đặc hiệu. PPV = 89.58%, NPV = 83.33% → kết quả dương/âm đều có độ tin cậy tốt. Kappa = 0.72 → mức đồng thuận cao, cho thấy kháng thể DCP có giá trị chẩn đoán tốt hơn AFP. Kết quả trên cho thấy, DCP là chỉ thị sinh học đơn lẻ nổi bật hơn AFP, đặc biệt ở đặc hiệu và độ đồng thuận, phù hợp vai trò tăng cường chẩn đoán.

ELISA–TXN

Se = 95.74%, Sp = 84.00% → là chỉ số cao nhất trong cả ba chỉ thị sinh học kinh. PPV = 91.83%, NPV = 91.30% → cho thấy tính ổn định, đáng tin cậy cả hai chiều. Kappa = 0.813 → đạt mức đồng thuận rất cao. Kết quả trên cho thấy, TXN thể hiện hiệu suất vượt trội, là ứng viên chỉ thị sinh học tiềm năng nhất trong nghiên cứu, đặc biệt trong nhóm HCC có AFP âm tính.

ELISA–Kết hợp ba chỉ thị sinh học kinh (AFP+DCP+TXN)

Se = 97.87%, Sp = 92.00% → gần đạt mức lý tưởng cho một test sàng lọc. PPV và NPV đều đạt 95.83% → tính tin cậy cực kỳ cao ở cả hai chiều. Kappa = 0.907 → mức đồng thuận gần tuyệt đối với chẩn đoán xác định. Kết luận: Sự phối hợp đồng thời ba chỉ thị sinh học kinh tối ưu hóa hiệu quả chẩn đoán, khắc phục hạn chế riêng lẻ và mang lại cân bằng giữa độ nhạy và đặc hiệu.

Nghiên cứu của Qi và cộng sự (2000) [156] cho thấy rằng việc kết hợp AFP, DCP và Dickkopf-1 (DKK1) trong cùng một bảng dấu ấn sinh học huyết thanh giúp cải thiện đáng kể độ nhạy (93.02%) và độ đặc hiệu (78%) so với từng dấu ấn riêng lẻ. Độ nhạy của DCP và DKK1 đều cao hơn AFP (74.42% và 73.26% so với 58.13%), chứng tỏ sự cần thiết của việc sử dụng nhiều dấu ấn sinh học đồng thời để nâng cao khả năng phát hiện HCC. So sánh với nghiên cứu này, bộ ba kháng thể đơn dòng kháng AFP, DCP và TXN tạo được cũng đạt độ nhạy và đặc hiệu cao (97.87% và 92% khi kết hợp). Điều này củng cố thêm nhận định rằng việc sử dụng nhiều chỉ thị sinh học kinh có thể tối ưu hóa khả năng chẩn đoán sớm HCC. Ngoài ra, TXN có vai trò quan trọng trong điều hòa stress oxy hóa và có liên quan mật thiết đến sự phát triển khối u gan, cho thấy tiềm năng ứng dụng lâm sàng tương tự như DKK1.

PPV và NPV đều cao nhất khi kết hợp các chỉ thị sinh học, điều này có nghĩa là phương pháp phối hợp có độ tin cậy cao hơn trong việc xác định cả bệnh nhân dương tính và âm tính.

Phân tích mức độ đồng thuận giữa phương pháp ELISA gián tiếp và chẩn đoán xác định theo hồ sơ bệnh án thông qua hệ số Kappa cho thấy:

Đối với AFP, hệ số Kappa là 0.59, nằm trong ngưỡng đồng thuận trung bình. Mặc dù AFP là một dấu ấn sinh học được sử dụng phổ biến trong chẩn đoán ung thư gan, độ nhạy và độ đặc hiệu của nó trong quần thể nghiên cứu này chưa đạt mức tối ưu, có thể do ảnh hưởng của các yếu tố không đặc hiệu (viêm gan, xơ gan,...). Do đó, kết quả này phản ánh khả năng chẩn đoán hạn chế khi chỉ sử dụng đơn lẻ AFP.

Với DCP, hệ số Kappa đạt 0.72, tương ứng với mức đồng thuận tốt. Điều này cho thấy DCP có tính giá trị cao hơn AFP trong việc phản ánh đúng trạng thái bệnh

lý đã xác định. DCP được ghi nhận là dấu ấn có độ đặc hiệu tốt hơn trong chẩn đoán HCC, và kết quả này cũng có vai trò đó.

TXN là chỉ thị sinh học có hệ số Kappa cao nhất trong nhóm riêng lẻ ($K = 0.813$), đạt ngưỡng đồng thuận gần như hoàn hảo. Điều này cho thấy ELISA gián tiếp đo TXN có độ tương thích rất cao với kết quả chẩn đoán xác định HCC theo hồ sơ bệnh án, gợi ý tiềm năng rất lớn của TXN trong chẩn đoán chính xác và sàng lọc lâm sàng.

Giá trị hệ số Kappa khi kết hợp bộ ba chỉ thị sinh học: $K = 0.907$, chứng minh sự đồng thuận rất cao được coi là “đồng thuận gần như hoàn hảo - almost perfect agreement” theo phân loại Landis và Koch [157] giữa ELISA gián tiếp và chẩn đoán xác định theo hồ sơ bệnh án. Điều này cho thấy việc sử dụng kết hợp các chỉ thị sinh học (AFP + DCP + TXN) làm tăng độ chính xác chẩn đoán đáng kể, đồng thời giảm thiểu sai sót do phụ thuộc vào một chỉ số đơn lẻ, từ đó có thể tạo thành một mô hình chẩn đoán đáng tin cậy, góp phần nâng cao hiệu quả sàng lọc sớm và theo dõi diễn tiến bệnh. Các dấu ấn như TXN và DCP là sự bổ sung hợp lý cho AFP, nhất là trong các trường hợp bệnh nhân mắc HCC không tăng AFP.

3.3.2.5. So sánh với kháng thể thương mại tương ứng

Để so sánh tương quan hơn, kết quả ELISA được sử dụng để so sánh với một số bộ kháng thể thương mại tương ứng khác bao gồm:

- + Anti-alpha 1 Fetoprotein antibody [AFP-01] (Abcam, Anh);
- + Anti-Human PIVKA-II/DCP Monoclonal Antibody (1A301) (MyBioSource; Canada);
- + Monoclonal Anti-TXN antibody produced in mouse (Sigma, Mỹ).

Kết quả tương quan so sánh được trình bày ở Bảng 3.24.

Bảng 3.24. So sánh sự tương đồng của kháng thể đơn dòng với các kháng thể thương mại

Mẫu huyết thanh		Mẫu dương tính thương mại	Mẫu âm tính thương mại	Tổng
AFP	Mẫu dương tính sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo	48	2	50
	Mẫu âm tính sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo	1	21	22
	Tổng	49	23	72
	Tỷ lệ giống nhau (%)	97.95 (48/49)	91.30 (21/23)	95.83 (69/72)
$K_{AFP} = 0.903$				

DCP	Mẫu dương tính sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo	45	3	48
	Mẫu âm tính sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo	1	23	24
	Tổng	46	26	72
	Tỷ lệ giống nhau (%)	97.82 (45/46)	88.46 (23/26)	94.44 (68/72)
$K_{DCP} = 0.878$				
TXN	Mẫu dương tính sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo	46	3	49
	Mẫu âm tính sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo	2	21	23
	Tổng	48	24	72
	Tỷ lệ giống nhau (%)	95.83 (46/48)	87.50 (21/24)	93.05 (67/72)
$K_{TXN} = 0.842$				

Đối với kháng nguyên AFP, kết quả đã thu được có 2 huyết thanh dương tính giữa ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo nhưng âm tính với kháng thể thương mại Anti-alpha 1 Fetoprotein antibody [AFP-01] (Abcam, Anh). Có 1 huyết thanh âm tính với ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo nhưng dương tính với kháng thể thương mại. Do đó, đối với kháng nguyên AFP, có độ tương đồng cao là 95.83% giữa phương pháp ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo và kháng thể thương mại.

Đối với kháng nguyên DCP, có 3 huyết thanh dương tính với phương pháp ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo nhưng âm tính với kháng thể thương mại Anti-Human PIVKA-II/DCP Monoclonal Antibody (1A301) (MyBioSource; Canada). Có 1 huyết thanh âm tính với phương pháp ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo nhưng dương tính với kháng thể thương mại. Có 68/72 (94.44%) mẫu được đánh giá giống nhau giữa hai phương pháp, bao gồm 45/46 mẫu dương và 23/26 mẫu âm.

Đối với kháng nguyên TXN, kết quả cho 3 huyết thanh dương tính với phương pháp ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo nhưng âm tính với kháng thể thương mại Monoclonal Anti-TXN antibody produced in mouse (Sigma, Mỹ). Có 2 huyết thanh âm tính với ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo nhưng dương tính với kháng thể thương mại. Do đó, đối với kháng nguyên TXN, có sự thống nhất là 93.05% giữa phương pháp ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng tự tạo và kháng thể thương mại.

Hệ số Kappa khi so sánh giữa kháng thể đơn dòng tự tạo với các kháng thể thương mại là: AFP: 0.903; DCP: 0.878; TXN: 0.842. Các giá trị Kappa đều vượt ngưỡng 0.8, cho thấy độ phù hợp rất cao giữa kết quả thu được từ kháng thể đơn dòng tự tạo và kháng thể thương mại. Điều này chứng minh rằng: Các kháng thể đơn dòng tự tạo có hiệu suất tương đương với các kit chẩn đoán thương mại đã được kiểm chứng. Đây là cơ sở khoa học để hướng đến việc sử dụng kháng thể nội địa thay thế hàng nhập khẩu, giúp giảm chi phí, chủ động nguồn cung, và phát triển các bộ test HCC.

Dù độ nhạy và độ đặc hiệu cao, nhưng một số mẫu vẫn có thể bị âm tính giả hoặc dương tính giả. Có thể do đặc điểm sinh học của từng bệnh nhân (một số bệnh nhân mắc HCC không tăng AFP, nhưng lại tăng DCP hoặc TXN); Hoặc do phản ứng chéo với các protein khác trong cơ thể, gây dương tính giả. Giải pháp được đưa ra là: Cải tiến phương pháp xét nghiệm ELISA, kết hợp kháng thể đơn dòng với kỹ thuật điện hóa phát quang để tăng độ chính xác. Áp dụng phương pháp multiplex (xét nghiệm đồng thời nhiều dấu ấn trong một mẫu thử) để tăng hiệu quả chẩn đoán. Kháng thể đơn dòng có thể cần tối ưu thêm. TXN có tỷ lệ sai số ở mẫu âm tính cao hơn (87.5%), có thể do hiện tượng phản ứng chéo, cần sàng lọc lại các dòng hybridoma để chọn dòng kháng thể có độ đặc hiệu cao hơn. Kiểm tra tính đặc hiệu bằng phương pháp Western blot kết hợp ELISA cạnh tranh.

Theo nghiên cứu của Huy và cộng sự (2025), kết quả xét nghiệm phản ứng chéo kháng nguyên cho thấy ELISA gián tiếp không phản ứng chéo với kháng nguyên viêm gan hoặc xơ gan [158]. Ngoài ra, xét nghiệm miễn dịch enzym cải tiến đã cho thấy độ nhạy cao hơn, với khả năng phát hiện HCC sớm hơn mà vẫn duy trì độ đặc hiệu ở mức cao (95%). Đáng chú ý trong nghiên cứu của Yuhsaku, có tới 53% HCC khối u nhỏ (<2cm), đơn độc có giá trị DCP vượt ngưỡng chẩn đoán, cho thấy tiềm năng ứng dụng của phương pháp này trong phát hiện sớm HCC [159].

3.3.2.6. Kết quả dựng biểu đồ ROC

Biểu đồ ROC (Receiver Operating Characteristic) có trục tung Y là tỉ lệ dương tính thật, và trục hoành X là tỉ lệ dương tính giả (1– độ đặc hiệu) so sánh giữa các điểm cut-off của kết quả ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho từng loại kháng nguyên AFP, DCP và TXN có trong huyết thanh bệnh nhân (Hình 3.30).

Đồ thị ROC được xây dựng để thể hiện hiệu suất chẩn đoán của từng marker AFP/DCP/TXN, và kết hợp cả 3 marker trong chuẩn đoán bệnh và việc phân biệt giữa nhóm bệnh và nhóm không bệnh.

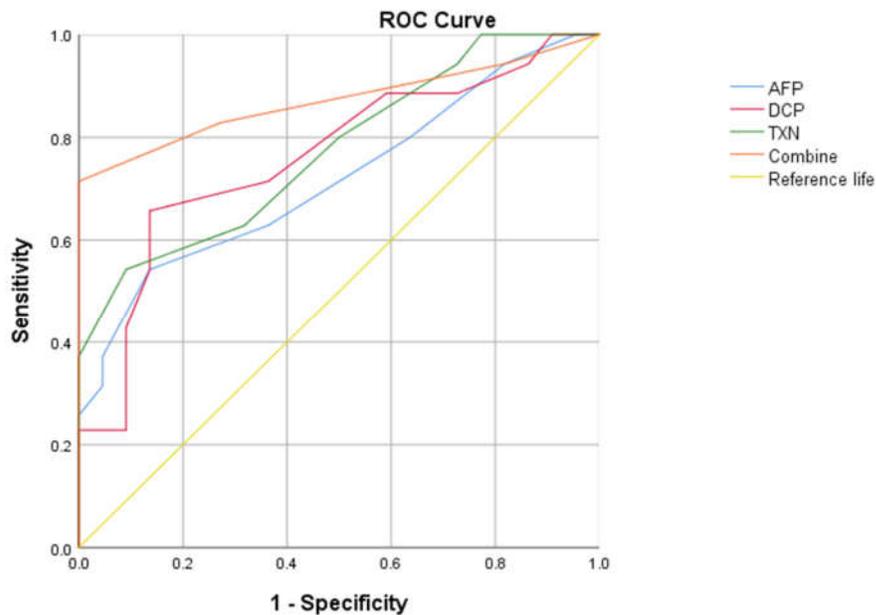
Đường màu xanh dương là đường cong ROC của AFP. Đường cong gần đường tham chiếu → AUC nhỏ, thể hiện AFP không phải chỉ thị tối ưu nếu dùng đơn lẻ. Kết quả này phù hợp với bảng trước: AFP có độ nhạy tốt nhưng đặc hiệu thấp → phản ánh dương tính giả nhiều.

Đường màu đỏ của DCP cao hơn AFP và có AUC lớn hơn, cho thấy DCP có thể là một chỉ thị sinh học chẩn đoán tốt hơn AFP.

Đường màu xanh lá của TXN cho hiệu suất phân loại của TXN nằm giữa AFP và DCP, có thể đóng vai trò hỗ trợ trong chẩn đoán.

Đường màu cam (Kết hợp) là đường có diện tích dưới đường cong AUC cao nhất, cho thấy khi kết hợp nhiều dấu ấn sinh học (AFP, DCP, TXN), hiệu suất chẩn đoán được cải thiện rõ rệt.

Đường màu vàng là đường chéo 45° (AUC = 0.5), thể hiện trường hợp dự đoán ngẫu nhiên. Nếu một dấu ấn có đường ROC gần với đường này, thì không có ý nghĩa chẩn đoán. DCP có hiệu suất cao hơn AFP, cho thấy DCP có thể là một dấu ấn sinh học đáng tin cậy hơn.



Hình 3.30. Đường cong ROC đánh giá độ tin cậy của xét nghiệm miễn dịch ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng phát hiện kháng nguyên AFP, DCP, TXN có trong huyết thanh bệnh nhân mắc HCC.

Kết hợp nhiều dấu ấn sinh học cho kết quả tốt nhất, với đường cong ROC cao hơn tất cả các dấu ấn riêng lẻ. AFP có hiệu suất phân loại ở mức trung bình, nhưng có thể cải thiện khi kết hợp với các dấu ấn khác. Nếu chỉ sử dụng AFP, có thể cần tối ưu lại ngưỡng cut-off để cải thiện độ nhạy và độ đặc hiệu.

Để đánh giá độ tin cậy của một bộ dữ liệu, quan sát số liệu từ diện tích dưới đường cong AUC, diện tích càng lớn, độ chính xác càng cao. Phần mềm GraphPad Prism 9.0.0 hiển thị diện tích dưới đường cong AUC của AFP là 0.719; AUC của DCP là 0.761 và AUC của TXN là 0.774. Khi kết hợp 3 chỉ thị sinh học kinh thì AUC là 0.87 (nằm trong ngưỡng Tốt: 0.8 – 0.89 [158]). Cho thấy, kết quả xét nghiệm sử dụng kháng thể đơn dòng phát hiện phối hợp ba kháng nguyên AFP, DCP, TXN tăng hiệu quả chẩn đoán rõ rệt và có độ chính xác cao, đặc biệt trong các trường hợp mắc HCC giai đoạn sớm, khi mà chỉ thị sinh học AFP thực sự không đặc hiệu ở giai đoạn này.

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 với độ tinh khiết từ 78% - 90%. 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 lympho 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. 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 và đạt độ tinh khiết cao (>95%).

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 bệnh gan lành tính), cần được đánh giá thêm độ nhạy, 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, **Hồ Trường 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Harshad, et al., 2023, Global burden of liver disease: 2023 update, *Journal of Hepatology*, Vol. 79, 516–537.
2. Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, 2020, *Ung thư biểu mô tế bào gan: Nguyên nhân, chẩn đoán và điều trị*. Truy cập ngày 19 tháng 3 năm 2021, từ <https://benhvienvietduc.org/ung-thu-bieu-mo-te-bao-gan-nguyen-nhan-chan-doan-va-dieu-tri-2.html>.
3. Llovet, et al., 2021, Hepatocellular carcinoma, *Nature reviews, Disease primers*, 7, Article 6.
4. Zacharakis, et al., 2018, New and old biomarkers of hepatocellular carcinoma, *Hepatoma Res*, 4:65.
5. Kim, 2024, Changing etiology and epidemiology of hepatocellular carcinoma: Asia and worldwide. *Journal of Liver Cancer*, 24(1), 62–70.
6. International Agency for Research on Cancer, 2024, *Liver and intrahepatic bile ducts fact sheet*. Global Cancer Observatory.
7. Hsieh, et al., 2025, Temporal trends and patterns for early- and late-onset adult liver cancer incidence vary by race/ethnicity, subsite, and histologic type in the United States from 2000 to 2019. *Cancer Causes Control*, 36, 551–560 (2025).
8. Li, et al., 2023, Global prediction of primary liver cancer incidences and mortality in 2040. *Journal of Hepatology*, 78(4), e144–e146.
9. International Agency for Research on Cancer, 2024, *Viet Nam fact sheet* [PDF]. Global Cancer Observatory.
10. Flower, et al. 2022, *Seroprevalence of Hepatitis B, C and D in Vietnam*. The Lancet Regional Health – Western Pacific, 25, 100564.
11. Schulze, et al., 2016, Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *Journal of Hepatology*, 65(5), 1031–1042.
12. Mai Hồng Bằng, 2012, *Ung thư biểu mô tế bào gan - Các phương pháp can thiệp nội mạch*. Nhà xuất bản Y học.
13. Betty, et al., 2018, Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications, *Curr Opin Virol*, 30, 32–38
14. Poisson, et al., 2024, *Hepatitis B virus as a risk factor for hepatocellular carcinoma*. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. Advance online publication.
15. Peter, et al., 2019, Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma, *Liver International*, 00, 1–16.

16. Nguyen, et al., 2018, *High burden of hepatocellular carcinoma and viral hepatitis in Vietnam*. PMC.
17. Matsushita, et al., 2019, Alcohol and hepatocellular carcinoma. *BMJ Open Gastroenterology*, 6(1), e000260.
18. Hong, et al., 2021, Effects of alcohol consumption on viral hepatitis B and C, *World J Clin Cases*, 9(33), 10052-10063.
19. European Association for the Study of the Liver, 2018, EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease, *Journal of Hepatology*, Vol. 69, 154–181.
20. Gordon, et al., 2011, Liver disease in Vietnam: Screening, surveillance, management and education. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(9), 1735–1741.
21. Llovet, et al, 2023, Nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 20, 487–503.
22. Koo, et al., 2020, Immunological distinctions between nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med*. 52(8):1209-1219.
23. A concise review of updated global guidelines for the management of hepatocellular carcinoma: 2017–2024, 2023, *J Liver Cancer*.
24. Lee, et al., 2022, Liquid biopsy for early detection and therapeutic monitoring of HCC. *J Liver Cancer*. 22(2): 120-134.
25. Yasi, et al., 2020, Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Future Perspectives, *Biomedicines*, 8, 576.
26. Galle, et al., 2019, Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma, *Liver International*, 00, 1–16.
27. Lazarevich, 2000, Molecular mechanisms of alpha - fetoprotein gene expression, *Biochemistry (Mosc)*, 65, 117-133.
28. Camper, et al., 1989, Postnatal repression of the alpha-feto protein gene is enhancer independent, *Genes Dev*, 3, 537-546.
29. Zhang, et al., 2021, Alpha-fetoprotein: A new perspective on the mechanism of hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11, Article 757940.
30. Lamerz, 2013, Are biomarkers still helpful in hepatocellular carcinoma ?, *Digestion*, 87, 118-120.

31. Gotsman, et al., 2002, Induction of immune tolerance toward tumor-associated antigens enables growth of human hepatoma in mic, *Int J Cancer*, 97, 52-57.
32. Trevisani, et al., 2001, Serum a-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: Influence of HBsAg and anti-HCV status, *J. Hepatol*, 570–575.
33. Wu, et al., 2019, Racial disparities in alpha-fetoprotein testing and alpha-fetoprotein status associated with the diagnosis and outcome of hepatocellular carcinoma patients, *Cancer Med*, 8, 6614–6623.
34. Shoujie, et al., 2020, The diagnostic value of the combination of Golgi protein 73, glypican-3 and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: a diagnostic meta-analysis, *Ann Transl Med*, 8(8), 536.
35. Baek, et al., 2009, Diagnostic role and correlation with staging systems of PIVKA-II compared with AFP, *Hepatogastroenterology*, Vol. 56, No. 91-92, 763–767.
36. Andreana, et al., 2009, Surveillance and diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis, *World J Hepatol*, 1(1), 48-61.
37. Chen, et al., 2023, Comparison of diagnostic performance of AFP, DCP and two diagnostic models in hepatocellular carcinoma: a retrospective study, *Annals of Hepatology*, Volume 28, Issue 4.
38. Fujirebio Inc., 2022, *Lumipulse® G PIVKA-II: quantitative measurement of PIVKA-II in human serum*. Truy cập ngày 19 tháng 12 năm 2024, từ <https://www.fujirebio.com/en/products-solutions/lumipulser-g-pivkaii>
39. Masaya, et al., 2002, Serum and tissue PIVKA-II expression reflect the biological malignant potential of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, Volume 22, Issue 4, 2002, 261-269.
40. Pekkari, 2004, A. Truncated thioredoxin: physiological functions and mechanism. *Antioxid Redox Signal*. 6(1):53-61.
41. Mohammadi, 2019, The thioredoxin system and cancer therapy: a review. *Cancer Chemother Pharmacol*. 84(5):925-935.
42. Abdelwahab, et al., 2024, Evaluation of serum thioredoxin as a hepatocellular carcinoma diagnostic marker. *Egypt Liver Journal* 14, 3.
43. Chengmeng, et al., 2023, Thioredoxin facilitates hepatocellular carcinoma stemness and metastasis by increasing BACH1 stability to activate the AKT/mTOR pathway, *The FASEB Journal*, 37: e22943.

44. Kim, et al., 2015, Thioredoxin and its relevance as a prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(1), 109-117.
45. Sato, et al., 2016, The diagnostic role of serum thioredoxin in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 22(3), 673-681.
46. Wang, et al., 2020, AFP and TXN as complementary biomarkers in HCC diagnosis. *Liver International*, 40(7), 1754-1763.
47. Jun Li, et al., 2015, Serum thioredoxin is a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*, 6(11), 9551-63.
48. Zenlander, et al., 2023, A wide scan of plasma proteins demonstrates thioredoxin reductase 1 as a potential new diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol*; 58(9): 998-1008.
49. National Cancer Institute. *Monoclonal antibodies*. In *Immunotherapy types*. Truy cập ngày 18 tháng 12 năm 2024, từ <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/monoclonal-antibodies>
50. Waldmann, et al., 1991, Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy, *Science*, 252(5013), 1657-1662.
51. Lipman, et al., 2005, Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources, *ILAR journal*, 46(3), 258-268.
52. Rohit, 2023, Recent Advances in the Development of Monoclonal Antibodies and Next-Generation Antibodies. *Immunohorizons*. 7 (12): 886–897
53. Garnock, et al., 2010, Trastuzumab: A review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer. *Drugs*. 70(2):215-39.
54. Feng M, et al., 2013 Therapeutically targeting glypican-3 via a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(12):E1083-91.
55. Đàm Thị Tú Anh, 2016, *Nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt ứng dụng trong chẩn đoán*, Luận án tiến sĩ, Đại học Y Hà Nội.
56. Academy of Science and Technology (2024). *ELISA kit to quantify cancer antigen CA125 to diagnose ovarian cancer successfully made*. Truy cập ngày 11 tháng 11 năm 2025, từ <https://vast.gov.vn/web/vietnam-academy-of-science-and-technology/tin-chi-tiet/-/chi-tiet/elisa-kit-to-quantify-cancer-antigen-ca125-to-diagnose-ovarian-cancer-successfully-made-120009-868.html>

57. Yun, et al., 2020, Significance of Detection of the HER2 Gene and PD-1/PD-L1 in Gastric Cancer. *J Oncol.* 2020:8678945.
58. Molica, et al., 2021, CD33 Expression and Gentuzumab Ozogamicin in Acute Myeloid Leukemia: Two Sides of the Same Coin. *Cancers (Basel).* 13(13):3214.
59. Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh. (2024). *Thành công trong việc tạo bộ kháng thể đơn dòng tái tổ hợp đặc hiệu tế bào T (CD3, CD4, CD8) ứng dụng trong chẩn đoán bệnh.* Truy cập ngày 11 tháng 11 năm 2025, từ <https://dost.hochiminhcity.gov.vn/hoat-dong-so-khcn/thanh-cong-trong-viec-tao-bo-khang-the-don-dong-tai-to-hop-dac-hieu-te-bao-t-cd3-cd4-cd8-ung-dung-trong-chan-doan-benh/>
60. Sham, et al., 2014, Glypican-3-targeted 89Zr PET imaging of hepatocellular carcinoma. *J Nucl Med.* 55(5):799-804.
61. Fleuren, et al., 2014, Theranostic applications of antibodies in oncology, *Molecular Oncology*, Volume 8, Issue 4 p. 799-812.
62. Crişan, et al., 2022, Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. *International Journal of Molecular Sciences.* 23. 5023. 10.3390/ijms23095023.
63. Lê Nhật Minh, 2020, Hiệu quả gắn nhãn của phức hợp nano kháng thể đơn dòng CD133 liên hợp Tb3+ nhắm mục tiêu vào các tế bào ung thư di căn trong ống nghiệm. *Tạp chí Công nghệ sinh học Việt Nam* , 17 (3), 435–440.
64. Leavy, et al., 2016, The birth of monoclonal antibodies, *Nature Immunology*, 17(Suppl 1), S13-S13.
65. Spieker, et al., 1995, Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9348-9352.
66. Yang, et al., 2006, Polyethylene glycol-mediated cell fusion, *Nuclear Reprogramming: Methods and Protocols*, 59-66.
67. Danaher Life Sciences. *Hybridoma technology: Monoclonal antibody production.* Truy cập ngày 19 tháng 12 năm 2023, từ <https://lifesciences.danaher.com/us/en/library/antibody-generation-hybridoma.html>
68. Tomita, et al., 2011, Hybridoma technologies for antibody production, *Immunotherapy*, 3(3), 371-380.

69. Mitra, et al., 2021, Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-12.
70. Hinali, et al., 2013, Advance research on monoclonal antibody for cancer treatment, *Innovare Journal of Sciences*, 4-9.
71. Almagro, et al., 2018, *Antibody engineering: The advancements and applications*. MAbs, 10(2): 212–236.
72. Nelson, et al., 2010, *Development of therapeutic antibodies for oncology*. Nat Rev Cancer, 10: 329–344.
73. Strohl, 2018, *Current progress in innovative engineered antibodies*. Protein Cell, 9(1): 86–120.
74. Klee, et al., 2000, Human anti-mouse antibodies. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 124(6), 921-923.
75. Zhang, et al., 2016, Humanization of high-affinity antibodies targeting glypican-3 in hepatocellular carcinoma, *Scientific reports*, 6(1), 33878.
76. The International Immunogenetics Information System, *IMGT/mAb-DB documentation*. Truy cập ngày 15 tháng 3 năm 2023, từ <https://www.imgt.org/mAb-DB/doc>.
77. Ho, et al., 2011, A novel high-affinity human monoclonal antibody to mesothelin, *International Journal of Cancer*, 128(9), 2020-2030.
78. Seeber, et al., 2014, A robust high throughput platform to generate functional recombinant monoclonal antibodies using rabbit B cells from peripheral blood, *PloS one*, 9(2), 861-884.
79. Wardemann, et al., 2003, Predominant autoantibody production by early human B cell precursors, *Science*, 301(5638), 1374-1377.
80. NCBI, *AFP alpha fetoprotein [Homo sapiens (human)]*. Truy cập ngày 25 tháng 6 năm 2022, từ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/174>
81. NCBI, *NM_000506.5(F2):c.423-7G>C AND Congenital prothrombin deficiency*. Truy cập ngày 21 tháng 2 năm 2024, từ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000205022.31/>
82. NCBI, *TXN thioredoxin [Homo sapiens (human)]*. Truy cập ngày 12 tháng 3 năm 2024, từ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=Details-Search&Term=7295>
83. Jensen, et al., 2020, IEDB: Database for immunological epitope data. *Immunology Database and Analysis Resource*.

84. IEDB. *Discotope: A tool for predicting protein-binding epitopes*. Immune Epitope Database (IEDB). Truy cập ngày 23 tháng 8 năm 2023, từ <https://tools.iedb.org/discotope/>
85. Dimitrov, et al., 2007, VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8, 4.
86. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. *Expasy Help*. Truy cập ngày 6 tháng 5 năm 2024, từ <https://www.expasy.org/help>
87. Pennsylvania State University. *MEGA Software*. Truy cập ngày 10 tháng 9 năm 2023, từ <https://www.megasoftware.net/>
88. Cytiva, 2023, *Ni Sepharose™ High Performance: Hướng dẫn sử dụng* (Mã tài liệu: 71502767 AG). Nhà xuất bản Cytiva. Truy cập từ: <https://cytiva-delivery.sitecorecontenthub.cloud/api/public/content/digi-12995-original>.
89. Addgene. *Coomassie purity stain for recombinant antibodies*. Truy cập ngày 29 tháng 5 năm 2025, từ <https://www.addgene.org/protocols/coomassie-purity-stain-recombinant-antibodies/>.
90. Phakham, et al., 2022, Highly efficient hybridoma generation and screening strategy for anti-PD-1 monoclonal antibody development. *Sci Rep* 12, 17792.
91. Gray, et al., 2020, Animal-derived-antibody generation faces strict reform in accordance with European Union policy on animal use. *Nat Methods* 17, 755–756.
92. Chen, et al., 2018, A novel approach for rapid high-throughput selection of recombinant functional rat monoclonal antibodies. *BMC Immunol* 19, 35.
93. InvivoGen, 2025, *Freund's Adjuvant: CFA & IFA datasheet and protocols*; Truy cập ngày 20 tháng 6 năm 2025, từ <https://www.invivo-gen.com/freunds-adjuvant>
94. Edward, 2020, Standard Immunization of Mice, Rats, and Hamsters, *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(3):100297.
95. Greenfield, 2019, *Standard immunization of mice for hybridoma production*. Cold Spring Harbor Protocols, 2019(3), pdb.prot099960.
96. R&D Systems. *ELISA Development Guide*. Minneapolis (MN): R&D Systems; Truy cập ngày 12 tháng 1 năm 2025, từ: <https://resources.rnd-systems.com/edbjan025670>.
97. Köhler, 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256(5517):495-7.

98. Harlow, 1988, *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
99. Valdés, et al., 2017, Mouse Hybridoma Cell Culture in a Protein-Free Medium Using a Bio-Mimicking Fish-Tail Disc Stirred Bioreactor. *BioProcessing Journal*, 16(1).
100. Alice, 2015, Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318, 51-59.
101. Lardeux, 2016, Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111(8), 501-504.
102. Oyama, et al., 2024, Relationship between protein conformational stability and its immunogenicity when administering antigens to mice using adjuvants-Analysis employed the CH2 domain in human antibodies. *PLoS One*. 19(7):e0307320.
103. Pechkova, et al., 2022, *Crystal structure of human alpha-fetoprotein (AFP)* [Protein Data Bank entry 7YIM]. RCSB Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/structure/7YIM>
104. Hu, et al., 2014, A meta-learning approach for B-cell conformational epitope prediction. *BMC Bioinformatics* 15, 378.
105. Huang, et al., 2006, CED: a conformational epitope database. *BMC Immunol*. 7:7.
106. Hu, et al., 2014, A meta-learning approach for B-cell conformational epitope prediction. *BMC Bioinformatics* 15, 378.
107. Dubois, et al., 2012, Optimization of peptide-based ELISA for serological diagnostics: a retrospective study of human monkeypox infection. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 12(5):400-9.
108. Nowak, et al., 2017, Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide. *MAbs*. 9(8):1217-1230.
109. Epitope – an overview. In *ScienceDirect Topics: Immunology & Microbiology*. Truy cập ngày 26 tháng 7 năm 2025, từ <https://www.science-direct.com/topics/immunology-and-microbiology/epitope>.
110. Jäger, et al., 2013., High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 13, 52.
111. Doytchinova, et al., 2007, VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8, Article 4.

112. ScienceDirect Contributors, 2022, *Multi-Epitope Vaccine*. Truy cập ngày 12 tháng 3 năm 2024, từ <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/multi-epitope-vaccine>.
113. Sahdev, et al., 2008, Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1–2), 249–264.
114. Sorensen, et al., 2005, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128.
115. Boismenu, 1997, Purification and characterization of human and mouse recombinant alpha-fetoproteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 10(1):10-26.
116. Li, et al., 2022, Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector. *Microb Cell Fact*, 21, 244.
117. Sahaf, et al., 2000, Secretion of 10-kDa and 12-kDa thioredoxin species from blood monocytes and transformed leukocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2(4):717-26..
118. LaVallie, 1993, A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)*. 11(2):187-93.
119. Shen, 2013, Cloning, expression, purification, monoclonal antibody preparation and identification of abnormal thrombin DCP gene. *World Chinese Journal of Digestion* 2013. 21(35): 3932-3939.
120. Kumar, 2004, Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(11):3759-64.
121. Sino Biological. *Human Alpha Fetoprotein Recombinant Protein (12177-H08H)*, Truy cập ngày 22 tháng 11 năm 2024, từ <https://www.sino-biological.com/recombinant-proteins/human-alpha-fetoprotein-12177-h08h?utm>.
122. Sigma-Aldrich. *Handling Inclusion Bodies in Recombinant Protein Expression*. Truy cập ngày 22 tháng 1 năm 2024, từ <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/handling-inclusion-bodies>
123. Sino Biological. *Thioredoxin (TRX) Proteins Resource*. Truy cập ngày 22 tháng 11 năm 2024, từ <https://www.sinobiological.com/resource/thioredoxin-trx/proteins?utm>.

124. Canadian Council on Animal Care, 2002, *CCAC guidelines on: antibody production*. Truy cập ngày 15 tháng 6 năm 2025, từ https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf

125. Leenaars, 2005, Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations. *ILAR Journal*, 46(3), 269–279.

126. Parray, et al., 2020, Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int Immunopharmacol*. 85:106639.

127. Shen, et al., 2022, Generation and Characterization of an Anti-diclazuril Monoclonal Antibody and Development of a Diagnostic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Poultry. *Front Nutr*.9:910876.

128. Thermo Fisher Scientific. *Factors Affecting ELISA Signal*. Thermo Fisher Scientific; Truy cập ngày 12 tháng 4 năm 2025, từ <https://www.thermo-fisher.com/vn/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa/factors-affecting-ELISA-signal.html>

129. Jones, et al., 1990, Increased monoclonal antibody ascites production in mice primed with Freund's incomplete adjuvant. *J Immunol Methods*. 129(2):227-31.

130. Hoogenraad, et al., 1983, The effect of pre-injection of mice with pristane on ascites tumour formation and monoclonal antibody production. *J Immunol Methods*. 61(3):317-20.

131. Lacy, et al., 1986, A modified method to induce immune polyclonal ascites fluid in BALB/c mice using Sp2/0-Ag14 cells. *J Immunol Methods*. 87(2):169-77.

132. Liu, et al., 1996, Monoclonal Antibody-Based ELISA for Detection of Clostridium perfringens Alpha-Toxin. *J Food Prot*. 59(6):621-625.

133. Sigma-Aldrich. *Antibody basics*. Truy cập ngày 12 tháng 4 năm 2025, từ <https://www.sigmaaldrich.com/VN/vi/technicaldocuments/technicalarticle/protein-biology/western-blotting/antibody-basics>.

134. Amersham Biosciences, 2001, *Antibody Purification Handbook* (Handbook No. 18-1037-46).

135. Kim, et al., 2011, Clinical characteristics of non-b non-c hepatocellular carcinoma: a single-center retrospective study, *Digestion*, 84(Suppl. 1), 43-49.

136. Weinmann, et al., 2014, Trends in epidemiology, treatment, and survival of hepatocellular carcinoma patients between 1998 and 2009, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48(3), 279-289.
137. Ha, et al., 2016, Race/ethnicity-specific disparities in cancer incidence, burden of disease, and overall survival among patients with hepatocellular carcinoma in the united states, *Cancer*, 122(16), 2512-2523.
138. Rich, et al., 2020, Hepatocellular carcinoma incidence is decreasing among younger adults in the united states, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(1), 242-248.
139. Zhang, et al., 2020, Sex and race disparities in the incidence of hepatocellular carcinoma in the united states examined through age–period–cohort analysis, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 29(1), 88-94.
140. Wang, et al., 2019, Factors associated with favorable survival outcomes for asians with hepatocellular carcinoma: a sequential matching cohort study, *Plos One*, 14(4), 214-221.
141. Ganne, et al., 2018, Estimate of hepatocellular carcinoma incidence in patients with alcoholic cirrhosis, *Journal of Hepatology*, 69(6), 1274-1283.
142. Yang, et al., 2019, A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 589-604.
143. Ye, et al., 2010, Current approaches to the treatment of early hepatocellular carcinoma, *The Oncologist*, 15(S4), 34-41.
144. Ibrahim, et al., 2021, Evaluation of serum alpha fetoprotein-13 as an accuracy novel biomarker for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma in egyptian patients, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 5760-5764.
145. Zhang, et al., 2024, Cryptogenic non-cirrhotic HCC: Clinical, prognostic and molecular characteristics. *Scientific Reports*, 14(1), 12345.
146. Bruix, et al., 2016, Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*; 150(4):835-53.
147. Tsochatzis, et al., 2014, Liver cirrhosis. *Lancet*, 383(9930):1749-61.
148. Schäfer, et al., 2016, Development of monoclonal antibody-based ELISA systems: Current status and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(2), 351–360.

149. Zhang, et al., 2023, Early-stage characterization of monoclonal antibodies targeting tumor biomarkers: Application in quantitative ELISA. *Scientific Reports*, 13(1), 11844.
150. Wenjing, et al., 2024, Hepatocellular carcinoma biomarkers screening based on hydrogel photonic barcodes with tyramine deposition amplified ELISA, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 255, 116270.
151. Chan, et al., 2014, Performance of serum α -fetoprotein levels in the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with a hepatic mass. *HPB (Oxford)*. 16(4):366-72.
152. Attia, et al., 2022, Diagnostic value of serum PIVKA-II and AFP in hepatocellular carcinoma among patients with liver cirrhosis. *Diagnostics (Basel)*.12(2):357.
153. Attia, et al., 2022, Combined assessment of serum AFP and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma diagnosis: diagnostic accuracy and performance. *Diagnostics (Basel)*. 12(4):906.
154. Li, et al., 2015, Serum thioredoxin is a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 6(11):9556-9563
155. Shibata, et al., 2015, Serum thioredoxin levels as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 6(38):38500-38507.
156. Qi, et al., 2017, Combination of serum tumor markers dickkopf-1, DCP and AFP for the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Volume 10, Issue 4,p 409-413.
157. Landis, et al., 1977, "The measurement of observer agreement for categorical data". *Biometrics*. 33 (1): 159–174.
158. Huy, et al., 2025, Application of Indirect ELISA and PCR Techniques for Detecting of Hepatocellular Carcinoma using Des-gamma Carboxyprothrombin, Alpha-fetoprotein, and Thioredoxin Biomarkers. *Mol Biotechnol*.
159. Yuhsaku, et al., 2000, The usefulness of determining des-gamma-carboxy prothrombin by sensitive enzym immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma, *Cancer*, Volume 82, Issue 9, p. 1643-1648.
160. Çorbacioğlu, et al., 2023, Receiver operating characteristic curve analysis in diagnostic accuracy studies: A guide to interpreting the area under the curve value. *Turk J Emerg Med*. 23(4):195-198.

PHỤ LỤC 1
BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Số: - Mã hồ sơ:.....

- Mã nghiên cứu:.....

Họ và tên: Năm sinh: Giới:.....

Địa chỉ:.....

Điện thoại:

Ngày vào viện: Ngày ra viện:.....

Chẩn đoán:.....

1. Tiền sử

Bản thân: Nghiện rượu Viêm, xơ gan Hút thuốc

Gia đình: Có người UTG Khỏe mạnh

2. Triệu chứng lâm sàng

Triệu chứng	Có	Không	Triệu chứng	Có	Không
Mệt mỏi			Bàn tay son		
Chán ăn, ăn kém			Sao mạch		
Gầy sút cân (kg/tháng)			Xuất huyết dưới da		
Đau, tức bụng - HSP			THBH		
Sốt			Cổ trướng (ít, nhiều)		
Vàng da, củng mạc			Gan to		
Phù			Lách to (độ 1, 2, 3)		

Số hồ sơ:

Số bệnh án nghiên cứu: Mã lưu mẫu:

3. Cận lâm sàng

3.1. Xét nghiệm huyết học, sinh hóa

BC	HC	TC	PT%	Ure	Cre	Glu	GOT	GPT	GGT

3.2. Xét nghiệm vi sinh, miễn dịch, sinh học phân tử

BilTP	BilTT	Pro	Albu	HBsAg	Anti-HCV	AFP	DCP

3.3. Chẩn đoán hình ảnh

.....

.....

3.4. Xét nghiệm giải phẫu bệnh

.....
.....

Xác nhận của Khoa A3B

....., ngày.....tháng.....năm.....

Người lập phiếu

PHỤ LỤC 2

1. Định dạng FASTA tham khảo của AFP

>NP_001125.1 alpha-fetoprotein precursor [Homo sapiens]
 MKSLLLLVLCLAGFSLGLCLAGRPSVLQESGGGASGGRRGRGLQGNLRGS
 GGALGGGSLIRLVEGNPLPLSQETNPLLIASGLNFSDFAIQDTGKLTTLKD
 ELMEKLVELSPKYQLGEDVRVVSIFYALGAEGLRQKEIQNAVNGVLATVM
 AGTASIAKAVTALNQCTGNLSIAQVAFINNPDPVPGVVLLSSILQKVGGLSTL
 GYHNLTSLGDLLNSVLSAGTLRVDLHRKSDWTEQGTLVAEAVSLVRVDFT
 NPSTLPVSFFLQSSSFFMALGYLGYVYVGYLGYVGYVYVYVGYLGYIYGYIG
 YIYLGYLGYLGLGQLGVLNLHRGQALRAVHLQK GKDL SGASAIHNLITELV
 VLNGRKGNLGNAVSKVSAVATETVITNGSYFQEFLIQAPAILVNIVLSAGTS
 LHTLFGQVLA VHEYLSELKALGGHVRLSLDAVKVTDGALGPLGTRTMGLL
 A.AVRAHGTVSVFLRVA.APPAPVASFDSSVPEELQQLVQRLQDSLGGLLGG
 AKALSRLVPPRHEVVMVQSAMVRTPVGEEAFPLSPKVS YVKEQQSGNEQ
 ESVTVGQVVQA.AYQGRYLL...

2. Định dạng FASTA tham khảo của DCP

>NP_000497.1 prothrombin precursor [Homo sapiens]
 MRRAPVVLILLVLVGNVLVWRKTRSVEGSSNAVSNHHRQHLLLQQAQG
 SVEDSGKELKPYIDNTFVALYTDWSFYLLRHGGSYVYTRVVNRYRNVKITK
 NLQNIVSWGEECAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKETKLTGIVSQMCVLLEG
 GHCFPGEGTKVNAFYRQVLV RPSEYAVATL FKDRISDISNADAVTGVAVLI
 YDYQTKSRYLLKSSHVSKGQFTSDFTNRINKILNRPKRTPPKSLLRIFTLGGT
 EASWVLTA.AHCLEHFVRSYNPDGYFRLF EKTRWNKPEEHPVLKFGSGYVS
 GWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLGTITDAVMFVPFGEVMAHILTRHPDNDI
 ALMLEGGKTRNPDSCKDSDSEKTDPAHKQFMCVKGKGNDDCQGDSGGPH
 VTEVEGTSFLGGCVNVHNLGAETEDTTEFWKQTAKHDQDFEEAYVLTVDK
 TEGTCHWTGFTNTDRECLRTYTYQTKVVHYRGTWGRVFHKGRSALVLQY
 LRVPLGTITDAVMFVPFGEVMAHILTRHPDNDIALMLEGGKTRNPDSCKDS
 DSEKTDPAHKQFMCVKGKGNDDCQGDSGGPHVTEVEGTSFLGGCVNVHN
 LGAETEDTTEFWKQTAKHDQDFEEAYVLTVDKTEGTCGWGNTNTDRECL
 RTYTYQTKVVHYRGTWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLGTITDAVMFVPFGE
 VMAHILTRHPDNDIALMLEGGKTRNPDSCKDSDSEKTDPAHKQFMCVKG
 GNDDCQGDSGGPHVTEVEGTSFLGGCVNVHNLGAETEDTTEFWKQTA KH
 DQDFEEAYVLTVDKTEGTCGWGNTNTDRECLRTYTYQTKVVHYRGTWGR
 V...

3. Định dạng FASTA tham khảo của TXN

>NP_003320.2 thioredoxin [Homo sapiens]

MAAAKTAAPGRVKLFGKELKGTGKPVGVPGLGKEVVFKNNGAEYALKVDD
EGQKLVVVD FSATWCGPCKMIAPDLINKYQVAGKDAVVVD FWAEWCGPC
KMIAPDLINKYQVAGKDAVVVD FWAEMWDEKGDYAPVVKVDVDE...

PHỤ LỤC 3

VIETNAM ACADEMY
OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
INSTITUTE OF GENOME RESEARCH

SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM
Independence -Freedom-Happiness

No: 06-2020 /NCHG-HĐĐĐ
Issue: Approval of IGR IRB

Ha Noi, October 12th, 2020

CERTIFICATE OF APPROVAL

Basing on the Decision No.142/QĐ-NCHG dated December 02, 2015 by the Director of Institute of Genome Research about the foundation and mandates of the Institute of Genome Research Institutional Review Board for reviewing the ethical issue in Bio-medical research.

Basing on the Agreed Minutes dated October 12, 2020 of the Institute of Genome Research Institutional Review Board (IGR IRB) and petition for the approval of project's principal investigator.

**INSTITUTE OF GENOME RESEARCH INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
IN BIO-MEDICAL RESEARCH**

Approve the ethical issues of the following research proposal

Research title: Collaboration in the research and development of the specific monoclonal antibody labeled nano DNA fluorescent kit for early diagnosis of liver cancer.

- **Principal investigator:** Vo Thi Bich Thuy
- **Research Institution:** Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology
- **Research period:** 2020-2024
- **Date of approval:** October 12th, 2020

IRB Vice President



Assoc. Prof. Nguyen Duy Bac, PhD

Director of
Institute of Genome Research



Assoc. Prof. Nguyen Huy Hoang, PhD

PHỤ LỤC 4**1. Môi trường LB (Luria- Bertani) lỏng (1l):**

Cao nấm men: 5 g
Tryptone: 10 g
NaCl: 5 g
Chỉnh về pH 7.2-7.4 bằng NaOH.

2. Môi trường LB đặc (1l):

Cao nấm men: 5 g
Tryptone: 10 g
NaCl: 5 g
Chỉnh về pH 7.2-7.4 bằng NaOH.
Agar bacto: 15 g

3. TAE 50X (250ml):

Tris base: 60.5 g
Acid acetic: 14.3 ml
EDTA 0.5M pH8: 25 ml
Thêm nước khử ion đến đủ 250 ml

4. Sol I (Solution I) (50ml):

Glucose 50mM: 0.45 g
Tris HCl 25mM: 1.25 ml
EDTA 10mM pH8: 1 ml
Thêm nước khử ion đến đủ 50 ml.

5. Sol II (Solution II) (10ml):

SDS 20%: 0.5 ml
NaOH 10N: 0.2 ml
Thêm nước khử ion đến đủ 10 ml.

6. Sol III (Solution III) (50ml):

Kali acetat 5M: 14.72 g
Glacial acetic acid: 5.57 ml
Thêm nước khử ion đến đủ 50 ml.

7. Lysis buffer

50mM NaH₂PO₄
500mM NaCl

8. Transfer Buffer 10X (1l)

Tris base 250mM: 30.3g

Glycine 1.92M: 144.2g

Nước cất (ddH₂O): vừa đủ 1l

9. TBS 10X (Tris-Buffered Saline) (1l)

Tris base 200mM: 24.2g

NaCl 1.37M: 80g

Nước cất (ddH₂O): vừa đủ 1l

pH: 7.4 – 8.0 bằng HCl

TBS 1X = 100ml TBS 10X + 900 ml nước cất

10. TBST (TBS + Tween-20) (1l)

Tris base 200mM: 24.2g

NaCl 1.37M: 80g

Tween-20 0.5%: 5ml

Nước cất (ddH₂O): vừa đủ 1l

pH: 7.4 – 8.0 điều chỉnh bằng HCl

TBST 1X = 100ml TBST 10X + 900 ml nước cất

11. PBS 10X (Phosphate-Buffered Saline) (1l)

NaCl 1.37M: 80g

KCL 27mM: 2g

Na₂HPO₄ 100 mM: 14.4 g

KH₂PO₄ 18mM: 2.4g

Nước cất (ddH₂O): vừa đủ 1l

pH: 7.4 điều chỉnh bằng HCl hoặc NaOH

PBS 1X = 100ml PBS 10X + 900 ml nước cất

12. Blocking Buffer 1X (1l)

BSA 5% : 50g

PBS 1X: vừa đủ 1l

13. Coating Buffer 1X (1l)

Na₂CO₃ 0.015M: 1.59g

NaHCO₃ 0.034M: 2.93g

Nước cất (ddH₂O): vừa đủ 1l

pH 9.6 điều chỉnh bằng NaOH/HCl

14. Washing Buffer 10X (1l)

NaCl 1.37M: 80g

KCL 27mM: 2g

Na₂HPO₄ 100 mM: 14.4 gKH₂PO₄ 18mM: 2.4g

Tween-20 0.05%: 5ml

Nước cất (ddH₂O): vừa đủ 1l

pH: 7.4 điều chỉnh bằng HCl hoặc NaOH

Washing Buffer 1X = 100ml Washing Buffer 10X + 900 ml nước cất

15. Antibody Dilution Buffer 1X (1l)

PBS 1X: 1l

Tween-20 0.05%: 0.5ml

BSA 1%: 10g

16. GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Tris-HCl (10 mM, pH 7.5–8.0)

EDTA (1 mM)

Glycerol (50%)

Loading dye

17. GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Tris-HCl (pH 7.5) (10mM)

EDTA (1 mM)

Glycerol 50%

Loading dye

18. PageRuler™ Thang chuẩn Protein đã nhuộmTris-H₃PO₄ (pH 7,5 tại 25°C): 62,5 mM

EDTA: 1 mM

SDS: 2%

DTT: 10 mM

NaN₃: 1 mM

Glycerol: 33%

19. PureLink™ Quick Gel Extraction Kit của Invitrogen

PureLink™ Quick Gel Extraction Buffer

PureLink™ Quick Gel Binding Buffer

PureLink™ QuickSpin Columns

PureLink™ DNase/RNase-Free Water

PureLink™ Quick Gel Elution Buffer

20. PCR Master Mix (2X)

DNA Polymerase

dNTPs

Buffer (Tris-HCl, KCl, MgCl₂)Mg²⁺**21. GeneJET PCR Purification Kit**

Binding Buffer

Wash Buffer

Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)

GeneJET Purification Columns

22. HisPur™ Ni-NTA Spin Columns Kit

HisPur Ni-NTA Spin Columns

Phosphate-Buffered Saline (10X)

Imidazole (2M, pH 7.4)

23. NAb™ Protein A/G Spin Columns Kit

Protein A/G Agarose Resin

Spin Columns

Collection Tubes

Binding Buffer

Wash Buffer

Elution Buffer

Neutralization Buffer

24. 1-Step™ TMB ELISA Substrate Solutions

Ultra TMB-ELISA Substrate

Turbo TMB-ELISA Substrate

Slow TMB-ELISA Substrate

25. 1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)

Hydrogen Peroxide (H₂O₂)

Dung môi và chất ổn định

Không chứa DMF hoặc DMSO

24. Các kháng thể thương mại

Kháng thể thương mại	Isotype & Nguồn tạo (loài, clonality)	Ứng dụng	Tính đặc hiệu loài	Định dạng/Nồng độ	Data sheet	Ghi chú kỹ thuật
<i>Anti-alpha 1 Fetoprotein antibody [AFP-01] (Abcam, Cat# ab3980)</i>	Chuột, IgG1, đơn dòng (clone AFP-01)	ICC/IF (ở mẫu người)	Người	Dung dịch PBS (pH7.4) chứa 0.097% NaN ₃ , tinh sạch; Nồng độ: không công bố	Abcam datasheet (AFP-01, ab3980)	Đề xuất dùng 5 µg/ml cho ICC/IF; tinh sạch cao
<i>Anti-Human PIVKA-II/DCP Monoclonal Ab (clone 1A301) (MyBioSource, Cat# MBS1586477)</i>	Chuột, IgG (đơn dòng, clone 1A301)	ELISA	Người	Dung dịch PBS (pH7.4) có chất bảo quản, Nồng độ: 2.24 mg/ml; độ tinh sạch >95% (SDS-PAGE)	MyBioSource datasheet (clone 1A301), AntibodySystem	Tinh sạch cao (>95%, Protein A/G purified); không có thông tin IHC/WB. Sử dụng kháng nguyên PIVKA-II (des-gamma-carboxyprothrombin) tái tổ hợp người làm kháng nguyên.
<i>Anti-TXN (Thioredoxin) monoclonal Ab (Sigma, Cat# WH0007295M1)</i>	Chuột, IgG1κ, đơn dòng (clone 2A7)	IP, ELISA, IF, Western blot (WB)	Người	Dung dịch PBS (pH7.4); kháng thể tinh sạch; Nồng độ: không công bố	Sigma-Aldrich (WH0007295M1)	Đề xuất pha loãng 1–5 µg/ml cho WB; kháng nguyên: protein thioredoxin tái tổ hợp (GST-tag).

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

DANH SÁCH BỆNH NHÂN NGHIÊN CỨU

BỆNH VIỆN TƯQĐ 108

Đề tài: “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”

Người thực hiện: Bs. Hồ Trường Giang

I. Danh sách bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan (HCC)

STT	Họ và tên	Năm sinh	Giới tính	Ngày vào viện	Mã hồ sơ
1	Lê Quang H	1967	Nam	3-Aug-23	24040526
2	Lê Quốc S	1953	Nam	10-Aug-23	24042877
3	Trần Đình Đ	1956	Nam	10-Aug-23	24076778
4	Đào Khắc T	1986	Nam	14-Aug-23	24078379
5	Nguyễn Việt T	1968	Nam	21-Aug-23	24064883
6	Nguyễn Văn Th	1958	Nam	22-Aug-23	24114526
7	Lê Văn M	1958	Nam	24-Aug-23	24114271
8	Nguyễn B	1956	Nam	25-Aug-23	24128859
9	Đỗ Văn Th	1963	Nam	6-Sep-23	24146096
10	Trần Văn Qu	1985	Nam	12-Sep-23	24146506
11	Nguyễn Thị L	1962	Nữ	18-Sep-23	24191461
12	Vũ Văn Đ	1971	Nam	19-Sep-23	24099761
13	Trương Xuân L	1946	Nam	19-Sep-23	24151248
14	Vũ Quang L	1958	Nam	20-Sep-23	24181617
15	Nguyễn Hữu Th	1950	Nam	28-Sep-23	24164930
16	Nguyễn Văn R	1959	Nam	28-Sep-23	24249053
17	Hoàng Tiến H	1983	Nam	3-Oct-23	24149229
18	Hoàng Vũ Th	1958	Nam	11-Oct-23	24282965
19	Nguyễn Thị L	1960	Nữ	12-Oct-23	24293882
20	Vũ Thị S	1949	Nữ	17-Oct-23	24254657
21	Bùi Hồng Qu	1966	Nam	24-Oct-23	24290848
22	Lê Văn Th	1961	Nam	26-Oct-23	24336144
23	Nguyễn Sỹ Ng	1981	Nam	26-Oct-23	24345073
24	Lưu Viết T	1947	Nam	27-Oct-23	24317903
25	Trần Qu	1972	Nam	30-Oct-23	24370089



26	Nguyễn Ngọc V	1956	Nam	9-Nov-23	24367148
27	Mai Th	1958	Nam	21-Nov-23	24448781
28	Đình Văn M	1955	Nam	4-Dec-23	24481866
29	Trương Văn Kh	1984	Nam	5-Dec-23	24328177
30	Lê Ngọc L	1950	Nam	7-Dec-23	24510803
31	Đình Thị Ph	1969	Nữ	14-Dec-23	24531102
32	Trần Văn T	1954	Nam	19-Dec-23	24557718
33	Nguyễn Duy H	1958	Nam	2-Jan-24	24595334
34	Nguyễn Văn Kh	1959	Nam	2-Jan-24	24596021
35	Nguyễn Văn Đ	1965	Nam	3-Jan-24	24599922
36	Hoàng Xuân D	1960	Nam	4-Jan-24	24597805
37	Hoàng Thị Th	1949	Nữ	12-Jan-24	24634847
38	Hoàng Văn B	1961	Nam	25-Jan-24	24672683
39	Quách Đại Th	1971	Nam	29-Jan-24	24682106
40	Nguyễn Văn Th	1953	Nam	30-Jan-24	24648865
41	Dương Văn C	1952	Nam	23-Feb-24	24738334
42	Nguyễn Quý M	1977	Nam	27-Feb-24	24749480
43	Trần N	1947	Nam	5-Mar-24	24773680
44	Phạm Thị X	1955	Nữ	7-Mar-24	24763157
45	Lê Ngọc Th	1957	Nam	14-Mar-24	24758771
46	Hoàng Văn Th	1962	Nam	24-Apr-24	24916439
47	Nguyễn Đoàn H	1956	Nam	13-May-24	25040986



II. Danh sách bệnh nhân mắc bệnh lý tại gan nhưng không bị HCC

STT	Họ và tên	Năm sinh	Giới tính	Ngày vào viện	Mã hồ sơ
1	Hoàng Ng	1949	Nam	26-Jun-23	23898101
2	Tổng Văn K	1975	Nam	26-Jun-23	23902153
3	Nguyễn Mạnh Kh	1979	Nam	30-Jun-23	23920080
4	Đỗ Dương A	1979	Nam	30-Jun-23	23920890
5	Phạm Văn Đ	1952	Nam	1-Jul-23	23921739
6	Chu Ngọc Tr	1972	Nam	1-Jul-23	23921760
7	Cao Xuân Th	1964	Nam	6-Jul-23	23938555
8	Nguyễn Việt T	1977	Nam	7-Jul-23	23944864
9	Bùi Quang Th	1986	Nam	10-Jul-23	23950945
10	Nguyễn Đình T	1963	Nam	10-Jul-23	23955176

III. Danh sách bệnh nhân không mắc bệnh lý tại gan

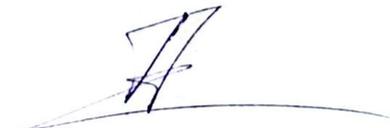
STT	Họ và tên	Năm sinh	Giới tính	Ngày vào viện	Mã hồ sơ
1	Lê Thị H	1985	Nữ	21-Jun-23	23885828
2	Đào Thị Tr	1966	Nữ	24-Jun-23	23896057
3	Phạm Thị L	1948	Nữ	25-Jun-23	23897088
4	Nguyễn Thị Gi	1957	Nữ	28-Jun-23	23883076
5	Đỗ Văn Th	1955	Nam	29-Jun-23	23916100
6	Đỗ Văn Kh	1945	Nam	30-Jun-23	23919776
7	Trần Văn N	1974	Nam	1-Jul-23	23921570
8	Tăng Văn Th	1957	Nam	1-Jul-23	23921698
9	Phan Quang Đ	1983	Nam	10-Jul-23	23955157
10	Nguyễn Hùng T	1980	Nam	10-Jul-23	23954304
11	Đoàn Thị D	1952	Nữ	13-Jul-23	23964127
12	Nguyễn Mạnh Kh	1982	Nam	13-Jul-23	23968684
13	Nguyễn Văn S	1959	Nam	14-Jul-23	23972854
14	Trần Văn T	1986	Nam	16-Jul-23	23976978
15	Nguyễn Tiến H	1968	Nam	16-Jul-23	23977050

Hà Nội, Ngày 21 tháng 2 năm 2025

XÁC NHẬN CỦA KHOA A3B
PHÓ CHỦ NHIỆM KHOA

NGƯỜI THU THẬP SỐ LIỆU


TS. Mai Thanh Bình


Bs. Hồ Trường Giang



XÁC NHẬN CỦA BỆNH VIỆN TƯQĐ 108


KT. TRƯỞNG PHÒNG
PHÓ TRƯỞNG PHÒNG

Trung tá Nguyễn Xuân Tuyên

PHỤ LỤC 5

- I. Quyết định thành lập Hội đồng đánh giá cấp Học viện
- II. Danh sách thành viên Hội đồng có chữ ký
- III. Các bản nhận xét của tất cả thành viên Hội đồng
- IV. Biên bản Hội đồng đánh giá Luận án Tiến sĩ cấp Học viện
- V. Nghị quyết của Hội đồng đánh giá Luận án Tiến sĩ cấp Học viện
- VI. Bản giải trình các điểm bổ sung, sửa chữa sau bảo vệ Luận án Tiến sĩ
Khoa học Viện

Số: 1266/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 26 tháng 11 năm 2025

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 364/QĐ-VHL ngày 01/03/2025 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04/04/2017 của Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1948/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 847/QĐ-HVKHCN ngày 31/05/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận nghiên cứu sinh đợt 1 năm 2021;

Căn cứ Quyết định số 468/QĐ-HVKHCN ngày 30/05/2025 của Giám đốc Học viện về việc gia hạn thời gian học tập lần 1: 12 tháng từ 31/05/2025-31/05/2026 cho NCS Hồ Trường Giang;

Căn cứ Giấy ủy quyền của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ số 410/UQ-HVKHCN ngày 21/11/2025;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Hồ Trường Giang với đề tài:

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

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận án kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án tiến sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định có hiệu lực tối đa 90 ngày kể từ ngày ký. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /s/

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Giám đốc Học viện (để b/c);
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.15.

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Trần Thị Phương Anh

**DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**



(Kèm theo Quyết định số 1266/QĐ-HVKHCN ngày 26/11/2025
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận án của nghiên cứu sinh: Hồ Trường Giang

Về đề tài: 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

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Thầy hướng dẫn: 1. GS. TS. Nghiêm Ngọc Minh
- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN
2. PGS. TS. Võ Thị Bích Thủy
- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1	GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng	Công nghệ sinh học	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2	GS.TS. Trần Huy Thịnh	Sinh học phân tử	Trường Đại học Y Hà Nội, Bộ Y tế	Phản biện 1
3	PGS.TS. Nguyễn Lai Thành	Sinh học tế bào	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện 2
4	PGS. TS. Nguyễn Trung Nam	Miễn dịch học	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 3
5	TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân	Hóa sinh học	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
6	PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung	Sinh học phân tử	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Ủy viên
7	PGS.TS. Vũ Xuân Nghĩa	Sinh học phân tử	Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Bộ Quốc phòng	Ủy viên

(Hội đồng gồm 07 thành viên)./.



ĐANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Nghiên cứu sinh: Hồ Trường Giang

Đề tài: 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

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Thời gian: Bắt đầu từ 9h00, Thứ Ba, ngày 27 tháng 01 năm 2026.

TT	CHỨC DANH KHOA HỌC, HỌ VÀ TÊN	ĐƠN VỊ CÔNG TÁC	TRÁCH NHIỆM	CHỮ KÝ
1.	GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch	
2.	GS.TS. Trần Huy Thịnh	Trường Đại học Y Hà Nội, Bộ Y tế	Phản biện 1	
3.	PGS.TS. Nguyễn Lai Thành	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện 2	
4.	PGS. TS. Nguyễn Trung Nam	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 3	
5.	TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký	
6.	PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Ủy viên	
7.	PGS.TS. Vũ Xuân Nghĩa	Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Bộ Quốc phòng	Ủy viên	

Danh sách này gồm 07 thành viên.

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên nghiên cứu sinh: Hồ Trường Giang

Đề tài: *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*

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Người nhận xét luận án: GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng

Cơ quan công tác của người nhận xét: Viện Sinh học- Viện Hàn lâm KHCNVN

Nhận xét bao gồm các nội dung sau đây:

1. Nêu ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án. Cách đặt vấn đề và giải quyết vấn đề của luận án.

Luận án tập trung vào việc nghiên cứu tạo ra ba kháng thể đơn dòng đặc hiệu đối với các chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN, hướng tới ứng dụng trong phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan. Đây là một hướng nghiên cứu có giá trị khoa học rõ ràng, đáp ứng nhu cầu thực tiễn trong chẩn đoán sớm bệnh HCC- một trong những loại ung thư có tỷ lệ tử vong cao. Trong bối cảnh hiện nay, nhiều phương pháp đã và đang được áp dụng để chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan. Tuy nhiên, việc tìm kiếm và phát triển các chỉ thị sinh học có độ nhạy và độ đặc hiệu cao vẫn luôn là vấn đề mang tính thời sự. Các kết quả của luận án góp phần xây dựng cơ sở khoa học cho việc tạo ra các dòng tế bào lai ổn định sản xuất kháng thể đơn dòng, có khả năng ứng dụng trong các bộ kit ELISA phục vụ chẩn đoán sớm HCC. Tên đề tài được đặt phù hợp với chuyên ngành đào tạo, nội dung nghiên cứu bám sát mục tiêu đã đề ra. Cách đặt vấn đề và triển khai nghiên cứu có tính logic, các kết quả thu được được trình bày đúng theo mục tiêu và nội dung nghiên cứu ban đầu. Các công bố khoa học phát sinh từ luận án có tính mới, không trùng lặp, được đăng tải trên các tạp chí khoa học trong nước và quốc tế có uy tín, góp phần làm phong phú nguồn tài liệu tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo trong cùng lĩnh vực.

2. Sự hợp lý và độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu.

Luận án đã sử dụng kết hợp nhiều phương pháp nghiên cứu hiện đại và phù hợp, bao gồm các công cụ tin sinh học như BepiPred và DiscoTope, cùng với các kỹ thuật sinh học phân tử và miễn dịch học như tái tổ hợp gen, kỹ thuật miễn dịch, giải trình tự gen và các phương pháp phân tích liên quan. Các phương pháp đều được mô tả kèm theo trích dẫn tài liệu tham khảo rõ ràng, đảm bảo tính trung thực và độ tin cậy khoa học. Việc lựa chọn và áp dụng các kỹ thuật nghiên cứu là phù hợp với mục tiêu và nội dung của luận án, cho phép giải quyết một cách hiệu quả các vấn đề nghiên cứu đã đặt ra.

3. Đánh giá các kết quả đạt được, nêu những đóng góp mới và giá trị của các đóng góp đó.

** Đề tài luận án có các kết quả và tính mới đạt được như sau:*

- Đã dự đoán thành công các epitope trên các kháng nguyên AFP/DCP/TXN và đã lựa chọn được và đánh giá khả năng sử dụng làm kháng nguyên.
- Đã tạo thành công kháng thể đơn dòng từ kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN với độ nhạy là 97.87%.
- 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 giá kháng thể về độ nhạy, độ đặc hiệu khi kết hợp 3 chỉ thị này với nhau.

** Các đóng góp mới của đề tài luận án:*

- Đã tạo thành công bộ ba kháng thể đơn dòng từ kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN phục vụ cho chuẩn đoán HCC.
- 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 giá kháng thể về độ nhạy, độ đặc hiệu khi kết hợp 3 chỉ thị này với nhau.

4. Các kết luận của luận án có phù hợp với cách đặt vấn đề ở đầu luận án và có đủ sức thuyết phục hay không? Những ưu điểm và thiếu sót, những điểm cần được bổ sung và sửa chữa?

Về ưu điểm: luận án được thiết kế thí nghiệm tương đối hợp lý, với số lượng mẫu gồm 47 mẫu bệnh và 15 mẫu đối chứng. Các thí nghiệm được triển khai phù hợp với mục tiêu nghiên cứu, kết quả thu được phong phú và được trình bày rõ ràng thông qua các bảng biểu, hình ảnh minh họa kèm theo trích dẫn tài liệu đầy đủ. Nghiên cứu sinh đã công bố 4 công trình khoa học trong và ngoài nước có uy tín, phản ánh trực tiếp các kết quả chính của luận án.

Phần kết luận nên được trình bày súc tích hơn, bám sát các mục tiêu nghiên cứu và nhấn mạnh các kết quả chính. Phần kiến nghị chỉ nên tập trung vào một nội dung liên quan đến hạn chế của đề tài. Ngoài ra, cần rà soát và chỉnh sửa các lỗi chính tả, cách diễn đạt và hình thức tài liệu tham khảo.

Chỉnh sửa lại các lỗi chính tả và lỗi sử dụng câu trong toàn văn luận án, chỉnh sửa lại một số tài liệu tham khảo sai form mẫu.

5. Đánh giá về sự trùng lặp của luận án so với các đồ án, luận văn, luận án hay công trình khoa học đã công bố trong và ngoài nước? Cần khẳng định luận án có trùng lặp hay không trùng lặp? Nếu trùng lặp, đề nghị ghi rõ tên, nhà xuất bản, năm xuất bản của tài liệu đã công bố.

Luận án không có sự trùng lặp với các đồ án, luận văn, luận án hay công trình khoa học đã được công bố trong và ngoài nước. Do đối tượng và hướng tiếp cận nghiên cứu mang tính đặc thù, các công bố khoa học liên quan cũng không trùng lặp với các nghiên cứu trước đó. Hệ thống tài liệu tham khảo gồm 79 tài liệu được trích dẫn đầy đủ, trung thực và phù hợp với nội dung nghiên cứu.

6. Nhận xét về chất lượng những bài báo khoa học đã được nghiên cứu sinh công bố, khẳng định sự phù hợp về nội dung của chúng với nội dung luận án. Nhận xét về giá trị của các công trình đã công bố (cấp công bố WoS (SSCI, SCI/E, ESCI...), Scopus, quốc tế có phản biện, tạp chí trong nước được tính điểm theo Hội đồng Giáo sư nhà nước ... và xếp hạng SCIMAGO).

Nghiên cứu sinh là tác giả chính hoặc đồng tác giả của 4 công trình khoa học. Trong đó có 02 bài báo đăng trên Tạp chí Y học Việt Nam, 01 bài đăng trên Journal of Asian Scientific Research (thuộc hệ thống Scopus) và 01 bài đăng trên tạp chí Edelweiss Applied Science and Technology. Các công trình này có chất lượng tốt, nội dung phù hợp và phản ánh trung thực các kết quả nghiên cứu của luận án.

7. Tính trung thực trong việc trích dẫn các công trình đã được nghiên cứu sinh công bố trong và ngoài nước, tài liệu tham khảo.

Luận án sử dụng tổng cộng 158 tài liệu tham khảo, được trích dẫn đầy đủ, rõ ràng và đúng quy định. Nhiều tài liệu tham khảo được cập nhật trong giai đoạn 2023-2025, cho thấy nghiên cứu sinh đã tiếp cận và sử dụng các nguồn tài liệu mới, đảm bảo tính thời sự và độ tin cậy của luận án.

8. Kết luận:

a. Luận án có đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án Tiến sĩ để được bảo vệ tại Hội đồng cấp Học viện, đề nghị Học viện tổ chức hội đồng để đánh giá luận án cấp Học viện cho Nghiên cứu sinh.

b. Hoàn toàn đồng ý cho Nghiên cứu sinh được phép bảo vệ luận án cấp Học viện.

c. Nghiên cứu sinh cần phải chỉnh sửa luận án theo như góp ý các thành viên hội đồng và Quyết nghị của hội đồng trước khi in lưu triều thư viện Quốc gia.

Hà Nội, ngày 23 tháng 12 năm 2025

Người nhận xét



Nguyễn Huy Hoàng

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: **Trần Huy Thịnh**

Học hàm, học vị: **Giáo sư, Tiến sĩ**

Cơ quan công tác: **Trường Đại học Y Hà Nội**

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Hồ Trường Giang**

Tên đề tài 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.*

Chuyên ngành: **Công nghệ Sinh học**

Mã số: **9420201**

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ung thư biểu mô tế bào gan nguyên phát là một trong những căn nguyên mắc và gây tử vong đứng hàng đầu trong các loại hình ung thư. Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng lưu hành dịch tễ của viêm gan virus nên có tỷ lệ mắc và tử vong cao. Bệnh thường tiến triển trên những bệnh nhân có nguy cơ cao như: xơ gan, viêm gan mạn, viêm gan do virus... đa số bệnh nhân thường được phát hiện ở giai đoạn muộn nên có kết quả điều trị hạn chế và có tiên lượng không tốt. Sàng lọc và chẩn đoán sớm UTBMTBG ở các đối tượng có nguy cơ cao, đồng thời có những phương pháp hữu hiệu để giá hiệu quả đáp ứng điều trị ở nhóm bệnh nhân ung thư này là cần thiết và có ý nghĩa thực tế trong giai đoạn hiện nay.

Bộ ba marker AFP, AFP-L3 và PIVKA II đã khẳng định giá trị trong sàng lọc, chẩn đoán sớm khi kết hợp với các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh ở nhóm đối tượng có nguy cơ cao mắc UTBMTBG và đã được đưa vào thực hành lâm sàng. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã đưa ra các bằng chứng khoa học về các marker tiềm năng mới giúp tăng độ nhạy, độ đặc hiệu trong chẩn đoán. Việc kết hợp và tạo thành các bộ marker mới sẽ tạo sự thuận tiện khi sử dụng và đáp ứng nhiều yêu cầu khác nhau trong chẩn đoán, đánh giá tiên lượng, theo dõi đáp ứng điều trị mang lại hiệu quả thiết thực cho các bệnh nhân ung thư. Hơn nữa việc tạo các kháng thể đơn

dòng của các chỉ thị sinh học này giúp chủ động trong việc phát triển các bộ KIT chẩn đoán, chủ động về mặt công nghệ, góp phần giảm giá thành xét nghiệm so với các bộ KIT nhập khẩu là hữu ích và cần thiết. Đây là những vấn đề mới và cần ưu tiên nghiên cứu ứng dụng ở nước ta. Luận án có tính khoa học và có tính mới, cập nhật và giá trị ứng dụng cao.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với công trình đã công bố, tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài luận án, các số liệu, các kết quả nghiên cứu, các nhận xét, kết luận của luận án nhìn chung không trùng lặp với các luận án đã bảo vệ trong nước và ở nước ngoài.

Các tài liệu được trích dẫn hợp lý, đầy đủ, và được minh họa rõ trong phần tổng quan và bàn luận.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với mã số chuyên ngành:

Nội dung 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 đã cung cấp những kiến thức và kỹ năng cập nhật trong lĩnh vực chuyên ngành. Nội dung luận án phù hợp với tên đề tài, đề tài phù hợp với chuyên ngành Công nghệ Sinh học và mã số chuyên ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

- Phương pháp nghiên cứu được thiết kế phù hợp bao gồm: nghiên cứu *in silico*, tách dòng và biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp, tạo kháng thể đơn dòng, thử nghiệm kháng thể đơn dòng giúp cho luận án đạt được kết quả theo mục tiêu đề ra.
- Nghiên cứu áp dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn và cập nhật trong lĩnh vực nghiên cứu thực nghiệm tạo kháng thể đơn dòng và thử nghiệm chẩn đoán trên mẫu huyết thanh của nhóm đối tượng nghiên cứu gồm bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh gan mạn tính và người khỏe mạnh đối chứng có phương pháp phân tích, đánh giá kết quả rõ ràng, đảm bảo độ tin cậy.

- Chỉ tiêu và biến số nghiên cứu đầy đủ, phương pháp thu thập số liệu hợp lý, số liệu nghiên cứu được xử lý khoa học theo các phần mềm tiêu chuẩn trong nghiên cứu y sinh làm tăng giá trị của kết quả nghiên cứu.
- Nghiên cứu tuân thủ các vấn đề về đạo đức trong nghiên cứu y sinh.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả, những đóng góp mới cho sự phát triển của khoa học chuyên ngành, đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống, ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó

Nghiên cứu đã thu được các kết quả đáp ứng được mục tiêu đề ra ban đầu của luận án, cụ thể như sau:

- Nghiên cứu đã lựa chọn ba đoạn peptide chứa các epitop 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
- Nghiên cứu đã tạo được 06 dòng tế bào lai cho ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN. Các dòng tế bào này phát triển ổn định và sản xuất được kháng thể đơn dòng IgG đặc hiệu tương ứng với hiệu giá cao và đạt độ tinh khiết cao khi tinh sạch bằng sắc ký Protein A/G.
- 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. 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 trong xét nghiệm ELISA chẩn đoán ung thư gan, nhất là trong những trường hợp AFP đơn lẻ có độ nhạy thấp.

Các kết quả tương đối rõ ràng, phản ánh trung thực nội dung nghiên cứu, đáp ứng các mục tiêu của luận án.

Điểm mới của luận án:

- Tạo được kháng thể đơn dòng IgG đặc hiệu tương ứng với hiệu giá cao và đạt độ tinh khiết cao khi tinh sạch bằng sắc ký Protein A/G cho ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN.
- Sử dụng kháng thể đơn dòng để phát hiện AFP, DCP và TXN trong huyết thanh người bệnh bằng phương pháp ELISA gián tiếp cho kết quả có độ nhạy, độ đặc hiệu cao. Phối hợp 2 hoặc 3 chỉ thị sinh học với nhau cho kết quả chẩn đoán tốt.

6. Những ưu điểm và thiếu sót, những điểm cần bổ sung và sửa chữa.

Ưu điểm:

- Luận án được trình bày theo đúng quy định, bố cục tương đối hợp lý với đầy đủ các nội dung theo yêu cầu. Tài liệu tham khảo được trích dẫn đầy đủ.
- Kết quả phản ánh trung thực nội dung nghiên cứu. NCS nắm được các vấn đề nghiên cứu và đã hoàn thành tốt nghiên cứu.

Những điểm cần bổ sung và sửa chữa:

- Nhóm đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 3 nên bổ sung thêm tiêu chuẩn lựa chọn, cách thức chọn mẫu, các tiêu chuẩn đánh giá như giai đoạn, nhiễm HBV, HCV, xơ gan, không có bệnh lý về gan... để làm tăng giá trị của các kết quả nghiên cứu cho mục tiêu 3.
- Mục 3.1.2: Nên có kết quả giải trình tự các gen mục tiêu AFP, DCP, TXN bên cạnh kết quả điện di sau khi cắt từ vector để khẳng định các gen mục tiêu không bị đột biến, lệch khung đọc hay mất trình tự thì sẽ chính xác và thuyết phục hơn.
- Một số hình ảnh còn mờ, chưa rõ kết quả các băng điện di: hình 3.2, 3.5.
- Rà soát lỗi chính tả.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị khoa học nào, giá trị của các công trình đã công bố

Nghiên cứu sinh và nhóm nghiên cứu đã công bố 04 bài báo, trong đó có 02 bài báo trên các tạp chí uy tín quốc tế. Đây là các công trình khoa học có chất lượng và phản ánh đúng nội dung của luận án và đạt yêu cầu đối với một NCS.

8. Kết luận của bản nhận xét phải khẳng định nội dung và hình thức của luận án có đáp ứng yêu cầu một luận án tiến sĩ theo qui định hay không và có đủ điều kiện để bảo vệ luận án cấp Học Viện hay chưa.

Bản luận án có tính khoa học, có ý nghĩa thực tiễn và ứng dụng. Nội dung Luận án đáp ứng tốt các yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành theo quy định.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án.

Tôi đồng ý cho NCS trình bày luận án trước Hội đồng đánh giá cấp Học viện, nhận các ý kiến đánh giá, góp ý để hoàn chỉnh và sửa chữa. Sau khi hoàn chỉnh và sửa chữa, NCS xứng đáng được công nhận học vị Tiến sĩ.

Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2025

NGƯỜI VIẾT NHẬN XÉT



GS.TS. Trần Huy Thịnh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Nguyễn Lai Thành

Học hàm, học vị: PGS.TS

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

Họ và tên nghiên cứu sinh: Hồ Trường Giang

Tên đề tài luận án: **Nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng (AFP, DCP, TXN) và bước đầu ứng dụng trong phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Ung thư gan là căn bệnh nguy hiểm, khó điều trị trong các bệnh ung thư nói chung. Việc phát hiện sớm sẽ đem lại hiệu quả điều trị cao. Tuy vậy, gan lại là nội quan có kích thước lớn, khó tiếp cận, thăm khám toàn diện. Vì vậy sàng lọc và phát hiện sớm bằng các kỹ thuật phát hiện kháng nguyên ung thư là giải pháp đã và đang được ứng dụng, phát triển. Các giải pháp xét nghiệm dựa trên kháng thể phát hiện chính xác kháng nguyên ung thư luôn được lựa chọn cho nhiều loại ung thư trong đó đặc biệt hữu hiệu với các loại ung thư nằm sâu trong cơ thể. Nghiên cứu này nhằm phát triển các kháng thể đơn dòng có tính chính xác cao trong phát hiện ung thư gan đã hướng đến nhu cầu thiết thực của công tác chăm sóc sức khỏe con người.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Ở Việt Nam, các cơ sở nghiên cứu dù đã nhận được nhiều nguồn đầu tư, đạt được các thành quả khoa học đáng kể nhưng công nghệ sản xuất kháng thể vẫn còn khá mới mẻ do những thiếu thốn về cơ sở vật chất, thiết bị phù hợp cũng như kinh nghiệm nghiên cứu và nguồn tài chính. Nghiên cứu này thuộc nhóm nhỏ các nghiên cứu được tiến hành nhằm tạo ra kháng thể đơn dòng phục vụ sức khỏe con người. Chính vì vậy, các công bố trong nước sẽ rất khó tìm được các kết quả nghiên cứu trùng lặp. Ở góc độ Quốc tế, các công nghệ, phương pháp, kỹ thuật tạo kháng thể đơn dòng đã phát triển từ lâu ở các nước có tiềm lực kinh tế vào nền khoa học kỹ thuật phát triển, các kháng thể được sử dụng để chẩn đoán, điều trị đặc hiệu ung thư gan. Các protein AFP, DCP đã có các kháng thể thương mại dùng trong chẩn đoán, TXN cũng đã có kháng thể dùng trong nghiên cứu. Tác giả đã trình bày rõ ràng các kháng thể đơn dòng làm đối chứng trong nghiên cứu với các kháng thể tạo được.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành:

Hoàn toàn phù hợp.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong quá trình thực hiện đề tài đảm bảo được tính hiện đại, cập nhật đối với nghiên cứu thuộc lĩnh vực sinh học phân tử, sinh học tế bào, các kỹ thuật và hệ thống thiết bị hỗ trợ giúp đảm bảo độ tin cậy của kết quả thu được.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống, ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó:

Tác giả đã tạo được 6 loại tế bào có khả năng sinh kháng thể bám với ba loại kháng nguyên tái tổ hợp tương ứng với 3 gene được sử dụng làm chỉ thị ung thư biểu mô gan (AFP, DCP, TXN). Kết quả này đã thể hiện hàng loạt các thử nghiệm, kỹ thuật, phương pháp để sản xuất kháng thể đơn dòng đã được tiếp cận, thực nghiệm và dần hoàn thiện. Đây là những bước đi cần thiết, quan trọng để từng bước làm chủ công nghệ sản xuất kháng thể, một lĩnh vực đang còn rất hạn chế ở Việt Nam.

Về mặt khoa học, tác giả đã góp phần cung cấp các minh chứng về khả năng kết hợp đa kháng thể nhận diện đồng thời 3 dấu chuẩn để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm ung thư biểu mô gan.

Về mặt thực tiễn, kết quả này nếu thực sự chính xác sẽ giúp khoa học Việt Nam dần làm chủ được nguồn kháng thể phục vụ chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư gan nói riêng và các căn bệnh ung thư hoặc bệnh cần sự hỗ trợ của kháng thể đặc hiệu.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm: Kết cấu các phần hợp lý, trình bày rõ ràng, mạch lạc. Hình thức trình bày đẹp, rõ ràng. Nội dung các phần đều được trình bày hợp lý, phần tổng quan cơ bản đã phân tích được các vấn đề cần giải quyết trong nghiên cứu này. Thiết kế nghiên cứu tổng thể đảm bảo được tính khả thi trong điều kiện thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu được trình bày rõ ràng, phân tích và bàn luận khá tốt.

Nhược điểm:

- Tác giả sử dụng chuột để đưa tế bào lai vào ổ bụng nhằm tạo u bóng sinh kháng thể, tuy nhiên phần tổng quan chỉ có 1 câu đề cập tới vấn đề này. Cần giải thích lý do sử dụng phương pháp này khi Thế giới đã loại bỏ khỏi nghiên cứu do vấn đề đạo đức nghiên cứu trên động vật.
- Toàn bộ nghiên cứu có thể được chia thành 3 nội dung: tạo kháng nguyên, tạo tế bào lai sinh kháng thể và đánh giá kháng thể, thử nghiệm kháng thể tạo được trên

các mẫu bệnh phẩm đã định loại. Tác giả đã trình bày rất chi tiết, cụ thể, rõ ràng về các phương pháp cũng như kết quả nghiên cứu của nội dung thứ nhất, thứ ba và chưa thực sự đầy đủ, mạch lạc ở nội dung thứ hai dù đây là nội cần chi phí, hóa chất vật tư và công sức nghiên cứu rất lớn (ví dụ: hóa chất sử dụng cho nghiên cứu nội dung này chỉ được liệt kê 3 kháng thể và 1 môi trường DMEM không có thông số, phụ lục chỉ có phần sinh học phân tử mà không hề có phần tế bào và động vật). Tác giả cần xem xét lại và đảm bảo tính cân bằng giữa các nội dung.

- Kết quả của các bước trung gian và chi tiết quy trình tạo, nhân nuôi, sàng lọc tế bào lai sản xuất được kháng thể cần được trình bày đầy đủ hơn. Thông tin đang được trình bày trong luận án chưa đủ để đánh giá sự thành công của hoạt động nghiên cứu này.
- Hình ảnh tế bào cần giữ đúng độ phóng đại trong các ảnh minh họa. Ảnh trong luận án cho thấy tế bào có kích thước khác nhau dù được ghi chú cùng độ phóng đại. Cần có các giải thích cho mỗi hình ảnh minh họa ở phần ghi chú hình ảnh.
- Kháng nguyên *E. coli* được sử dụng làm đối chứng cần được làm rõ thu từ nguồn nào để đảm bảo tính chuẩn xác của kháng nguyên đối chứng.
- Tác giả cần bổ sung bàn luận, giải thích việc sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp để đánh giá kháng thể mà không có giai đoạn thử nghiệm trên kháng nguyên tự nhiên, gần với đặc điểm của kháng nguyên đang có trên tế bào sống.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố.

Luận án có 2 công bố trong nước hoàn toàn phù hợp với nội dung nghiên cứu.

Một công bố Quốc tế có nội dung phù hợp và một công bố Quốc tế có nội dung không nằm trong nội dung của luận án.

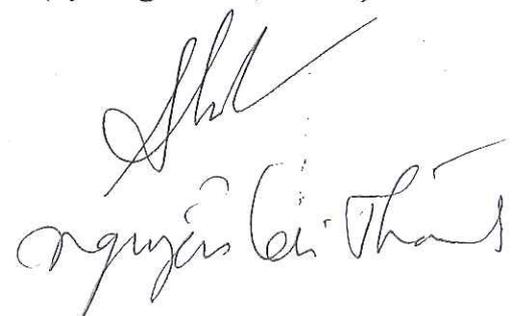
8. Kết luận chung

- Luận án đáp ứng được các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành, tuy nhiên cần có một số điều chỉnh nhỏ.
- Tóm tắt luận án đã phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.
- Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2025

Người viết nhận xét

(Ký và ghi rõ họ và tên)


Nguyễn Thị Thanh

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người phản biện luận án: Nguyễn Trung Nam

Học hàm, học vị: PGS.TS.

Cơ quan công tác: Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Họ và tên nghiên cứu sinh: Hồ Trường Giang

Tên đề tài luận án: "Nghiên cứu tạo ba kháng thể đơn dòng (AFP, DCP, TXN) và bước đầu ứng dụng trong phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan".

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là một trong những loại ung thư có tỷ lệ tử vong hàng đầu thế giới và đặc biệt cao tại Việt Nam (thường đứng thứ nhất hoặc thứ hai trong các loại ung thư ở nam giới). Xu hướng hiện nay của y học thế giới là chuyển từ điều trị sang phòng ngừa và phát hiện sớm. Hiện nay, AFP (Alpha-fetoprotein) là dấu ấn sinh học phổ biến nhất nhưng độ nhạy và độ đặc hiệu không cao, thường bỏ sót các trường hợp ung thư gan giai đoạn sớm hoặc cho kết quả dương tính giả với các bệnh lý gan lành tính. Việc tìm kiếm và ứng dụng các dấu ấn sinh học mới như TXN bên cạnh các dấu ấn kinh điển (AFP, DCP) là hướng đi rất mới và hiện đại. Luận án góp phần hoàn thiện quy trình tạo dòng tế bào Hybridoma sản xuất kháng thể đơn dòng kháng AFP, DCP và TXN có độ đặc hiệu cao, phù hợp với đặc điểm kháng nguyên của bệnh nhân Việt Nam. Việc sử dụng đơn lẻ một dấu ấn không đủ để chẩn đoán chính xác. Sự kết hợp giữa AFP, DCP và TXN được kỳ vọng sẽ tạo ra một "bộ công cụ" tối ưu hơn để tầm soát bệnh. Các bộ kit chẩn đoán sử dụng kháng thể đơn dòng hiện nay chủ yếu phải nhập khẩu với chi phí cao. Việc tự chủ công nghệ tạo kháng thể đơn dòng trong nước là yêu cầu cấp thiết để giảm giá thành và chủ động trong y tế. Đề tài phù hợp với chiến lược phát triển công nghệ sinh học của quốc gia, nhằm làm chủ các công nghệ lõi trong sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ sức khỏe cộng đồng.

2. Sự không trùng lặp của đề tài so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài không trùng lặp với các công trình luận án đã công bố ở trong và ngoài nước. Luận án có trích dẫn đầy đủ các tài liệu tham khảo.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài và nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu, nội dung nghiên cứu phù hợp với ngành mà mã số ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

NCS sử dụng các phương pháp thường quy và hiện đại trong nghiên cứu công nghệ sinh học, sinh học phân tử, hóa sinh, miễn dịch, y-sinh học, tin-sinh học ... Số liệu trong nghiên cứu được phân tích và xử lý bằng các phương pháp thống kê sinh học. Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu được sử dụng nhiều trong các công trình trong và ngoài nước, phù hợp các nội dung nghiên cứu, có tính hiện đại và độ tin cậy cao. Các thiết bị, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu từ các hãng hóa chất có nguồn gốc rõ ràng, được cung cấp bởi các hãng hóa chất uy tín, có độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã có các kết quả dự đoán các epitope của các kháng nguyên AFP, DCP và TXN bằng các công cụ tin-sinh học hiện đại và đã có kết quả 3 đoạn peptide giàu epitope từ các kháng nguyên trên, làm cơ sở cho việc tạo kháng nguyên tái tổ hợp. Tạo được kháng nguyên tái tổ hợp cho 3 chỉ thị phân tử của ung thư biểu mô tế bào gan (AFP, DCP, TXN). Kết quả của luận án đã tạo được kháng thể đơn dòng từ kháng nguyên tái tổ hợp của 3 chỉ thị phân tử trên. Đánh giá được độ nhạy và độ đặc hiệu của các kháng thể đơn dòng tạo ra, có kết quả so sánh độ nhạy và độ đặc hiệu với một số sản phẩm kháng thể thương mại. Các kết quả của luận án có giá trị khoa học và độ tin cậy cao, có giá trị trong việc tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Nội dung và hình thức của luận án phù hợp với luận án tiến sĩ. NCS trích dẫn trung đầy đủ và trung thực các công trình được nghiên cứu sinh công bố trong và ngoài nước cũng như các tài liệu tham khảo có liên quan. Một số kết luận nên ngắn gọn hơn. Chỉnh sửa một số lỗi chính tả, in ấn, và format tài liệu tham khảo.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố

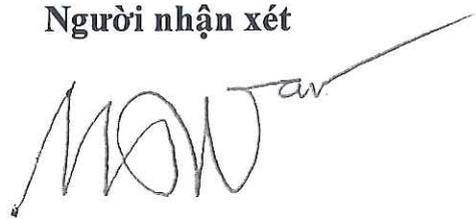
Luận án đã công bố được nhiều công trình công bố quốc tế và trong nước tại các tạp chí chất lượng tốt, bao gồm 2 bài tạp chí trong nước và 2 bài tạp chí quốc tế. Nội dung khoa học các bài báo đều là các nội dung và kết quả chủ yếu của luận án của NCS.

8. *Kết luận chung:*

- Luận án đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ ngành Sinh học.
- Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.
- Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2025

Người nhận xét

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'NTN' with a long horizontal stroke extending to the right.

PGS.TS. Nguyễn Trung Nam

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên nghiên cứu sinh: **Hồ Trường Giang**

Đề tài: *“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”*

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Người nhận xét: **TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân**

Nơi công tác: Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Chức danh trong hội đồng: Thư ký hội đồng

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular Carcinoma - HCC) là dạng ung thư gan nguyên phát phổ biến nhất, chiếm khoảng 90% tổng số các trường hợp. Hiện nay, ung thư gan là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu do ung thư trên toàn cầu và đứng thứ tư sau ung thư phổi, ung thư vú và ung thư đại trực tràng. Ung thư gan còn là nguyên nhân tử vong đứng thứ hai ở nam giới. Trước thực trạng đó, việc nghiên cứu các phương pháp chẩn đoán sớm và chính xác HCC có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong thực hành lâm sàng.

Trên thế giới, nhiều chỉ thị sinh học truyền thống như AFP, DCP, AFP-L3, GPC3, GS, HSP70... đã và đang được sử dụng trong chẩn đoán HCC. Bên cạnh đó, các chỉ thị sinh học mới như TXN, CK19, GP73, OPN, SCCA, Annexin A2, miRNA, lncRNA, CTC, cfDNA... cũng đang được nghiên cứu nhằm nâng cao độ nhạy và khả năng phát hiện sớm bệnh. Tuy nhiên, việc khai thác hiệu quả các chỉ thị sinh học này trong thực tiễn vẫn còn nhiều hạn chế.

Luận án tập trung nghiên cứu tạo ra ba kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN để ứng dụng trong phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan. Đây là hướng nghiên cứu có giá trị khoa học rõ ràng, phù hợp với xu thế nghiên cứu hiện nay và có ý nghĩa thực tiễn cao trong chẩn đoán HCC. Các nội dung nghiên cứu được triển khai logic, bám sát mục tiêu đặt ra, kết quả đạt được phù hợp với định hướng ban đầu. Các công trình khoa học được công bố từ luận án là mới, không trùng lặp, đăng tải trên các tạp chí khoa học trong nước và quốc tế có uy tín, góp phần bổ sung nguồn tư liệu tham khảo có giá trị cho các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực này.

2. Sự trùng lặp đề tài nghiên cứu so với những công trình luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước, tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn

Luận án không trùng lặp với các đồ án, luận văn, luận án hay công trình khoa học đã được công bố trong và ngoài nước. Đối tượng nghiên cứu của luận án là tập mẫu gồm

47 bệnh nhân cụ thể, có tính đặc thù riêng. Do đó các kết quả và công bố khoa học của luận án không trùng lặp với các nghiên cứu khác trong cùng lĩnh vực.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành.

Các nội dung nghiên cứu của luận án tập trung vào lĩnh vực sinh học phân tử, miễn dịch học và ứng dụng các chỉ thị sinh học trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan, hoàn toàn phù hợp với ngành đào tạo và mã số ngành đã đăng ký. Phương pháp nghiên cứu, cách tiếp cận và các kết quả đạt được đều phản ánh đúng định hướng chuyên môn của ngành, góp phần làm rõ và bổ sung các vấn đề khoa học thuộc lĩnh vực nghiên cứu. Nhìn chung, luận án bảo đảm sự phù hợp chặt chẽ giữa tên đề tài, nội dung nghiên cứu và ngành đào tạo, đáp ứng đầy đủ các yêu cầu về tính khoa học, tính chuyên ngành và tính định hướng của một luận án tiến sĩ.

4. Sự hợp lý và độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Luận án được thực hiện trên tập mẫu gồm 47 mẫu bệnh và 15 mẫu đối chứng đã được lựa chọn và thu thập theo các tiêu chuẩn nghiên cứu cụ thể, phù hợp với mục tiêu của đề tài. Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng đa dạng, kết hợp giữa công cụ tin sinh học (như BepiPred, DiscoTope) với các kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản và hiện đại, bao gồm công nghệ tái tổ hợp gen, các kỹ thuật miễn dịch và phương pháp giải trình tự.

Các phương pháp đều được mô tả rõ ràng, có trích dẫn tài liệu tham khảo đầy đủ, đảm bảo tính khoa học, độ tin cậy và khả năng kiểm chứng. Việc lựa chọn và áp dụng các kỹ thuật nghiên cứu là phù hợp với từng nội dung nghiên cứu cụ thể, đáp ứng yêu cầu đặt ra của luận án.

5. Đánh giá các kết quả đạt được, nêu những đóng góp mới và giá trị của các đóng góp đó.

** Đề tài luận án có các kết quả và tính mới đạt được như sau:*

- Đã dự đoán thành công các epitope trên các kháng nguyên AFP/DCP/TXN và đã lựa chọn được và đánh giá khả năng sử dụng làm kháng nguyên.
- Đã tạo thành công kháng thể đơn dòng từ kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN với độ nhạy là 97.87%.
- 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 giá kháng thể về độ nhạy, độ đặc hiệu khi kết hợp 3 chỉ thị này với nhau.

** Các đóng góp mới của đề tài luận án:*

- Đã tạo thành công bộ ba kháng thể đơn dòng từ kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN phục vụ cho chuẩn đoán HCC.
- 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 giá kháng thể về độ nhạy, độ đặc hiệu khi kết hợp 3 chỉ thị này với nhau.

6. Các kết luận của luận án có phù hợp với cách đặt vấn đề ở đầu luận án và có đủ sức thuyết phục hay không? Những ưu điểm và thiếu sót, những điểm cần được bổ sung và sửa chữa?

Các kết luận của luận án phù hợp với cách đặt vấn đề và mục tiêu nghiên cứu ban đầu, có cơ sở khoa học rõ ràng và đủ sức thuyết phục. Thiết kế thí nghiệm được xây dựng tương đối hợp lý, số lượng mẫu nghiên cứu phù hợp với điều kiện thực hiện đề tài. Các thí nghiệm được triển khai đúng hướng, phục vụ trực tiếp cho các mục tiêu nghiên cứu đã đề ra.

Kết quả nghiên cứu phong phú, được trình bày rõ ràng, minh họa bằng các bảng biểu và hình ảnh phù hợp, có trích dẫn đầy đủ. Nghiên cứu sinh đã công bố 04 công trình khoa học trong nước và quốc tế có uy tín, phản ánh đầy đủ các nội dung và kết quả chính của luận án.

7. Nhận xét về chất lượng những bài báo khoa học đã được nghiên cứu sinh công bố.

Nghiên cứu sinh là tác giả chính và đồng tác giả của 04 công trình khoa học liên quan trực tiếp đến nội dung luận án. Trong đó có 02 bài báo đăng trên Tạp chí Y học Việt Nam, 01 bài đăng trên Journal of Asian Scientific Research (thuộc hệ thống Scopus) và 01 bài đăng trên tạp chí Edelweiss Applied Science and Technology. Các công trình này có chất lượng tốt, nội dung phù hợp và phản ánh trung thực các kết quả nghiên cứu của luận án.

8. Tính trung thực trong việc trích dẫn các công trình đã được nghiên cứu sinh công bố trong và ngoài nước, tài liệu tham khảo.

Luận án sử dụng tổng cộng 158 tài liệu tham khảo, được trích dẫn đầy đủ, rõ ràng và đúng quy định. Nhiều tài liệu tham khảo được cập nhật trong giai đoạn 2023-2025, cho thấy nghiên cứu sinh đã tiếp cận và sử dụng các nguồn tài liệu mới, đảm bảo tính thời sự và độ tin cậy của luận án.

9. Kết luận

a. Luận án có đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án Tiến sĩ để được bảo vệ tại Hội đồng cấp Học viện, đề nghị Học viện tổ chức hội đồng để đánh giá luận án cấp Học viện cho Nghiên cứu sinh.

b. Hoàn toàn đồng ý cho Nghiên cứu sinh được phép bảo vệ luận án cấp Học viện.

c. Nghiên cứu sinh cần phải chỉnh sửa luận án theo như góp ý các thành viên hội đồng và Quyết nghị của hội đồng trước khi in lưu trữ thư viện Quốc gia.

Hà Nội, ngày 10 tháng 12 năm 2025

Người nhận xét



Nguyễn Thị Thanh Ngân

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Hoàng Thị Mỹ Nhung

Học hàm, học vị: PGS. TS

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Họ và tên nghiên cứu sinh: Hồ Trường Giang

Tên đề tài 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**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:
 - Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là loại ung thư phổ biến nhất và gây tử vong hàng đầu tại Việt Nam. Tỷ lệ mắc mới và tử vong rất cao do phần lớn bệnh nhân được phát hiện ở giai đoạn muộn. Việc chẩn đoán hiện nay chủ yếu dựa vào dấu ấn sinh học AFP (Alpha-fetoprotein). Tuy nhiên, AFP có độ nhạy và độ đặc hiệu chưa tối ưu (khoảng 30-40% bệnh nhân HCC có AFP bình thường). Việc bổ sung DCP (Des-gamma-carboxy prothrombin) và TXN (Thioredoxin) là rất cần thiết để tạo thành một bộ "panel" chỉ thị, giúp tăng độ chính xác trong chẩn đoán. Bên cạnh đó, hầu hết các bộ kit xét nghiệm miễn dịch (ELISA, Rapid test) tại Việt Nam đều phải nhập khẩu với giá thành cao. Việc nghiên cứu tạo kháng thể từ chính mẫu sinh học người Việt giúp chủ động nguồn nguyên liệu, giảm giá thành xét nghiệm cho người dân. Đồng thời, đề tài thành công sẽ là minh chứng cho khả năng làm chủ các kỹ thuật phức tạp như: công nghệ lai (hybridoma) hoặc công nghệ hiển thị trên thực khuẩn thể (phage display), kỹ thuật tinh sạch protein và kiểm tra ái lực kháng nguyên - kháng thể.
2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.
 - Luận án không trùng lặp với các luận văn, luận án hoặc các công trình khoa học khác đã công bố. Việc trích dẫn tài liệu tham khảo của luận đảm bảo tính trung thực, đầy đủ, rõ ràng. Tài liệu bám sát nội dung nghiên cứu.
3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành.
 - Nội dung luận án phù hợp với tên đề tài và phù hợp với ngành đào tạo Công nghệ sinh học mã số 9420201
4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.
 - Các phương pháp sử dụng trong luận án là những phương pháp nghiên cứu cơ bản, thường quy, được trình bày rõ ràng, đảm bảo độ tin cậy. Một số phương pháp nghiên cứu hiện đại, cập nhật.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

- Đã xây dựng được 01 quy trình để tạo thành công ba kháng thể đơn dòng từ các kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học AFP, DCP, và TXXN liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan và bước đầu chứng minh được hoạt tính sinh học của các kháng thể này trong việc chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan. Lưu ý, quy trình này tuy không mới về mặt kỹ thuật trên thế giới, nhưng lại rất hữu ích trong nước để thúc đẩy triển khai việc sản xuất kháng thể đơn dòng – vốn là một điểm còn hạn chế ở nước ta, đồng thời chứng minh khả năng làm chủ quy trình công nghệ để tạo các sinh phẩm chẩn đoán ung thư.
- Đã đề xuất và thử nghiệm việc sử dụng cộng gộp bộ ba kháng thể (theo từng cặp) để tăng độ nhạy và độ đặc hiệu trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan. Các số liệu tuy còn khiêm tốn về cỡ mẫu nhưng rất đáng khích lệ để tiếp tục phát triển theo định hướng này.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Tổng quan

- Cần bổ sung/cập nhật tình hình nghiên cứu trong nước về tính hình sử dụng các chỉ thị sinh học trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan, và về công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng. Việc sản xuất kháng thể đơn dòng đã được nghiên cứu triển khai ở nước ta từ hơn 10 năm, nhưng chưa đạt được những thành tựu rõ rệt. Cần phân tích nguyên nhân để từ đó xác định được hướng giải quyết, đảm bảo tính khả thi và thực tiễn của đề tài. Đồng thời, làm rõ tính cạnh tranh của sản phẩm nghiên cứu so với các sản phẩm thương mại khác trong việc sử dụng các chỉ thị sinh học trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan.

Phương pháp

- Nghiên cứu này liên quan đến cả mẫu máu/huyết thanh người và triển khai trên chuột thí nghiệm. Hiện luận án đã cung cấp chấp thuận của Hội đồng đạo đức số 06-2020/NCHG-HĐĐĐ ngày 12 tháng 10 năm 2020. Cần làm rõ HĐ này có cả chức năng xem xét các nghiên cứu triển khai trên mẫu sinh học của người hay không? Nếu không thì cần bổ sung cả sự chấp thuận của HĐ Y đức.
- Trang 46, Bước 2: đang dùng môi trường DMEM sao lại đổi sang RPMI để phân tán tế bào?

Kết quả

- Các chú thích chữ M trong các hình điện di (3.1, 3.2, 3.4, 3.5) tại sao lại chú giải các chữ M2, M3... mà trên hình chỉ có chữ M?

Kết luận

- Kết luận của tác giả đã bám theo đúng 03 mục tiêu đề ra. Tuy nhiên cần phải trình bày lại kết luận một cách ngắn gọn và **cụ thể về các số liệu** đã thu nhận được.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu Hội nghị Khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố (*cấp công bố WoS (SSCI, SCI/E, ESCI ...), Scopus, quốc tế có phản biện, tạp chí trong nước được tính điểm theo Hội đồng Giáo sư nhà nước ... và xếp hạng SCIMAGO*).

- NCS có công bố 02 bài báo trên Tạp chí trong nước, trong đó có 1 bài là tác giả chính (first-author) trên Tạp chí Y học Việt Nam và đồng tác giả trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên. NCS công bố 02 bài báo trên Tạp chí nước ngoài, trong đó có Tạp chí Edelweiss Applied Science and Technology thuộc danh mục Scopus (Q3/Q4). Cả 2 Tạp chí quốc tế đều thuộc lĩnh vực đa ngành/liên ngành (multidisciplinary/interdisciplinary).

- Bài báo quốc tế trên Tạp chí Journal of Asian Scientific Research không liên quan trực tiếp đến nội dung của luận án mà liên quan gián tiếp đến nguyên liệu cung cấp cho nghiên cứu là kháng nguyên tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng. Có thể cần nhắc giữ lại công bố này theo khía cạnh ứng dụng các kết quả nghiên cứu của luận án, qua đó minh chứng về sự thành công của đề tài nghiên cứu của luận án.

- Hai bài báo trong nước nội dung khá tương đồng, chỉ khác nhau về loại kháng thể nghiên cứu. Nội dung hai bài nên gộp lại sẽ thành một bài có chất lượng tốt hơn.

Nói chung, các Tạp chí tương đối phù hợp với ngành đào tạo. Các bài báo đã bao hàm các nội dung cũng như các kết quả nghiên cứu chính trong luận án. Tuy nhiên, chất lượng các bài báo còn khá khiêm tốn.

8. Kết luận chung:

- Luận án đã các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ ngành.
- Bản tóm tắt luận án có phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.
- Luận án **có thể được** đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

Hà Nội, ngày 20 tháng 12 năm 2025

Người viết nhận xét
(Ký và ghi rõ họ và tên)



PGS. TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên: Vũ Xuân Nghĩa

Học hàm, học vị: PGS.TS

Cơ quan công tác: Bệnh viện TWQĐ108

Họ và tên nghiên cứu sinh: Hồ Trường Giang

Tên 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.

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Nội dung của luận án tập trung vào kỹ thuật công nghệ sinh học tạo công cụ phát hiện sớm các dấu ấn ung thư biểu mô gan. Đây là hướng đi chung hiện nay trong sàng lọc, chẩn đoán sớm bệnh lý ung thư trong lâm sàng. Mặc dù hiện nay trong sàng lọc, chẩn đoán có sử dụng nhiều dấu ấn sinh học cho ung thư biểu mô tế bào gan, song với kháng thể đơn dòng (AFP, DCP, TXN) đây là bước đi thực sự cần thiết và mang tính thời sự, thực tiễn cao của luận án, nó sớm mở ra định hướng sản xuất các công cụ mới cho bệnh lý này, đặc biệt thực sự có ý nghĩa khoa học trong chuyên ngành y sinh.

2. Sự không trùng lặp với các công trình đã công bố, tính trung thực, rõ ràng đầy đủ trích dẫn tài liệu

Luận án đi theo hướng nghiên cứu hiện đại, tập trung tạo 03 kháng nguyên trong HCC và tạo kháng thể phát hiện chúng, do vậy, nội dung không trùng lặp với các công trình đã công bố trước đây. Tài liệu tham khảo được trích dẫn đầy đủ, trung thực với các nội dung phù hợp trong nghiên cứu. Tổng tài liệu tham khảo có 158 tài liệu, trong đó 155 tiếng anh và 3 tiếng Việt. Các tài liệu tham khảo được trình bày theo đúng qui định của luận án.

di căn không? Bổ sung thêm thiết bị trong giải trình tự gen, tinh sạch protein... Tiêu chuẩn chẩn đoán HCC tại bệnh viện TWQĐ108.

- Phần kết luận: cả 3 mục tiêu cần viết gọn lại, trong kết luận cần đưa ra kết quả cụ thể đạt được mục tiêu nghiên cứu.

7. Nội dung của luận án đã công bố trên tạp chí nào..

Nội dung của luận án được công bố trên 4 tạp chí, trong đó có 2 bài đăng trên tạp chí chuyên ngành trong nước và 2 bài đăng trên tạp chí nước ngoài.

8. Kết luận

Nội dung nghiên cứu của nghiên cứu sinh đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt của luận án phản ánh đầy đủ nội dung cơ bản của luận án. Luận án sau khi được bổ sung, sửa chữa có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện.

Hà nội, ngày 17 tháng 12 năm 2025

Người viết nhận xét



Vũ Xuân Nghĩa

Hà Nội, ngày 27 tháng 01 năm 2026

BIÊN BẢN HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Nghiên cứu sinh: **Hồ Trường Giang**

Đề tài: “*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*”

Chuyên ngành: **Công nghệ sinh học** Mã số: **94 20 201**

Người hướng dẫn:

GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

Quyết định thành lập Hội đồng số: 1266/QĐ-HVKHCN ngày 20/11/2025 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ.

Thời gian họp: 9 h sáng ngày 27 tháng 01 năm 2026

Địa điểm: Hội trường tầng 17, Học viện Khoa học và Công nghệ, số 18 đường Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

NỘI DUNG

1. Từ 9:00 giờ đến 9 giờ 10 phút:

- Đại diện cơ sở đào tạo tuyên bố lý do, đọc Quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Học viện. Đề nghị Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp.
- Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi họp:
 - + Tuyên bố số thành viên Hội đồng có mặt: 06/06 (có danh sách kèm theo).
 - + Số khách mời tham dự buổi bảo vệ: 03 người.
 - + Thư ký hội đồng đọc lý lịch khoa học và kết quả học tập của nghiên cứu sinh.

2. Từ 9 giờ 10 phút đến 9 giờ 45 phút :

- Nghiên cứu sinh Hồ Trường Giang trình bày nội dung luận án.

3. Từ 9 giờ 45 phút đến 10 giờ 45 phút:

- Phản biện 1: Đọc nhận xét luận án (kèm theo toàn văn nhận xét).
- Phản biện 2: Đọc nhận xét luận án (kèm theo toàn văn nhận xét).
- Phản biện 3: Đọc nhận xét luận án (kèm theo toàn văn nhận xét).

Các câu hỏi của thành viên Hội đồng và câu trả lời của nghiên cứu sinh: (ghi rõ họ tên, học vị, chức danh khoa học của người hỏi)

Phản biện 1: GS.TS. Trần Huy Thịnh

Câu hỏi 1: Cần làm gì tiếp theo để phát triển các chỉ thị sinh học sàng lọc này? Đánh giá tiềm năng của các chỉ thị này đặc biệt là chỉ thị TXN? so với các chỉ thị thương mại?

NCS trả lời:



Luận án đã hoàn thành giai đoạn tạo công cụ sinh học (mAb đặc hiệu AFP/DCP/TXN). Bước tiếp theo là chuẩn hóa, định lượng, đánh giá lâm sàng theo hướng sàng lọc và phát triển mô hình đa chỉ thị, trong đó TXN là ứng viên có tiềm năng tạo giá trị gia tăng khi kết hợp với AFP/DCP.

So với các chỉ thị thương mại nhập khẩu, việc phát triển kháng thể đơn dòng kháng AFP/DCP/TXN trong nước mang lại đó là: Chủ động nguồn kháng thể, giảm phụ thuộc nhập khẩu. Giảm giá thành, phù hợp triển khai ở các tuyến y tế cơ sở. Dễ dàng tùy biến assay (ELISA, test nhanh, IHC) theo nhu cầu lâm sàng tại Việt Nam.

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Lai Thành

Câu hỏi 1: Cơ sở nào để sử dụng chuột tạo u báng sinh kháng thể trong nghiên cứu? Khi thu dịch từ chuột NCS căn cứ điều gì để khẳng định là kháng thể đơn dòng được nuôi cấy thành công?

NCS trả lời:

Lý do lựa chọn phương pháp tạo u báng trên chuột: là quy trình cổ điển, hiệu quả cao,

tạo u báng tạo ra nồng độ kháng thể cao gấp nhiều lần (10–50 mg/ml dịch báng), đặc biệt phù hợp cho nghiên cứu ở giai đoạn đầu, khi cần lượng kháng thể đủ để tinh sạch, đặc tính hóa và đánh giá khả năng miễn dịch đặc hiệu.

NCS khẳng định kháng thể đơn dòng được tạo và nuôi cấy thành công khi thu dịch u báng là sử dụng các phương pháp tinh sạch bằng cột protein A/G, điện di SDS-PAGE, Western-blotting và ELISA. Ngoài ra, còn sử dụng sàng lọc bằng môi trường HAT để loại bỏ tế bào không dung hợp; Nhân dòng đơn (cloning bằng pha loãng giới hạn) nhằm đảm bảo mỗi dòng hybridoma bắt nguồn từ một tế bào đơn lẻ. Do đó, kháng thể thu được từ dịch u báng có nguồn gốc đơn dòng về mặt tế bào học.

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Trung Nam

Câu hỏi 1: Hình cut-off của 3 chỉ thị tại sao lại khác với hình trong công bố quốc tế? NCS giải thích lý do vì sao cùng một kết quả lại có 2 hình ảnh minh chứng?

NCS trả lời:

Bài báo này đã được NCS loại bỏ khỏi Danh mục các công trình của tác giả vì không liên quan đến nội dung Luận án vì thế các kết quả hình cut-off là nhất quán trong toàn văn luận án.

Ủy viên: PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung

Câu hỏi 1: Hội đồng y đức NCS cung cấp trong luận án có đủ để bao trùm toàn bộ nghiên cứu trên động vật của đề tài không?

Những khó khăn và trở ngại khi NCS thực hiện nghiên cứu đề tài?

NCS trả lời:

Nội dung nghiên cứu của luận án có liên quan đến cả mẫu huyết thanh người và thực nghiệm trên động vật (chuột BALB/c). Luận án sử dụng một phần số liệu từ Nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ theo Nghị định thư “Hợp tác nghiên cứu chế tạo bộ kit kháng thể đơn dòng nano DNA huỳnh quang đặc hiệu phục vụ chẩn đoán sớm ung thư gan”, mã số: NĐT.102.GER/21. NVKH này đã thực hiện đầy đủ quy trình xin phép và đã được Hội đồng Y đức – Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam phê duyệt theo Giấy chứng nhận số 06-2020/NCHG-HĐDD cấp ngày 12/10/2020 (đính kèm tại Phụ lục 3 của luận án). Hội đồng Y đức – Viện Nghiên cứu hệ gen có đầy đủ chức năng xem xét các nghiên cứu được triển khai trên người và động vật.

Khó khăn và trở ngại khi NCS thực hiện Luận án là trong quá trình lấy mẫu và làm thí nghiệm bị gián đoạn bởi dịch Covid.

Ủy viên: TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân



Câu hỏi 1: Nhược điểm của nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng bằng mô hình chuột hiện nay? Ncs đã có những khắc phục gì cho nghiên cứu của mình?

NCS trả lời:

Nhược điểm của nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng bằng mô hình chuột hiện nay
Nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng (mAb) bằng mô hình chuột – đặc biệt theo phương pháp lai tế bào hybridoma – tuy vẫn là “tiêu chuẩn vàng”, nhưng tồn tại một số hạn chế cơ bản:

- Những khác biệt về mặt sinh học giữa chuột và người
- Đáp ứng miễn dịch không đồng đều giữa các cá thể chuột
- Thời gian và chi phí cao
- Hạn chế về đạo đức trong sử dụng động vật thí nghiệm
- Nguy cơ tạo kháng thể nhận diện epitope không đặc hiệu.

Những khắc phục mà NCS đã thực hiện trong nghiên cứu của mình:

- Thiết kế kháng nguyên có định hướng epitope
- Sàng lọc kháng thể đa tầng, không chỉ dựa trên hiệu giá
- Sử dụng mẫu bệnh phẩm người để đánh giá giá trị thực tiễn
- Tuân thủ nghiêm ngặt đạo đức trong nghiên cứu động vật
- Định hướng ứng dụng chẩn đoán, không dừng ở mức tạo mAb

4. Từ 10 giờ 45 phút đến 11 giờ 10 phút: Họp hội đồng riêng

- Thông qua kết luận của Hội đồng (có văn bản kèm theo).
- Ghi phiếu nhận xét luận án.

Kết quả kiểm phiếu 07/07 thành viên tán thành trong đó 03/07 phiếu xuất sắc và đề nghị Học viện ra quyết định công nhận học vị Tiến sĩ Sinh học ứng dụng cho nghiên cứu sinh Hồ Trường Giang.

5. Từ 11 giờ 10 phút đến 11 giờ 30 phút:

- Chủ tịch Hội đồng đọc kết luận của hội đồng đánh giá luận án trong nghị quyết của Hội đồng.
- Đại diện cơ sở đào tạo phát biểu ý kiến, chúc mừng NCS Hồ Trường Giang.
- Đại diện của cơ quan của NCS phát biểu ý kiến.
- Đại diện cho tập thể hướng dẫn của NCS phát biểu ý kiến.
- NCS Hồ Trường Giang phát biểu ý kiến.
- Hội đồng kết thúc lúc 11 giờ 30 phút, Thứ Ba ngày 27 tháng 01 năm 2026.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân

GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

Hà Nội, ngày 27 tháng 01 năm 2026

**NGHỊ QUYẾT
CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Tên nghiên cứu sinh: **Hồ Trường Giang**

Về đề tài: **“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”**

Chuyên ngành: **Công nghệ sinh học** Mã số: **94 20 201**

Người hướng dẫn:

GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

Số thành viên Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện có mặt: 06/06 (vắng ủy viên PGS.TS. Vũ Xuân Nghĩa).

Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện của NCS. Hồ Trường Giang đã họp từ 9:00 giờ đến 11 giờ 30 phút sáng ngày 27/01/2026 tại Học viện Khoa học và Công nghệ, số 18 đường Hoàng Quốc Việt – Cầu Giấy – Hà Nội.

Sau khi nghe nghiên cứu sinh Hồ Trường Giang trình bày nội dung luận án trong thời gian 30 phút, Hội đồng đã nghe các phản biện phát biểu nhận xét luận án; nghe thư ký Hội đồng đọc bản tổng hợp các ý kiến nhận xét luận án của các thành viên khác trong Hội đồng và nhận xét tóm tắt luận án của các nhà khoa học gửi đến. Hội đồng đã tiến hành thảo luận chung tại Hội trường, sau đó Hội đồng đã họp riêng và nhất trí quyết nghị như sau:

1. Kết quả bỏ phiếu đánh giá luận án của Hội đồng: Hội đồng thống nhất thông qua bỏ phiếu đánh giá luận án đạt kết quả 06/06 phiếu tán thành trong đó có 03/06 phiếu xuất sắc.

2. Những kết luận khoa học cơ bản, những điểm mới, đóng góp mới của luận án

Hội đồng đã thống nhất thông qua các kết luận của luận án như sau:

- Đã tạo được thành công các peptide đặc trưng cho ba gen *AFP*, *DCP* và *TXN*.
- Đã tạo thành công kháng thể đơn dòng từ kháng nguyên tái tổ hợp của ba chỉ thị sinh học *AFP*, *DCP* và *TXN* với độ nhạy là 97.87%.
- 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 giá kháng thể về độ nhạy, độ đặc hiệu khi kết hợp 3 chỉ thị này với nhau.

*** Đề tài luận án có tính mới như sau:**

- Đã tạo được kháng thể đơn dòng IgG đặc hiệu tương ứng với hiệu giá cao và đạt độ tinh khiết khi tinh sạch bằng sắc ký protein A/G cho ba chỉ thị sinh học *AFP*, *DCP* và *TXN*.
- 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 giá kháng thể về độ nhạy, độ đặc hiệu khi kết hợp 3 chỉ thị này với nhau.



3. Các góp ý chỉnh sửa luận án

Quyển luận án còn một số hình ảnh minh họa kết quả bị mờ, lỗi chính tả, phong chữ, biểu mẫu và chú thích cần chỉnh sửa lại cho thống nhất toàn văn luận án. Rà soát lại các từ chuyên ngành cho chính xác theo góp ý của các thành viên hội đồng.

3.1. Mở đầu: nên viết ngắn gọn lại, tập trung vào HCC và tính thực tiễn, cấp thiết khi tạo công cụ sàng lọc và chẩn đoán.

3.2. Tổng quan:

Nên bổ sung bệnh học HCC, tiêu chuẩn chẩn đoán HCC và chẩn đoán các giai đoạn của HCC. Nên bổ sung thêm thông tin về kỹ thuật tạo u bàng sinh kháng thể. Bổ sung tình hình trong nước sử dụng các chỉ thị sinh học trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan và về công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng.

3.3. Phương pháp:

- Đối tượng nghiên cứu là 47 mẫu cần giải thích hoặc bổ sung thông tin đầy đủ về việc 47 người tham gia nghiên cứu này có được điều trị thuốc không và thông tin về tiến triển bệnh như chưa di căn không? Bổ sung thiết bị giải trình tự gen, tinh sạch protein. Tiêu chuẩn chẩn đoán HCC tại bệnh viện TWQĐ108.

- Bổ sung chi tiết cho phần tế bào để có căn cứ đánh giá các kết quả đạt được.

- Bổ sung nguồn gốc của kháng nguyên *E.coli*.

3.4. Kết quả và Bàn luận:

- Nên viết ngắn gọn lại tập trung vào các kết quả mục tiêu.

- Hình ảnh của tế bào cần giữ đúng độ phóng đại trong các ảnh minh họa và cần giải thích chi tiết hoặc chú thích cho mỗi hình minh họa.

- Bổ sung bàn luận, giải thích việc sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp để đánh giá kháng thể mà không có giai đoạn thử nghiệm trên kháng nguyên tự nhiên, gần với đặc điểm của kháng nguyên đang có trên tế bào sống.

3.5. Tài liệu tham khảo: chỉnh sửa theo form mẫu của Học viện.

3.6. Tóm tắt luận án: chỉnh sửa lại tóm tắt theo toàn văn luận án sau góp ý của Hội đồng cấp Học viện.

3.7. Kết luận của luận án:

Nên bổ sung thêm các chi tiết các số liệu của từng kết quả cho rõ ràng hơn.

4. Cơ sở khoa học, độ tin cậy của những luận điểm và những kết luận nêu ra trong luận án.

Luận án được thực hiện trên tập mẫu gồm 47 mẫu bệnh và 15 mẫu đối chứng đã được lựa chọn và thu thập theo các tiêu chuẩn nghiên cứu cụ thể, phù hợp với mục tiêu của đề tài. Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng đa dạng, kết hợp giữa công cụ tin sinh học (như BepiPred, DiscoTope) với các kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản và hiện đại, bao gồm công nghệ tái tổ hợp gen, các kỹ thuật miễn dịch và phương pháp giải trình tự.

Các phương pháp đều được mô tả rõ ràng, có trích dẫn tài liệu tham khảo đầy đủ, đảm bảo tính khoa học, độ tin cậy và khả năng kiểm chứng. Việc lựa chọn và áp

dụng các kỹ thuật nghiên cứu là phù hợp với từng nội dung nghiên cứu cụ thể, đáp ứng yêu cầu đặt ra của luận án.

5. Ý nghĩa về lý luận, thực tiễn và những đề nghị sử dụng các kết quả nghiên cứu của luận án

Luận án tập trung nghiên cứu tạo ra ba kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các chỉ thị sinh học AFP, DCP và TXN để ứng dụng trong phát hiện sớm ung thư biểu mô tế bào gan. Đây là hướng nghiên cứu có giá trị khoa học rõ ràng, phù hợp với xu thế nghiên cứu hiện nay và có ý nghĩa thực tiễn cao trong chẩn đoán HCC. Các nội dung nghiên cứu được triển khai logic, bám sát mục tiêu đặt ra, kết quả đạt được phù hợp với định hướng ban đầu. Các công trình khoa học được công bố từ luận án là mới, không trùng lặp, đăng tải trên các tạp chí khoa học trong nước và quốc tế có uy tín, góp phần bổ sung nguồn tư liệu tham khảo có giá trị cho các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực này.

6. Những thiếu sót về nội dung và hình thức của luận án

NCS cần chỉnh sửa một số vấn đề còn thiếu sót theo 07 Bản nhận xét của các thành viên trong Hội đồng gửi kèm theo và những thống nhất ghi chi tiết trong bản Nghị Quyết của hội đồng.

7. Mức độ đáp ứng các yêu cầu của luận án

Bản luận án TS của NCS Hồ Trường Giang là một công trình nghiên cứu công phu nghiêm túc, có ý nghĩa khoa học và giá trị thực tiễn, đáp ứng được yêu cầu của luận án tiến sĩ về cả nội dung và hình thức theo quy định.

8. Những điểm cần bổ sung, sửa chữa (nếu có) trước khi nộp luận án cho Thư viện Quốc gia Việt Nam

NCS cần chỉnh sửa lại luận án theo 07 bản nhận xét và góp ý của các thành viên Hội đồng gửi kèm theo (Bản nhận xét luận án) và chi tiết mục 2 và mục 3 trong bản Nghị Quyết này.

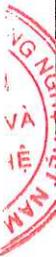
9. Công trình khoa học liên quan đến luận án

Nghiên cứu sinh có 4 công trình khoa học. Các công trình khoa học này đều là các nội dung và kết quả thể hiện toàn văn luận án. Trong đó có 01 bài trên Tạp chí Y học Việt Nam, 01 bài trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên, 01 (Journal of Asian Scientific Research) bài thuộc Scopus và 01 tài thuộc tạp chí Edelweiss Applied Science and Technology. Nghiên cứu sinh là tác giả đầu và đồng tác giả của 04 bài báo.

Hội đồng chỉ giữ lại 3 công bố: 02 công bố trên tạp chí quốc gia và 1 tạp chí quốc tế thuộc Scopus, loại bỏ bài thuộc quốc tế khác.

10. Kết luận:

Luận án đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ Sinh học ứng dụng chuyên ngành Công nghệ sinh học theo đúng quy định của Học viện Khoa học và Công nghệ.



Hội đồng thông qua bỏ phiếu và đề nghị cơ sở đào tạo công nhận trình độ và cấp bằng cho Hồ Trường Giang.

Hội đồng nhất trí thông qua bằng biểu quyết công khai và bỏ phiếu với tỷ lệ tán thành là 06/06 thành viên Hội đồng Căn cứ kết quả bỏ phiếu, Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện nhất trí đề nghị công nhận học vị Tiến sĩ Sinh học ứng dụng cho nghiên cứu sinh Hồ Trường Giang.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

(Mẫu 6-HV-Bản giải trình chỉnh sửa, bổ sung cấp HV)

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA, BỔ SUNG LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Ngày 27 tháng 01 năm 2026, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Hồ Trường Giang theo Quyết định số 1266/QĐ-HVKHCN ngày 26 tháng 11 năm 2025 của Giám đốc Học viện.

Đề tài: “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”.

Ngành: Công nghệ sinh học,

Mã số: 942 02 01

Người hướng dẫn Khoa học: GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh

PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy

Theo Biên bản của Hội đồng, NCS phải bổ sung và chỉnh sửa luận án các điểm sau đây:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, bổ sung	Nội dung đã được chỉnh sửa, bổ sung (Ghi rõ số trang/chương/mục... đã được chỉnh sửa)
1.	Phần Mở đầu nên viết ngắn gọn lại, tập trung vào HCC và tính thực tiễn, cấp thiết khi tạo công cụ sàng lọc và chẩn đoán.	Đã viết gọn lại phần MỞ ĐẦU , tập trung vào HCC và tính thực tiễn, cấp thiết khi tạo công cụ sàng lọc và chẩn đoán. Trang 1, 2, 3.
2.	Nên bổ sung bệnh học HCC, tiêu chuẩn chẩn đoán HCC và chẩn đoán các giai đoạn HCC.	Đã bổ sung bệnh học HCC trong mục Các yếu tố liên quan đến cơ chế bệnh sinh của HCC Trang 7, 8. Đã bổ sung tiêu chuẩn chẩn đoán và chẩn đoán giai đoạn trong mục Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu bước đầu ứng dụng các kháng thể đơn dòng tạo thành để phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan Trang 34
	Nên bổ sung thêm thông tin kỹ thuật tạo u bóng sinh kháng thể.	Đã bổ sung thông tin quy trình tạo bóng thu kháng thể đơn dòng trong mục Phương pháp tạo kháng thể đơn dòng Trang 50



	Bổ sung tình hình trong nước sử dụng các chỉ thị sinh học trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan và công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng.	Đã bổ sung thông tin trong mục <i>Một số nghiên cứu kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán ung thư trên thế giới và tại Việt Nam Trang 30</i>
3.	Đối tượng nghiên cứu là 47 mẫu, cần giải thích hoặc bổ sung thông tin đầy đủ về việc 47 người tham gia nghiên cứu này có được điều trị thuốc không, về thông tin tiến triển của bệnh như: có di căn hay không?	Đã bổ sung trong mục Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu bước đầu ứng dụng các kháng thể đơn dòng tạo thành để phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan Trang 34
	Bổ sung thiết bị giải trình tự gen, tinh sạch Protein.	Đã bổ sung “Máy giải trình tự DNA tự động ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Mỹ)” vào phần HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU , mục Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu. Trang 36 Đã bổ sung “Kit: NAb™ Protein A/G Spin Columns Kit (Thermo Fisher, Mỹ)” vào phần HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU , mục Hóa chất và sinh phẩm nghiên cứu. Trang 35
	Bổ sung tiêu chuẩn chẩn đoán HCC tại Bệnh viện TỰ QUỠ 108.	Đã bổ sung trong mục Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu bước đầu ứng dụng các kháng thể đơn dòng tạo thành để phát hiện ung thư biểu mô tế bào gan Trang 34
4.	Bổ sung chi tiết cho phần tế bào để có căn cứ đánh giá kết quả đạt được.	Đã bổ sung trong mục Tinh sạch kháng thể đơn dòng Trang 51
5.	Bổ sung nguồn gốc kháng nguyên <i>E. coli</i>	Đã bổ sung “Vi khuẩn <i>Escherichia coli</i> : chủng BL21 (DE3) (Thermo Fisher, Mỹ)” vào phần HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU , mục Hóa chất và sinh phẩm nghiên cứu. Trang 35
6.	KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN nên viết ngắn gọn lại tập trung vào các kết quả mục tiêu.	KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN được chỉnh sửa theo hướng viết ngắn gọn, tập trung làm rõ các kết quả chính phù hợp với các mục tiêu nghiên cứu. Các nội dung trùng lặp, diễn giải dài hoặc chưa trực tiếp phục vụ mục tiêu đã được lược bỏ, đồng thời phần bàn luận được cô đọng và nhấn mạnh vào các kết quả nổi bật của đề tài. Mục Đánh giá tính chất vật lý của ba đoạn protein Trang 65 , mục Giải trình tự DNA của AFP/DCP/TXN Trang 70 .

ÁO
VIỆ
IQ
NG



7.	Hình ảnh tế bào cần giữ đúng độ phóng đại trong các ảnh minh họa và cần giải thích chi tiết hoặc chú thích cho mỗi hình minh họa.	Đã chỉnh lại thông tin độ phóng đại trong Hình 3.16 ; Các hình được bổ sung minh họa và giải thích chi tiết Hình 3.27 Trang 102, Hình 3.28, Hình 3.29 Trang 103
8.	Bổ sung bản luận, giải thích việc sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp để đánh giá kháng thể mà không có giai đoạn thử nghiệm trên kháng nguyên tự nhiên, gần với đặc điểm kháng nguyên trên tế bào sống.	Đã bổ sung vào phần KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN mục Kết quả sàng lọc và tách dòng các tế bào lai có khả năng sinh kháng thể đơn dòng Trang 84
9.	Chỉnh sửa một số tài liệu tham khảo theo đúng form mẫu của Học viện.	Đã chỉnh sửa các tài liệu tham khảo theo đúng mẫu của Học viện. TLTK 12 Trang 116, TLTK 55 Trang 119, TLTK 63 Trang 120.
10.	Chỉnh sửa tóm tắt theo toàn văn luận án sau góp ý của Hội đồng cấp Học viện.	Đã chỉnh sửa Quyển Tóm tắt Luận án sau góp ý của Hội đồng cấp Học viện. phần MỞ ĐẦU Trang 1 ; phần KẾT LUẬN mục 1, 2 Trang 21, 22
11.	KẾT LUẬN nên bổ sung thêm các chi tiết các số liệu của từng kết quả cho rõ ràng hơn.	Đã bổ sung chi tiết các số liệu của từng kết quả trong phần KẾT LUẬN mục Kết quả tạo kháng nguyên tái tổ hợp AFP, DCP và TXN và Kết quả tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu từ kháng nguyên tái tổ hợp Trang 112

Nghiên cứu sinh chân thành cảm ơn Quý thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đã góp ý và tạo cơ hội cho NCS hoàn thiện luận án của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Hà Nội, ngày 09 tháng 02 năm 2026

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

Hướng dẫn chính



GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh

Hướng dẫn phụ



PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy

NGHIÊN CỨU SINH



Hồ Trường Giang

**XÁC NHẬN CỦA
HỌC VIỆN KHCN**



Nguyễn Thị Trung

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

THƯ KÝ



TS. Nguyễn Thị Thanh Ngân

