

CỐ ĐỊNH KHÁNG THỂ LÊN HẠT LATEX VÀ ỨNG DỤNG PHÂN TÍCH MIỄN DỊCH

ĐỖ BÁ QUỐC THÁI, LÊ THANH NGUYÊN, TRẦN VĂN HIẾU*

Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: tvhieu@hcmus.edu.vn

Tóm tắt. Gắn định hướng kháng thể/protein lên bề mặt hạt latex là một trong những giai đoạn chính, quyết định hiệu quả của xét nghiệm ngưng kết huyết thanh. Hiện nay, ba phương pháp chính được sử dụng bao gồm hấp thụ thụ động, gắn định hướng qua liên kết cộng hóa trị và liên kết ái lực đã có thể giúp cải thiện đáng kể chất lượng của sản phẩm. Chưa dừng lại ở đó, sự phát triển của các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại, đặc biệt là công nghệ protein tái tổ hợp, đã giúp tạo ra các loại protein ngoại lai có khả năng gắn đặc hiệu với bề mặt hạt latex. Bài tổng quan này sẽ đi qua các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hoạt hóa hạt latex cũng như ưu, nhược điểm của các phương pháp gắn định hướng kháng thể/protein lên bề mặt hạt latex đang được sử dụng rộng rãi. Qua đó, bài viết cũng giới thiệu các phương pháp gắn định hướng kháng thể mới có thể thay thế như sử dụng kháng thể dung hợp đuôi peptide gắn đặc hiệu polystyrene và sử dụng protein cầu nối.

Từ khóa. protein cầu nối, cố định protein, hấp thụ thụ động, đuôi peptide ái lực polystyrene, hạt polystyrene latex.

ANTIBODY IMMOBILIZATION TECHNIQUE ONTO LATEX BEADS AND ITS IMMUNOASSAY APPLICATIONS

Abstract. Orientation of antibody/protein onto the latex surface is one of the most important steps, which determines the effectiveness of agglutination test. Currently, three well-known methods are used, including passive absorption, covalent coupling, and affinity immobilization. Besides, improvements in the field of molecular biology, especially the recombination protein technology, help to create a lot of novel proteins which have ability to affinity bind to the material surface. In this review, parameters effecting the latex activation process were summarized. Advantages and disadvantages of each common method were also indicated. In addition, this review also introduced some new methods that could supplant the old ones, including polystyrene-binding peptide conjugated antibody, and adapter protein.

Keywords. adapter protein, protein immobilization, passive absorption, polystyrene binding peptide, polystyrene latex bead.

1. GIỚI THIỆU

Singer và Plotz (1956) lần đầu tiên phát triển phương pháp xét nghiệm ngưng kết huyết thanh gián tiếp thông qua sự kết tụ của hạt latex (hay latex agglutination test - LAT) [1]. Kể từ khi công trình được xuất bản, các ứng dụng của hạt latex trong xét nghiệm miễn dịch được nghiên cứu và phát triển một cách nhanh chóng, rộng rãi. LAT được sử dụng trong chẩn đoán bệnh thấp khớp thông qua việc định tính và bán định lượng các yếu tố thấp khớp (Rheumatoid factor - RF) với độ nhạy và độ đặc hiệu cao [2]. Vào năm 2001, Zamil J. Attar và cộng sự đã phát triển LAT có khả năng phát hiện ký sinh trùng *Leishmania* gây nhiễm trùng ở người với độ đặc hiệu 100% và độ nhạy từ 68-100% [3]. *Brucella* gây bệnh sốt lùn sóng cũng có thể được phát hiện bằng LAT; bên cạnh đó, nghiên cứu cũng cho thấy LAT có khả năng phân biệt *Brucella* với các bệnh có triệu chứng lâm sàng tương tự (lao, sốt thương hàn, viêm khớp dạng thấp, ung thư hạch bạch huyết) [4]. Khi so với các phương pháp như ELISA và PCR, LAT có thể cho độ đặc hiệu tương đương nhưng không tối ưu về độ nhạy do ảnh hưởng của sự định hướng kháng thể trên bề mặt hạt. Hiện nay, nhiều nhóm nghiên cứu, phòng thí nghiệm đã và đang nghiên cứu, phát triển các phương pháp để tối ưu khả năng định hướng kháng thể/protein lên hạt latex trong khi vẫn giữ được tối đa các hoạt tính sinh học của chúng [5].

Xét nghiệm ngưng kết hạt latex để phát hiện kháng nguyên sử dụng các hạt latex có cùng kích thước; các hạt này được phủ bằng các kháng thể, quá trình như vậy được gọi là quá trình hoạt hóa hạt latex. Các hạt latex đã được hoạt hóa có khả năng nhận biết mẫu chứa kháng nguyên đặc hiệu, từ đó gây ra sự kết tụ hạt latex thông qua liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể [6]. Hạt latex có thể được hoạt hóa bằng cách gắn kết các kháng thể lên bề mặt hạt thông qua hấp thụ thụ động (hay hấp thụ vật lý). Tuy nhiên, với phương pháp này, các kháng thể được định hướng một cách ngẫu nhiên lên trên latex và bị phụ thuộc vào nhiều yếu tố như pH, nồng độ muối, loại dung môi. Khi định hướng một cách ngẫu nhiên lên trên hạt latex, khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể bị suy giảm do hạn chế số lượng kháng thể được hấp phụ lên hạt. Bên cạnh đó, các kháng thể định hướng ngẫu nhiên với mật độ cao làm chông chéo, che phủ các vùng liên kết kháng nguyên (Fab) khiến cho LAT bị âm tính giả.

Trong những năm gần đây, với sự phát triển của các kỹ thuật sinh học, đặc biệt là công nghệ protein tái tổ hợp, nhiều protein/kháng thể tái tổ hợp không ngừng ra đời, qua đó, góp phần giải quyết các vấn đề còn tồn đọng trong kỹ thuật xét nghiệm LAT. Bài tổng quan này sẽ đi qua các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hoạt hóa hạt latex cũng như phân tích các ưu, nhược điểm của các phương pháp hiện có để xem xét chúng có cho phép ta thu được hạt latex được hoạt hóa, ứng dụng trong các thử nghiệm miễn dịch với hiệu quả, và độ chính xác cao hay không? Đồng thời, bài viết cũng giới thiệu các phương pháp gắn định hướng kháng thể mới, đó là sử dụng kháng thể dung hợp đuôi peptide gắn đặc hiệu polystyrene và sử dụng protein cầu nối, hai phương pháp được xem như giải pháp cho các vấn đề còn tồn đọng trong việc hoạt hóa hạt latex.

2. CÁC CHIẾN LƯỢC TỔNG HỢP HẠT LATEX

Hạt latex là các khối polystyrene hình cầu có đường kính từ 0.02 μm đến 20 μm [7]. Chúng có thể được tổng hợp hóa học bằng nhiều phương pháp khác nhau, tùy thuộc vào điều kiện sản xuất cũng như các yêu cầu về đặc tính, kích thước của hạt.

- Trùng hợp huyền phù: các monomer tồn tại trong pha lỏng và được khuấy trộn đều; khi có mặt chất khơi mào thì phản ứng trùng hợp xảy ra. Chất khơi mào được sử dụng trong phương pháp này tan trong monomer, nhưng monomer và cả chất khơi mào không tan trong môi trường phân tán. Dung dịch huyền phù thường được sử dụng là nước do có khả năng luân chuyển nhiệt tốt; vì vậy, có thể dễ dàng kiểm soát nhiệt độ trong quá trình tổng hợp [8]. Phản ứng polymer hóa xảy ra trong dung dịch huyền phù. Bên cạnh đó, phương pháp này cho phép sử dụng tối thiểu lượng chất hoạt động bề mặt, chất ổn định và dễ dàng kiểm soát đường kính sản phẩm thông qua việc điều chỉnh tốc độ khuấy của máy [9]. Sản phẩm thu được là các hạt polymer lơ lửng trong môi trường.

- Trùng hợp nhũ tương: các thành phần chính được sử dụng trong phương pháp này là monomer, chất khơi mào, dung dịch huyền phù (thường là nước) và chất hoạt động bề mặt. Không như trùng hợp huyền phù, chất khơi mào được sử dụng trong phương pháp trùng hợp nhũ tương tan trong dung dịch (nước) nhưng không tan trong monomer [10]. Khi được thêm vào môi trường phân tán, các chất hoạt động bề mặt có đuôi kỵ nước và đầu ưa nước sẽ tự kết tụ tạo các giọt micelle, chúng tạo nên lớp vỏ bao bọc các monomer. Sau đó, chất khơi mào được thêm vào và phản ứng polymer hóa xảy ra. Hay nói cách khác, phản ứng polymer hóa được diễn ra trong các hạt micelle [11]. Phương pháp này cho phép kiểm soát kích thước sản phẩm thông qua việc thay đổi nồng độ chất hoạt động bề mặt, qua đó làm thay đổi kích thước các giọt micelle và số lượng phân tử monomer bị bắt giữ [12]. Sản phẩm thu được là các hạt polymer phân tách khỏi môi trường và dễ dàng tinh sạch.

- Trùng hợp phân tán: các thành phần sử dụng trong phương pháp tổng hợp này bao gồm monomer, chất khơi mào, chất ổn định và chúng được hòa tan trong dung môi. Dung môi được sử dụng là dung môi hữu cơ, có khả năng hòa tan monomer nhưng không thể hòa tan polymer, vì vậy, sau khi kết thúc quá trình tổng hợp, các hạt polymer tạo thành một lớp phân tách khỏi dung dịch ban đầu [13]. Số lượng hạt polymer được quyết định trong quá trình khởi động - khi chất khơi mào phản ứng với các phân tử monomer tạo nên các phôi hạt polymer.

Ngoài ra, nhiều phương pháp khác được tạo ra từ các phương pháp trên, với mục đích tăng độ tinh sạch cũng như mức độ kiểm soát sản phẩm đầu ra.

Các nhóm chức trên bề mặt hạt latex giúp chúng có tính ứng dụng cao trong lĩnh vực xét nghiệm cũng như nghiên cứu. Trong quá trình tổng hợp, các chất khơi mào, chất ổn định hay chất hoạt động bề mặt tham gia phản ứng polymer hóa, và tạo nên các nhóm chức trên bề mặt hạt. Bên cạnh đó, hạt latex cũng có thể được

biến đổi sau tổng hợp để mang các nhóm chức bề mặt phù hợp, phục vụ cho ứng dụng mong muốn [14] (Bảng 1).

Bảng 1. Các chiến lược được sử dụng để tạo hạt latex có nhóm chức bề mặt [14]

Nguồn gốc	Loại chất	Nhóm chức bề mặt
Chất khơi mào	Muối persulfate	-OSO ₃ -M ⁺
	Các dẫn xuất Azo	-COOH, -OH, amidine
Chất ổn định	Các chất hoạt động bề mặt	Phụ thuộc loại chất ổn định được chọn
Các monomer chức năng hỗ trợ	Acrylic và methacrylic acid	-COOH
	Aminoethyl methacrylate	-NH ₂
	Sodium styrene sulfonate	-SO ₃ -M ⁺

3. CÁC THÔNG SỐ CẦN QUAN TÂM TRONG QUÁ TRÌNH HOẠT HÓA HẠT LATEX

3.1 Độ phân tán của hạt latex trong dung dịch

Xét nghiệm ngưng kết hạt latex được thực hiện dựa trên sự thay đổi khả năng kết cụm của hạt latex trong dung dịch. Vì vậy, đường kính hạt-cụm hạt latex là một chỉ số quan trọng cần được đánh giá, kiểm soát trong suốt quá trình thực hiện để tránh hiện tượng dương tính giả (hạt tự kết cụm). Trong dung dịch đệm phù hợp, các hạt latex có một độ kết cụm nhất định nhưng nhìn chung vẫn phân tán tốt trong dung dịch [15].

Về bản chất, polystyrene là loại vật liệu kỵ nước và sẽ tự kết tụ trong dung môi mang tính phân cực. Tuy nhiên, hạt latex được cải biến để có thể ứng dụng trong LAT thường là loại hạt có mang điện tích trên bề mặt, điều này làm giảm sự kết tụ của hạt, giúp hạt phân tán trong dung môi, và thường tồn tại ở dạng dung dịch nhũ tương (hay keo sữa). Thường gặp nhất là loại hạt latex được biến đổi để mang gốc tích điện ở cuối chuỗi polymer như carboxyl, amine, hydroxyl hay sulfate, và chiếm 5–10% tổng diện tích bề mặt của hạt [16], [17]. Bên cạnh đó, nhiều chất hoạt động bề mặt như SDS hay Tween 20 cũng được thêm vào môi trường để giúp ổn định hệ latex [18], [19].

Hạt latex thường được tổng hợp với đường kính từ vài nm đến hàng chục μm . Đường kính hạt tăng dần đến sự thay đổi diện tích bề mặt, và mật độ các gốc mang điện, điều này ảnh hưởng trực tiếp đến sự kết tụ của hạt. Bên cạnh đó, tùy thuộc vào nhu cầu sử dụng mà cần các kích thước phù hợp. Với các ứng dụng LAT định tính bằng mắt thường, các hạt có đường kính từ 0.3-0.5 μm là phù hợp vì có thể dễ dàng quan sát. Tuy nhiên, khi thực hiện phản ứng LAT định lượng thông qua đo độ đục có thể sử dụng các hạt có đường kính từ dưới 0.15 μm để cho kết quả chính xác nhất [20].

Dung dịch hạt latex hay hệ nhũ tương latex bao gồm hai pha chính: (i) dung dịch đệm giúp phân tán hạt và (ii) hạt latex. Trong đó, các hạt latex trong dung dịch không đứng yên mà luôn luôn chuyển động ngẫu nhiên theo nguyên tắc chuyển động Brown [21]. Vì vậy, dẫn đến một hệ quả là các hạt tiến đến hoặc va chạm nhau sẽ bị kết tụ thông qua tương tác van der Waals và làm mất tính ổn định của hệ keo.

Một hệ keo tốt là hệ keo đạt được sự cân bằng giữa lực đẩy và lực hấp dẫn giữa các hạt trong hệ và để làm được điều đó, các phương pháp phổ biến được áp dụng thông qua hai cơ chế là:

- Ổn định điện tích (electrostatic stabilization): các chất điện li như muối được bổ sung vào môi trường giúp cung cấp các cation và anion có khả năng liên kết với các gốc điện tích trên bề mặt hạt và tạo nên lớp ion bao phủ hạt thông qua tương tác Coulomb. Lớp ion này giúp tạo nên lực đẩy giữa các hạt khi chúng tiến đến quá gần nhau [22]. Hoặc có thể thêm vào dung dịch hạt latex các chất ion hoạt động bề mặt như SDS, khi hấp thụ lên bề mặt hạt chúng có khả năng cung cấp các gốc mang điện và tạo lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt. Các chất hoạt động bề mặt ion mang lại hiệu quả cao hơn các gốc hoạt động bề mặt không ion. Tuy nhiên, phương pháp ổn định hệ nhũ tương latex bằng điện tích có thể giảm hiệu quả khi thay đổi nồng độ các chất điện giải có trong môi trường, đặc biệt là trong ứng dụng y học.

- Ổn định cấu trúc không gian (steric stabilization): hệ keo được ổn định bằng cách sử dụng các copolymer có khả năng gắn lên bề mặt hạt hoặc thay thế các gốc tích điện của hạt bằng các chuỗi polymer để gây ra cản trở không gian giữa các hạt [23]. Bên cạnh đó, khi các hạt tiến đến quá gần nhau, lớp kỵ nước giữa các hạt do các polymer tạo ra sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu. Vì vậy, để duy trì sự cân bằng, dung môi sẽ đi vào giữa hai hạt tạo nên lực đẩy - là phản lực của lực tương tác van der Waals - giúp đảm bảo các hạt được phân tán [24]. Trong ứng dụng sinh học, nhiều protein và amino acid mang các đặc điểm cấu tạo phù hợp để đóng vai trò như copolymer giúp ổn định hệ keo như: albumin, BSA hay Glycine, Valine, Glutamine

có chuỗi bên kỵ nước [25]. Các copolymer có phân tử khối, kích thước càng lớn thì chúng càng bám chặt trên bề mặt hạt và vì vậy, làm tăng hiệu quả của phương pháp.

3.2 Các đặc tính, yếu tố liên quan đến protein/kháng thể

Các đặc tính của protein có ảnh hưởng trực tiếp đến quyết định sử dụng phương pháp nào để gắn định hướng chúng lên hạt latex. Các protein có kích thước lớn và vùng kỵ nước lớn thường sẽ được áp dụng phương pháp hấp thụ thụ động như BSA và IgG [26]. Bên cạnh đó, các gốc $-COOH$ và $-NH_2$ của protein cũng có khả năng tạo liên kết cộng hóa trị với các bề mặt hạt latex mang gốc phản ứng tương hợp [27]. Vì vậy, phương pháp hợp lý được lựa chọn tùy thuộc vào vị trí của các gốc phản ứng hay vùng phản ứng trên protein. Với công nghệ protein tái tổ hợp, nhiều loại kháng thể-mảnh kháng thể (antibody fragment) được cải biến để có thể gắn định hướng với bề mặt polystyrene [28].

Trong thử nghiệm ngưng kết hạt latex, việc chọn kháng thể là hết sức quan trọng do mỗi loại có các đặc tính riêng biệt và ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả của thử nghiệm. Các kháng thể đơn dòng thường đắt tiền, do đó kháng thể đa dòng được ưa chuộng hơn. Tuy nhiên, vấn đề gặp phải là sự không đồng nhất giữa các kháng thể đa dòng và vì vậy cần phải có quy trình kiểm soát nghiêm ngặt khi tiến hành hoạt hóa hạt latex. Bên cạnh đó, việc dùng một kháng thể toàn vẹn có thể gây ra liên kết không đặc hiệu và làm hạt tụ kết tụ, do đó các kháng thể được biến đổi nhằm tăng hiệu quả của thử nghiệm như cắt bỏ vùng Fc, sử dụng scFv hoặc chỉ vùng Fab của kháng thể [29].

Sau khi được gắn lên hạt, protein/ kháng thể trở thành một phần của phức hợp, gây tác động trực tiếp đến đặc tính của hệ keo. Các mảnh kháng thể có thể được sử dụng để làm tăng độ ổn định của hệ. Fab hay $F(ab')_2$ có điểm đẳng điện thấp, qua đó làm tăng mật độ điện tích của hạt latex, tránh gây kết tụ. Tuy nhiên, các chiến lược thay thế như IgY hay Fab, $F(ab')_2$ vẫn không đủ ổn định ở điều kiện sinh lý (pH 7.4, và cường độ ion 170 mM) [30]. Điều này có thể giải quyết bằng cách sử dụng các chất ổn định như Tween20, Triton X, BSA,... nhưng lại làm giảm tổng lượng kháng thể được gắn lên hạt [31]. Vì vậy, sử dụng các kháng thể/ mảnh kháng thể có tính ổn định cao sẽ giúp hạn chế lượng chất hoạt động bề mặt cần sử dụng và tăng được lượng kháng thể gắn lên hạt.

Một lí do khác để sử dụng các mảnh kháng thể như Fab và $F(ab')_2$ là tránh sự ảnh hưởng của các yếu tố Rheumatoid (RF). RF không chỉ tồn tại trong huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh thấp khớp mà còn nhiều bệnh khác [32]. Chúng có khả năng liên kết với đuôi Fc của IgG, vì vậy gây ra âm tính giả cho thử nghiệm LAT [33]. Bằng cách cắt bỏ đuôi Fc để tạo Fab (sử dụng enzyme papain) hay $F(ab')_2$ (sử dụng enzyme pepsin) hoặc bằng cách sử dụng kháng thể khác loại như IgY - vùng Fc lớn hơn của IgG - có thể giúp loại bỏ được sự ảnh hưởng RF lên độ chính xác của thử nghiệm [30].

Sử dụng kháng thể tái tổ hợp mang lại nhiều ưu điểm, tuy nhiên chúng vẫn gặp phải nhiều hạn chế trong việc sản xuất. Hầu như các kháng thể tái tổ hợp thường biểu hiện ở pha tua nên cần được tái gấp cuộn trước khi được sử dụng để thu được kháng thể ở dạng tan [34]. Các kháng thể-mảnh kháng thể này có thể được tái gấp cuộn theo nhiều phương pháp khác nhau. Bao gồm:

- Tái gấp cuộn trong pha tan: các liên kết nội phân tử và liên phân tử của kháng thể được loại bỏ khi có mặt các chất biến tính mạnh như Urea, DTT, ... trong môi trường. Dưới điều kiện nồng độ các chất phù hợp, các kháng thể đã được biến tính sẽ được tái gấp cuộn, tạo thành kháng thể dạng tan có chức năng khi tiến hành loại bỏ các chất biến tính [29]. Hiệu suất tái gấp cuộn có thể được xác định thông qua hoạt tính sinh học của kháng thể trước và sau khi thực hiện quy trình.

- Tái gấp cuộn trên pha rắn: tuy chưa được thực hiện với pha rắn là hạt latex, nhưng phương pháp này đã được sử dụng và cho thấy hiệu quả cao trên các loại đĩa polystyrene và PMMA (poly(methylmethacrylate)). Tái gấp cuộn trên pha rắn được thực hiện bằng cách ủ các mảnh kháng thể trên pha rắn trong môi trường có chứa chất biến tính. Sau đó, các chất biến tính được loại bỏ và kháng thể được hồi tính khi đã được gắn lên bề mặt vật liệu. Phương pháp này thường được sử dụng để tạo Fab bằng cách gắn lần lượt (quy trình hai bước) hoặc đồng thời (quy trình một bước) các thành phần là Fab H và Fab L lên bề mặt vật liệu [35].

Việc loại bỏ các chất biến tính trong quy trình tái gấp cuộn là bước quan trọng có ảnh hưởng đến hiệu suất của quy trình. Các chất có thể được loại bỏ qua thẩm tách với hiệu suất khoảng 40% hay bằng cách pha loãng, điều này làm giảm nồng độ kháng thể trong dung dịch và cũng giảm được các liên kết liên phân tử giữa các kháng thể, tránh sự kết tụ [35].

Một yếu tố khác cần xem xét chính là khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể. Để sự kết tụ có thể xảy ra, kháng thể phải có khả năng liên kết với hai hoặc nhiều epitope trên kháng nguyên. Nhưng nếu

kháng thể chỉ có thể liên kết với một epitope trên kháng nguyên, chúng không thể tạo ra các cầu nối liên hạt và không có sự kết tụ diễn ra [36].

Mục đích của các phương pháp gắn định hướng kháng thể lên hạt latex là (i) tạo được lớp đơn kháng thể trên bề mặt hạt và (ii) định hướng đúng vùng liên kết kháng nguyên (Fab) giúp tối ưu hóa hiệu suất liên kết kháng nguyên của kháng thể. Vì vậy, nếu phương pháp không phù hợp với các đặc tính của protein sẽ làm giảm hiệu suất gắn cũng như hiệu quả nhận biết kháng nguyên của kháng thể.

Tỉ lệ nồng độ protein/ hạt latex phù hợp cần được xác định cẩn thận khi tiến hành hoạt hóa hạt latex. Với nồng độ protein quá cao, quá trình hoạt hóa có thể tạo ra đa lớp kháng thể trên bề mặt hạt, qua đó làm che phủ các vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể. Tuy nhiên, khi nồng độ kháng thể thấp, tổng lượng kháng thể được gắn lên hạt không đủ để gây kết cụm hạt latex [37]. Cả hai trường hợp trên đều gây ra âm tính giả.

4. CÁC PHƯƠNG PHÁP CÓ ĐỊNH PROTEIN LÊN HẠT LATEX ĐANG ĐƯỢC SỬ DỤNG PHỔ BIẾN

Hiện nay, các kháng thể và mảnh kháng thể được gắn định hướng lên bề mặt hạt latex chủ yếu thông qua:

- (i) Hấp thụ thụ động
- (ii) Liên kết định hướng bằng liên kết cộng hóa trị
- (iii) Liên kết định hướng bằng liên kết ái lực

4.1 Hấp thụ thụ động

Quy trình thực hiện [30]:

1. Ủ kháng thể với hạt latex trong dung dịch đệm
2. Ly tâm và loại dịch nổi
3. Tái huyền phù cận latex với dung dịch đệm
4. Ly tâm rửa hạt với dung môi rửa (Wash buffer)
5. Lưu trữ trong dung môi phù hợp

Nhìn chung, cách tiến hành trên gồm hai giai đoạn chính: (i) hấp thụ vật lý kháng thể lên hạt latex và (ii) loại kháng thể không gắn hạt. Lượng kháng thể không gắn hạt trong dịch nổi thu được ở bước (2) có thể được xác định thông qua nhiều phương pháp định lượng protein khác nhau như xét nghiệm Bicinchoninic acid (BCA), phản ứng Biure,... [38] và qua đó xác định được hiệu suất gắn hạt của kháng thể theo công thức [29]:

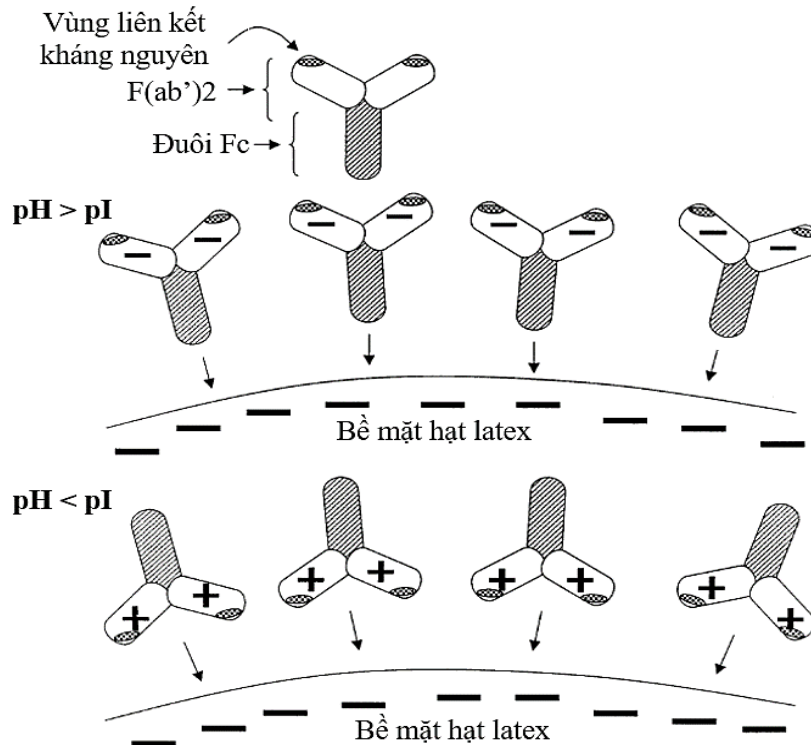
$$\text{Hiệu suất gắn hạt} = \frac{\text{Tổng số protein được ủ} - \text{Tổng số protein không gắn}}{\text{Tổng số protein được ủ}} \times 100\%$$

Hấp thụ vật lý các kháng thể lên bề mặt latex là một phương pháp được sử dụng rộng rãi vì giá thành rẻ, dễ dàng thực hiện. Hạt latex có gần 95% diện tích bề mặt là kỵ nước, điều này thuận lợi cho việc hấp thụ thụ động các kháng thể lên bề mặt của hạt. Điều đáng chú ý trong quy trình thực hiện này là việc chọn môi trường phù hợp để tối ưu hóa được lượng protein có thể hấp thụ lên bề mặt hạt. Các yếu tố về môi trường cần được xem xét cẩn thận là pH và nồng độ muối. Để tối ưu hóa lượng kháng thể gắn hạt, dung dịch đệm được chọn thường có độ pH gần với điểm đẳng điện của kháng thể. Thêm vào đó, trong giai đoạn ủ hạt với kháng thể, dung dịch đệm được sử dụng không nên chứa các ion đa hóa trị vì có thể gây ảnh hưởng đến độ ổn định của hệ [38].

Nồng độ các chất điện giải và hóa trị của chúng gây ảnh hưởng đến sự kết tụ của phức hợp kháng thể-hạt. Giá trị CCC (Critical coagulation concentration) cho ngưỡng giới hạn nồng độ chất điện ly, mà trên đó, hệ keo sẽ mất ổn định và kết tụ [39]. Tuy nhiên, hệ phức hợp kháng thể-hạt có thể được tái ổn định ở môi trường có nồng độ chất điện giải cao, được gọi là giá trị CSC (Critical stabilization concentration). Điều này có thể xảy ra do lực đẩy hydrat hóa của các lớp phân tử ion-nước trên bề mặt hạt [40]. Lực hydrat hóa có thể tăng khi thay đổi loại ion có trong môi trường. Đơn cử là thay Na^+ bằng Ca^{2+} , là loại cation có tính ưa nước cao hơn, giúp tạo ra một lớp nước bao phủ lấy hạt dễ dàng hơn [30].

Độ pH của môi trường có ảnh hưởng trực tiếp đến sự định hướng của protein trong dung dịch. Đối với kháng thể, có đuôi Fc kỵ nước và đầu Fab tích điện, khi pH cao hơn điểm đẳng điện khiến cho vùng Fab tích điện âm. Trong khi đó, ở pH thấp hơn điểm đẳng điện, vùng Fab của kháng thể tích điện dương [30] (**Hình 1**). Thêm vào đó, độ pH còn gây ra sự biến đổi đặc tính bề mặt của hạt latex [41]. Đối với hạt latex mang gốc sulfate trên bề mặt, chúng mang tính kỵ nước và không thay đổi theo pH. Tuy nhiên, một số loại hạt latex mang tính lưỡng tính và có điện tích bề mặt thay đổi theo pH môi trường. Ví dụ, hạt latex mang gốc $-\text{COOH}$ có bề mặt kỵ nước và mang gốc tích điện âm phụ thuộc vào pH hay hạt latex-anfo mang điện

tích âm khi pH cao và điện tích dương khi pH thấp. Vì vậy, độ pH cần được xem xét cho cả hai yếu tố là: loại hạt latex và loại kháng thể.



Hình 1. Sự định hướng của kháng thể so với bề mặt hạt latex ở pH cao hơn và thấp hơn điểm đẳng điện của kháng thể [30] Khi pH không phù hợp cho hạt latex và kháng thể, sự gắn kết không định hướng có thể xảy ra. Trong trường hợp pH khiến đầu Fab của kháng thể và hạt latex mang các điện tích trái dấu, chúng có thể liên kết với nhau thông qua liên kết tĩnh điện và gây ra sự định hướng sai. Thêm vào đó, ở nồng độ thấp, cả đuôi Fc kỵ nước và vùng Fab tích điện đều bị hấp thụ lên bề mặt hạt. Nhưng khi nồng độ tăng cao, sự định hướng của các kháng thể là không đồng nhất và gây ra sự ngăn trở không gian giữa các kháng thể, điều này làm giảm khả năng liên kết kháng nguyên. Trong trường hợp pH khiến vùng Fab của kháng thể và hạt latex tích điện cùng dấu, lực đẩy tĩnh điện được tạo ra giữa vùng Fab và hạt, qua đó giúp hướng các đuôi Fc vào và liên kết với vùng kỵ nước trên hạt. Sự định hướng giữa các kháng thể cũng đồng nhất và khi ở nồng độ phù hợp, kháng thể tạo thành lớp đơn trên bề mặt hạt và có khả năng liên kết kháng nguyên cao nhất [42]. Cuối cùng, môi trường lưu trữ phức hợp kháng thể-hạt với pH phù hợp sẽ tránh gây ra sự kết tụ của hạt latex sau khi đã hoạt hóa [43]. Trong giai đoạn lưu trữ, glycine hoặc BSA được sử dụng trong dung dịch đệm để khóa các vị trí phản ứng không được kháng thể bao phủ trên bề mặt hạt và làm giảm các liên kết không đặc hiệu [44].

Nhìn chung, hạt latex có điện tích bề mặt, vùng kỵ nước lớn do đó phù hợp để hấp thụ một lượng đáng kể protein/kháng thể. Tuy nhiên, do sự liên kết một cách không định hướng, protein/kháng thể thường mất hoặc giảm hoạt tính đáng kể sau khi được cố định. Công bố của Kumuda và cộng sự (2006) đã chỉ ra rằng hoạt tính của enzyme GST sau khi cố định chỉ ở mức 2.2% so với dạng tự do trong khi hiệu suất gắn lên đến 50% [45]. Do đó, hấp thụ thụ động protein lên bề mặt hạt latex không mang lại hiệu quả cao nhất do tỉ lệ gắn kết ngẫu nhiên cao cũng như phải phụ thuộc vào nhiều yếu tố của môi trường. Cuối cùng, nồng độ của protein quá cao sẽ gây ra sự hấp thụ không đặc hiệu hoặc kết tụ, tạo thành nhiều lớp protein trên bề mặt hạt, qua đó làm che phủ các vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể, gây ra âm tính giả [46]

Hạt latex được hoạt hóa bằng phương pháp hấp thụ thụ động không thể lưu trữ trong thời gian dài do các kháng thể có thể thoái hóa hoặc bị các lực vật lý tác động và tách khỏi hạt. Vì vậy, cố định kháng thể lên bề mặt hạt latex thông qua liên kết cộng hóa trị được xem như phương pháp thay thế mang lại hiệu quả cao hơn [47].

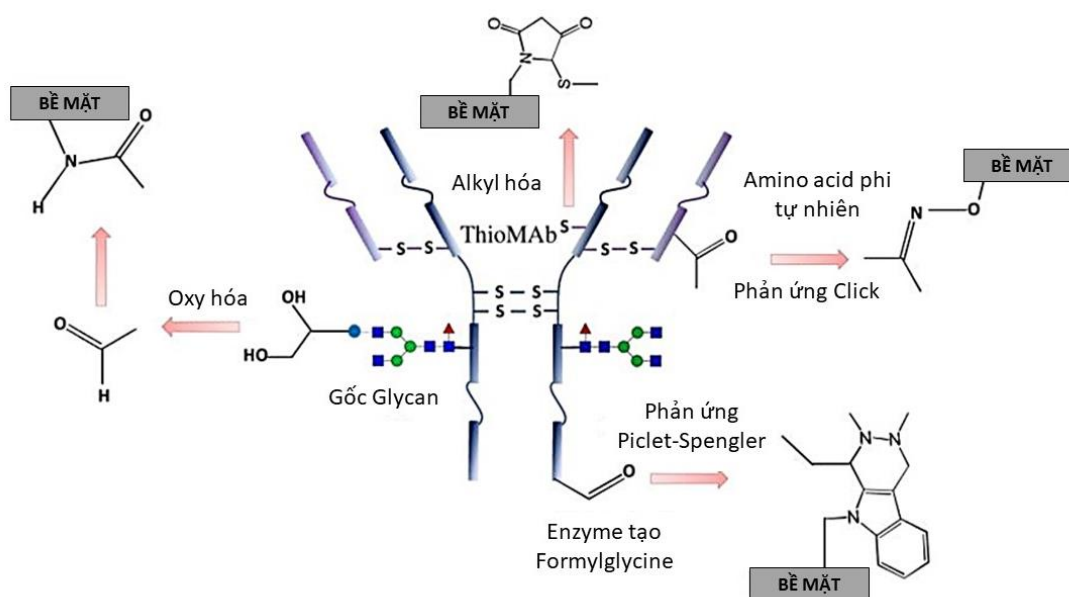
4.2 Liên kết định hướng bằng liên kết cộng hóa trị

Quy trình thực hiện [48]:

1. Ủ hạt latex với linker (cầu nối) ở tỉ lệ thích hợp. Thời gian ủ kéo dài từ 1-2 giờ tùy thuộc vào loại linker được sử dụng.
2. Loại các linker không liên kết với hạt bằng phương pháp ly tâm và tái huyền phù thể vùi với dung dịch đệm
3. Hoạt hóa protein với linker phù hợp với mục đích tạo nhóm chức tương ứng có khả năng phản ứng với linker được gắn hạt.
4. Ủ hạt latex mang linker với kháng thể mục tiêu
5. Loại kháng thể mục tiêu không gắn hạt bằng phương pháp ly tâm và tái huyền phù thể vùi trong dung dịch đệm

Cách tiến hành trên gồm ba giai đoạn chính: (i) hoạt hóa hạt bằng linker I và (ii) hoạt hóa kháng thể bằng linker II (nếu cần thiết) và (iii) gắn kháng thể lên thông qua phản ứng giữa hai linker. Việc hoạt hóa từng bước hạt và kháng thể giúp hạn chế sự liên kết chéo, không đặc hiệu giữa protein với protein, hay hạt với hạt thông qua các linker [49].

Khi tiến hành hoạt hóa hạt với linker, lượng linker được sử dụng cần được tối ưu hóa để không chỉ đảm bảo về chất lượng mà còn về cả giá thành của sản phẩm. Đơn cử trong quy trình hoạt hóa hạt latex với linker SPDP, mật độ các gốc sulfhydryl được tạo ra thông qua linker tăng tuyến tính với lượng linker được sử dụng [49]. Tuy nhiên, tỉ lệ SPDP được gắn với hạt lại thấp theo chiều tăng của lượng linker được sử dụng. Cụ thể, tỉ lệ SPDP gắn hạt là 20.5% khi lượng SPDP được sử dụng là 3.38 mg, nhưng con số này chỉ bằng ~1/3 (6.21%) khi lượng SPDP được sử dụng cao hơn đến 8 lần (22.40 mg). Điều này có thể giải thích do mật độ dày đặc linker trong môi trường phản ứng gây ra sự cản trở về mặt không gian, dẫn đến sự bất lợi trong quá trình hoạt hóa hạt latex. Vì vậy, lượng linker phù hợp được sử dụng sẽ giúp sản phẩm tạo ra đủ số lượng các gốc phản ứng đáp ứng được nhu cầu sử dụng cũng như bảo đảm được giá thành của sản phẩm.



Hình 2. Các nhóm chức trên kháng thể là mục tiêu để tiến hành tạo liên kết cộng hóa trị với hạt latex [27]

Khi tiến hành gắn kháng thể với hạt latex thông qua liên kết cộng hóa trị, các linker có khả năng liên kết với các gốc phản ứng của kháng thể/protein và giúp chúng liên kết với hạt. Gốc phản ứng mục tiêu trên kháng thể và hạt latex sẽ quyết định loại linker được chọn. Dựa vào các nhóm chức mục tiêu được tạo liên kết trên bề mặt hạt và protein, linker được chia thành hai loại: đồng chức năng và dị chức năng (homo và heterobifunctional). Các linker đồng chức năng có thể đóng vai trò trung gian giúp gắn kết với gốc amine hay carboxyl của protein với gốc amine hay carboxyl của hạt [50]. Trong khi đó, các linker dị chức năng lại giúp gắn nhóm amine của protein với gốc carboxyl trên hạt và ngược lại.

Ưu điểm vượt trội của phương pháp này là có thể giảm thiểu sự tác động của môi trường đến hiệu suất hoạt hóa hạt latex. Trong môi trường pH sinh lý, các nhóm amine sơ cấp tồn tại cuối đầu N của chuỗi polypeptide

(α -amine) hay các nhóm amine tồn tại ở chuỗi bên của gốc lysine (ϵ -amine) mang điện tích dương và hướng ra ngoài môi trường, giúp chúng dễ tạo liên kết với linker hơn mà không làm biến tính protein [51]. Cũng như các gốc amine, gốc carboxyl -COOH tồn tại ở đầu C của chuỗi peptide hoặc ở các chuỗi bên của gốc aspartic acid (Asp, D) và glutamine (Glu, E) và có thể liên kết với carbodiimides acid (EDC và DCC) [52]. Tuy nhiên, các gốc mục tiêu carboxyl và amine trên kháng thể không mang tính chọn lọc đặc hiệu. Vì vậy, một số gốc phản ứng khác như sulfhydryl, khi trở thành mục tiêu để các linker gắn kết, có thể cung cấp tính chọn lọc cao và qua đó làm tăng sự định hướng của kháng thể [27]. Do đó, kháng thể cần được xử lý để tạo các gốc -SH tự do trước khi sử dụng các linker (maleimides, haloacetyls và pyridyl disulfides) [53]. Tuy nhiên, việc xử lý kháng thể nên được xem xét kỹ càng trước khi thực hiện vì có thể gây ảnh hưởng trực tiếp đến cấu trúc cũng như chức năng của chúng. Cuối cùng, vấn đề thường gặp phải đối với linker là khi sử dụng ở nồng độ cao, chúng có thể gây liên kết chéo giữa protein với protein, các protein với hạt và làm hệ mất ổn định hay kết tụ, cũng như làm tăng sự định hướng ngẫu nhiên của kháng thể. Các linker được thiết kế với sườn carbon dài giúp tạo thành cánh tay đệm giữa hạt và kháng thể. Tay đệm dài giúp giảm sự cản trở không gian giữa các kháng thể được gắn và cũng tăng tính linh động, giúp kháng thể có biên độ chuyển động cao hơn sau khi gắn. Các thí nghiệm của Xiyan Deng và cộng sự (2021) đã cho thấy mối quan hệ của độ dài linker với độ ổn định của hệ keo sau khi hoạt hóa [49]. Nhìn chung, cầu nối không đủ dài sẽ khiến các vùng điện tích trái dấu trên kháng thể tương tác với hạt và làm mất sự ổn định của hệ keo. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng hạt latex được hoạt hóa với kháng thể thông qua liên kết cộng hóa trị cần được bảo quản ở nhiệt độ thấp (4 °C) và chất lượng của sản phẩm có thể được duy trì lên đến hơn 30 ngày.

Một số kháng thể được cải biến để giúp chúng tăng hiệu suất gắn hạt latex thông qua liên kết cộng hóa trị cũng như khả năng định hướng trên hạt. Các chuỗi scFv có thể được thêm đuôi peptide mang gốc Cysteine giúp cung cấp nhóm chức phù hợp để liên kết với linker trong phương pháp này. Kết quả nghiên cứu cho thấy, scFv được cải biến này có khả năng gắn lên bề mặt polystyrene thông qua liên kết cộng hóa trị tốt hơn hấp thụ thụ động. Độ nhạy của thử nghiệm cũng được cải thiện so với khi sử dụng phương pháp hấp thụ thụ động, cụ thể, scFv cải biến có thể phát hiện được chất mục tiêu ở nồng độ thấp hơn gần 10 lần. Bên cạnh đó, gắn hạt bằng liên kết cộng hóa trị cũng giúp kháng thể duy trì trên bề mặt hạt dưới điều kiện khắc nghiệt hơn [54].

Hạt latex cũng được cải biến để mang lại sự thuận lợi cho quá trình sản xuất. Thay vì phải sử dụng linker thì các hạt latex có thể được cải biến để mang gốc phản ứng mạnh ở cuối chuỗi polymer như chloromethyl, hydrazide có khả năng phản ứng trực tiếp với các nhóm chức trên kháng thể [55]. Bên cạnh đó, một số hạt được biến đổi mang các gốc được hoạt hóa thông qua bức xạ tia UV như phenyl azide, psoralen, diazirine,... Tuy nhiên, các gốc này phản ứng không đặc hiệu, có thể liên kết với cả chuỗi bên của amino acid hay sườn carbon của peptide [43].

So với phương pháp hấp thụ thụ động, điều kiện môi trường (pH, nồng độ muối,...) ít ảnh hưởng đến sự định hướng của kháng thể hơn khi sử dụng phương pháp gắn bằng liên kết cộng hóa trị. Tuy nhiên, sau khi được gắn, các protein/kháng thể trở thành một phần của hệ keo và sẽ gây ra sự biến đổi các đặc tính lý hóa của phức hợp kháng thể-hạt. Vì vậy, điều kiện môi trường sau khi hoạt hóa hạt latex cần được khảo sát để tránh sự kết tụ của hạt, đảm bảo độ ổn định của hệ keo.

Mặc dù mang lại nhiều lợi ích hơn so với phương pháp hấp thụ thụ động nhưng phương pháp liên kết kháng thể với hạt latex thông qua liên kết cộng hóa trị còn gặp nhiều trở ngại về hiệu suất cũng như giá thành. Diện tích gốc phản ứng trên bề mặt hạt rất nhỏ ~10% nên tổng lượng kháng thể được gắn là không cao. Để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo, hạt latex cần phải trải qua quá trình xử lý phức tạp để loại bỏ các linker và gốc hóa học còn gắn trên bề mặt. Thêm vào đó, phản ứng cộng hóa trị có thể gây ảnh hưởng đến cấu trúc dẫn đến suy giảm hoặc mất chức năng của kháng thể.

4.3 Liên kết định hướng bằng liên kết ái lực

Quy trình thực hiện [81]:

1. Bionyl hóa kháng thể mục tiêu
2. Ủ kháng thể với hạt latex mang gốc streptavidin trong 30 phút, 22 °C
3. Loại kháng thể không gắn hạt bằng cách ly tâm
4. Tái huyền phù cụm hạt với dung dịch đệm PBS 0.1M, pH 7.4 và lưu trữ ở nồng độ 0.5 mg/mL

Phương pháp định hướng kháng thể trên bề mặt hạt latex bằng liên kết ái lực hiện được xem là phương pháp có độ chính xác cao và hiệu suất tối ưu nhất. Các hạt latex được đánh dấu bằng streptavidin hoặc

biotin có thể liên kết đặc hiệu với kháng thể được cải biến để mang biotin hoặc streptavidin. Tương tự với gắn định hướng bằng liên kết cộng hóa trị, phương pháp này cần sự cải biến kháng thể vì vậy có thể gây ra ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của chúng. Bên cạnh đó, đây là phương pháp khó thực hiện, giá thành cao [56].

5. ĐỊNH HƯỚNG KHÁNG THỂ TRÊN BỀ MẶT THÔNG QUA CÁC ĐUÔI PEPTIDE

Quy trình thực hiện [29]:

1. Tạo kháng thể dung hợp với đuôi peptide ái lực
2. Ủ kháng thể tái tổ hợp với hạt
3. Ly tâm loại kháng thể không gắn hạt
4. Tái huyền phù thể vùi hạt latex với dung dịch đệm có chứa BSA hoặc Glycine
5. Ly tâm loại dịch nổi
6. Lưu trữ ở nhiệt độ thấp (4°C) trong dung dịch đệm phù hợp

Với sự phát triển của các kỹ thuật công nghệ sinh học hiện đại, nhiều loại kháng thể-mảnh kháng thể được dung hợp với các loại đuôi peptide gắn đặc hiệu bề mặt vật liệu, đặc biệt là polystyrene. Các đuôi peptide ái lực với bề mặt vật liệu polystyrene được sàng lọc thông qua kỹ thuật biopanning. Trong kỹ thuật này, thư viện phage display của *E. coli* được chuẩn bị với các gen được chèn sẽ biểu hiện thành các protein trên bề mặt phage. Khi được tiến hành ủ cố định với polystyrene và rửa trôi, các hạt phage còn tồn tại trên bề mặt vật liệu sẽ mang các peptide liên kết ái lực. Cuối cùng, các phage biểu hiện peptide mục tiêu được tinh sạch và phân tích [57].

PS-tag là chuỗi từ 10-12 amino acid và mang nhiều gốc kỵ nước. Các kết quả thí nghiệm cho thấy rằng các PS-tag liên kết đặc hiệu với bề mặt hạt thông qua việc nhận biết các gốc carboxyl, carbonyl hay hydroxyl trên bề mặt hạt qua các gốc amino acid tích điện. Trong khi đó, các gốc amino acid kỵ nước trên peptide lại gắn với hạt thông qua tương tác kỵ nước [58].

Thứ tự, cách phân bố cũng như thành phần các gốc amino acid trong PS-tag cũng ảnh hưởng đến khả năng gắn đặc hiệu của chúng. Hầu như các PS-tag đều chứa các gốc amino acid tích điện dương (Arginine, Histidine và Lysine) cùng với các gốc amino acid có chuỗi bên kỵ nước (Alanine, Valine, Isoleucine và Leucine) được xếp thành các cụm như PS16 (RVHRAVL), PS11 (GRIQRWVVMFL), PS23 (AGLRLKKAIIHR) [45]. PS6 là một đuôi peptide liên kết ái lực với polystyrene có trình tự RIIIRIR cho thấy ái lực liên kết cao với bề mặt hạt latex, được cấu tạo bởi hai gốc amino acid là Arginine mang điện tích dương và Isoleucine có chuỗi bên kỵ nước. Các nghiên cứu của Kumuda và cộng sự cho thấy PS6 có ái lực liên kết cao với hạt latex. Điều này có thể giải thích là do các liên tác tĩnh điện giữa Arginine với gốc mang điện tích âm trên bề mặt hạt và các tương tác kỵ nước của Isoleucine. Trong môi trường mang chất cạnh tranh như BSA hay Tween20 với nồng độ cao hơn gấp 10000 lần, PS6 vẫn cho thấy khả năng liên kết tốt với hiệu suất hơn 70%. Trong khi đó, các PS-tag được cấu tạo chủ yếu từ các gốc amino acid kỵ nước (PS2: RAFIAS) hoặc từ các gốc amino acid tích điện (PS3: RRIRRP) lại cho thấy hiệu suất thấp hơn đáng kể; khoảng 5% đối với PS2 và 15% đối với PS3 trong cùng một điều kiện thử nghiệm [59]. Sự suy giảm hiệu suất của PS3 là do dư thừa các amino acid tích điện dương qua đó làm tăng lực đẩy tĩnh điện giữa chúng và bề mặt hạt [45]. Thêm vào đó, chiều dài chuỗi bên (alkyl) của các amino acid kỵ nước đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì khả năng liên kết với bề mặt hạt. Nhìn chung, khi chiều dài các chuỗi bên giảm (Isoleucine > Leucine > Valine > Alanine và Glycine) thì khả năng liên kết của PS-tag với hạt cũng giảm [60]. Các kết quả trên đã chỉ ra rằng PS-tag liên kết với bề mặt polystyrene thông qua hai cơ chế chính: tương tác kỵ nước và liên kết tĩnh điện.

Các kháng thể/mảnh kháng thể có khả năng liên kết ái lực cao với bề mặt hạt latex khi được dung hợp với các PS-tag. Kháng thể chuỗi đơn (scFv) khi dung hợp với PS-tag có trình tự DVEGIGDVDLVNYFEVGATYTF NK (PM-tag) có khả năng gắn hạt latex với hiệu suất 100%. Hay PS6 cũng giúp scFv gắn hạt với cùng hiệu suất và độ bao phủ bề mặt lên đến 133%, tạo nên lớp đôi kháng thể bao bọc lấy hạt. Tuy nhiên, ở điều kiện không phù hợp, các đuôi peptide ái lực có khả năng làm trung hòa điện tích bề mặt của hạt latex sau khi hấp thụ, do đó làm giảm đáng kể thế Zeta và gây nên sự kết tụ của các hạt trong hệ nhũ tương [29].

Trong điện hóa học, thế Zeta được sử dụng để phản ánh thế điện động cũng như lực đẩy tĩnh điện của các hạt trong hệ. Giá trị thế Zeta càng lớn, hệ keo càng ổn định [61]. Đuôi peptide PS6 mang nhiều gốc tích điện dương, do đó làm tăng điểm đẳng điện pI của scFv: 7.4 trước khi dung hợp và 9.0 sau khi dung hợp [34]. Ở điều kiện thí nghiệm, pH 6.0-8.0, scFv-PS6 tích điện dương và làm trung hòa các điện tích trên bề

mặt hạt latex vì vậy làm giảm giá trị thế Zeta của hệ, từ 6.0×10^{-5} mV/nm² xuống còn ~ 0 mV/nm². Trong khi đó, đuôi PM-tag làm pI của scFv giảm xuống còn 6.2, do đó scFv-PM tích điện âm, và không gây ảnh hưởng đến Zeta (8.0×10^{-5} mV/nm² trước khi hấp thụ và $\sim 7.0 \times 10^{-5}$ mV/nm² sau khi hấp thụ) ở điều kiện pH 8.0, nhưng lại làm giảm mất ổn định hệ ở điều kiện pH 6.0-7.0, với thế Zeta ở hai điều kiện pH trên lần lượt là ~ 0 mV/nm² và 1.0×10^{-5} mV/nm² [29]. Việc duy trì sự ổn định thế Zeta của hệ có thể được khắc phục thông qua việc cải biến protein bằng cách làm giảm điểm đẳng điện pI của chúng. Kumuda và cộng sự đã chỉ ra rằng, bằng việc chèn các đoạn ngắn từ 5-15 amino acid Aspartic, điểm đẳng điện của scFv-PM giảm và qua đó tránh được việc trung hòa điện tích bề mặt hạt và làm giảm thế Zeta ngay ở cả điều kiện pH 6.0-7.0 [29]. Việc thay đổi pI của scFv cũng giúp chúng cải thiện khả năng hồi tính sau khi được biểu hiện của kháng thể. Như đã đề cập, hầu hết các scFv sẽ được biểu hiện ở dạng thể vùi thông qua hệ thống biểu hiện *E. coli*. Tuy nhiên, PM-tag làm giảm giá trị pI của scFv sau khi dung hợp, vì vậy làm tăng tỉ lệ hồi tính của protein sau khi trải qua quá trình tái gấp cuộn ở điều kiện pH 8.0-8.5 với hiệu suất lên đến hơn 90% [34]. Các đoạn amino acid Aspartic cũng được sử dụng với cùng mục đích.

Một yếu tố khác cần quan tâm chính là khả năng duy trì hoạt tính của các kháng thể-enzyme sau khi được cố định lên hạt polystyrene latex. Protein khi được hấp thụ lên bề mặt hạt latex thường gặp phải sự thay đổi về cấu trúc và qua đó khiến chúng bị suy giảm hoặc mất chức năng. Đơn cử với scFv có kích thước nhỏ và thường sẽ bị thay đổi cấu trúc khi được hấp thụ lên bề mặt hạt latex, vì vậy làm giảm hoặc gây mất khả năng liên kết kháng nguyên. Tuy nhiên, khi được dung hợp với đuôi peptide PM-tag, các scFv không những không bị mất hoạt tính mà còn có khả năng phát hiện kháng nguyên với độ nhạy cao hơn 60 lần [29]. Enzyme GST khi được dung hợp với đuôi peptide PS1 cũng cho thấy khả năng duy trì hoạt tính sau khi hấp thụ ở mức 17%-35%, cao hơn khoảng 5-10 lần so với GST dạng không dung hợp ở cùng điều kiện thí nghiệm. Các đuôi peptide PS19/PS23 không chỉ cho thấy khả năng liên kết đặc hiệu cao hơn mà còn giúp duy trì hoạt tính của enzyme tốt hơn PS1 [57]. Không chỉ dừng lại ở đó, các kháng thể dung hợp tương tác với bề mặt hạt latex thông qua các đuôi peptide ái lực, đồng thời cũng xoay định hướng vùng phản ứng ra bên ngoài pha lỏng-dung môi, làm tăng khả năng tiếp cận với các kháng nguyên [45].

Sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể dung hợp với đuôi peptide ái lực đã cho thấy nhiều ưu điểm, tuy nhiên, phương pháp này vẫn có các nhược điểm cần được giải quyết. Đầu tiên, các kháng thể được dung hợp trực tiếp với đuôi peptide, nên mỗi khi muốn nhận biết một loại kháng nguyên khác, dẫn đến việc phải thay đổi kháng thể, thì phương pháp này cần tái lập để tạo ra loại kháng thể mới được dung hợp với đuôi peptide ái lực. Vì vậy, để giải quyết được vấn đề này, một giải pháp khả dĩ là sử dụng các protein trung gian có khả năng liên kết với bề mặt polystyrene và kháng thể. Protein A thường được sử dụng như protein trung gian, sau khi được gắn lên hạt latex qua phản ứng với linker, chúng có khả năng bắt đuôi Fc của kháng thể, qua đó giúp xoay định hướng vùng Fab của kháng thể ra ngoài môi trường [62],[63],[64]. Thêm vào đó, protein A có thể được dung hợp với các đuôi peptide ái lực để tăng khả năng gắn lên bề mặt hạt. Tuy chưa được ứng dụng trên bề mặt polystyrene nhưng protein A dung hợp đuôi peptide đã được nghiên cứu và ứng dụng trên các loại vật liệu khác. Đơn cử, trong xét nghiệm dòng chảy bên, protein dung hợp có một đầu là protein A - có khả năng liên kết với đuôi Fc của kháng thể - và một đầu là protein 3-Helix- có khả năng liên kết đặc hiệu với màng nitrocellulose đã được tạo ra và cho thấy hiệu quả cao trong việc bắt giữ kháng thể trên bề mặt màng nitrocellulose, làm giảm được tỷ lệ âm tính giả [65]. Đây là một trong những giải pháp hữu hiệu cần được xem xét và phát triển. Tóm lại, mỗi phương pháp hoạt hoá hạt latex với kháng thể có ưu, nhược điểm riêng (**Bảng 2**) nên tùy theo mục đích và nhu cầu nghiên cứu để lựa chọn phương pháp phù hợp cả về thời gian, kinh phí, và độ tiện dụng.

Bảng 2. So các phương pháp hoạt hóa hạt latex với kháng thể đã được đề cập

	Hấp thụ thụ động	Liên kết cộng hóa trị	Liên kết ái lực	Dung hợp với đuôi peptide ái lực	Sử dụng protein cầu nối
Khả năng định hướng	+	++	++	+++	+++
Khả năng duy trì chức năng protein	+	+	+	+++	+++
Tiền biến đổi protein	—	+	✓	✓	—
Thời gian lưu trữ	+	+++	+++	K	K
Sự ổn định hệ keo sau khi gắn	+	+++	+++	+++	K
Độ đặc hiệu	—	+	++	+++	+++

+: thấp, ++: trung bình, +++: cao

✓: có, —: không

K: không xác định

6. CÁC XÉT NGHIỆM SỬ DỤNG HẠT LATEX ĐƯỢC HOẠT HÓA

Các hạt latex được hoạt hóa bằng cách gắn các phân tử sinh học lên bề mặt, giúp chúng có thể thực hiện nhiều ứng dụng trong các phương pháp xét nghiệm sinh học. Các xét nghiệm sinh học này sử dụng hạt như chất chỉ thị và được chia thành xét nghiệm đồng thể (homogenous) và xét nghiệm dị thể (heterogenous).

6.1 Xét nghiệm đồng thể (homogenous assay)

Trong xét nghiệm đồng thể, các kháng thể được cố định trên bề mặt hạt latex có khả năng liên kết chéo với kháng nguyên có trong mẫu thử. Vì vậy, hạt latex trong dung dịch kết cụm với nhau và thay đổi tính chất quang học của môi trường. Hạt latex được sử dụng thường là các loại hạt được nhuộm màu hoặc gắn huỳnh quang, cũng như hạt gắn với chấm lượng tử.

- Phương pháp ngưng kết hạt latex: khi có sự hiện diện của kháng nguyên mục tiêu trong mẫu thử, các hạt latex sẽ kết cụm. Với kích thước hạt phù hợp (0.8-1.0 μm), sự kết cụm có thể được quan sát định tính bằng mắt thường. Đây là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, phù hợp với các xét nghiệm *in situ* do thời gian trả kết quả ngắn, và được thương mại hóa rộng rãi.

- Phản ứng Luminex: hạt latex được hoạt hóa bằng kháng thể được sử dụng để phát hiện kháng nguyên mục tiêu. Trong mẫu bệnh phẩm, kháng thể trên hạt sẽ liên kết với kháng nguyên có trong mẫu. Sau đó, một kháng thể thứ cấp dung hợp biotin được thêm vào và tạo phức hợp kháng thể-kháng nguyên dạng sandwich. Streptavidin dung hợp với Phycoerythrin (PE) sẽ liên kết với biotin trên kháng thể thứ cấp. Cuối cùng, phức hợp hạt latex được đánh dấu sẽ được phân tích thông qua các thiết bị như Luminex200 hoặc FlexMap [66].

6.2 Xét nghiệm dị thể (heterogenous assay)

Không như xét nghiệm đồng thể, các cụm hạt latex bị kết cụm do sự liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ tồn tại ở một pha riêng biệt, độc lập với mẫu thử.

- Phản ứng lai miễn dịch trên màng lọc: được thực hiện tương tự với phương pháp ngưng kết hạt latex, tuy nhiên, mẫu thử sẽ được lọc qua lưới lọc với mục đích giữ lại các cụm hạt latex bị ngưng kết. Thêm vào đó, để quan sát định tính dễ dàng, phương pháp này sử dụng các hạt latex được nhuộm màu hoặc gắn huỳnh quang. [67].

- Phản ứng ELISA bắt hạt: kháng thể sơ cấp được gắn trên hạt latex sẽ liên kết đặc hiệu với kháng nguyên mục tiêu có trong mẫu thử. Tiếp theo, kháng thể thứ cấp liên kết với enzyme được thêm vào sẽ liên kết với phức hợp hạt-kháng thể sơ cấp-kháng nguyên. Khi có cơ chất phản ứng, enzyme sẽ phân giải cơ chất tạo thành sản phẩm tủa ở trên màng, lượng sản phẩm tỉ lệ thuận với nồng độ kháng nguyên [68].

- Que thử sử dụng hạt latex: vùng T (test) trên que thử được phủ bằng kháng thể kháng kháng nguyên mục tiêu (kháng thể 1). Trong mẫu thử dương tính, phức hợp kháng thể 2-hạt latex sẽ liên kết đặc hiệu với kháng nguyên tại vùng S (sample). Thông qua lực mao dẫn, phức hợp sẽ di chuyển từ vùng S đến vùng T dọc theo que thử và tạo nên phức hợp kháng thể 1-kháng nguyên-[kháng thể 2-hạt latex]. Khi đó, hạt latex - được nhuộm màu hoặc gắn huỳnh quang - hướng lên phía trên bề mặt que thử giúp dễ dàng quan sát kết quả bằng mắt thường [69].

6.3 Các phương pháp định lượng

Hiện nay, trong các xét nghiệm sử dụng hạt latex, các thiết bị quang học được ứng dụng rộng rãi giúp chúng ta có thể định lượng các phân tử mục tiêu thông qua thay đổi sự kết cụm của hạt. Các kỹ thuật này giúp hạn chế tối đa tính chủ quan khi bán định lượng bằng mắt thường. Thêm vào đó, chúng cho phép phát hiện phân tử mục tiêu ở nồng độ thấp hơn với độ nhạy cao hơn. Một số kỹ thuật được sử dụng phổ biến có thể kể đến là:

- Phương pháp đo độ đục Turbidimetry: thông qua việc xác định cường độ của ánh sáng truyền suốt mà phương pháp đo độ đục Turbidimetry có thể xác định được nồng độ kháng nguyên mục tiêu. Trong mẫu thử dương tính, sự liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên tạo nên các cụm hạt và qua đó làm tăng sự hấp thụ ánh sáng. Vì vậy, nồng độ kháng nguyên tăng sẽ làm cho các cụm hạt tăng lên về kích thước lẫn số lượng và làm tăng lượng ánh sáng được hấp thụ [70].

- Phương pháp đo độ đục Nephelometry: khác với phương pháp Turbidimetry, phương pháp này xác định nồng độ kháng nguyên có trong mẫu thử thông qua cường độ ánh sáng bị tán xạ. Các hạt latex

được hoạt hóa bằng kháng thể sẽ kết cụm thông qua liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, qua đó gây nên sự thay đổi đường đi của ánh sáng truyền qua mẫu thử. Ánh sáng bị tán xạ thường được xác định ở các vị trí 30 độ hoặc 90 độ so với góc tới. Cường độ ánh sáng đo được giúp xác định được nồng độ kháng nguyên mục tiêu có trong mẫu thông qua việc so sánh với đường chuẩn đã được lập trước đó [71].

7. ỨNG DỤNG MINH HỌA TRONG VIỆC XÉT NGHIỆM VIRUS SARS-COV

Trong bối cảnh chưa có thuốc đặc trị, các phương pháp xét nghiệm SARS-Cov 2 là công cụ hữu dụng giúp các chuyên gia nhanh chóng phát hiện bệnh và đưa ra phác đồ điều trị phù hợp. Hiện nay, RT-PCR được xem như chuẩn vàng trong chẩn đoán COVID-19 với độ nhạy và độ đặc hiệu lên đến 95% [72]. Tuy nhiên, các kỹ thuật xét nghiệm thông qua việc khuếch đại nucleic acid như RT-PCR lại có quy trình phức tạp, thường phải thực hiện trong phòng thí nghiệm do yêu cầu cao về máy móc, trang thiết bị. Do đó, các phương pháp lai miễn dịch được đề ra như các biện pháp khả dĩ để khắc phục vấn đề nêu trên.

Các phương pháp lai miễn dịch mang lại sự tiện lợi trong chẩn đoán virus SARS-CoV 2 [73]. Tại các điểm xét nghiệm cũng như cơ sở y tế, que thử được sử dụng rộng rãi nhờ vào giá thành rẻ cũng như thời gian trả kết quả ngắn. Hiện nay, que thử được thiết kế với mục đích phát hiện kháng nguyên của virus SARS-CoV 2 là protein gai và nucleocapsid [74]. Như đã trình bày tại mục 6.2, trong que thử, quá trình đầu tiên xảy ra là sự liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên mục tiêu với phức hợp hạt latex-kháng thể. Do đó, khả năng phát hiện kháng nguyên phụ thuộc cao vào sự định hướng của kháng thể trên hạt. Một nghiên cứu được tiến hành bởi Gamon CK Mak và cộng sự (2020) đã cho thấy rằng các bộ kit phát hiện nhanh kháng nguyên COVID-19 có độ nhạy thấp hơn 10^2 - 10^5 lần so với phương pháp RT-PCR [75]. Vì vậy, việc phát triển các que thử có độ nhạy cao, đồng nghĩa với việc phát hiện được kháng nguyên ở nồng độ thấp hơn, sẽ giúp chẩn đoán được sự xâm nhiễm của SARS-CoV 2 ở giai đoạn sớm, khi mà lượng virus còn thấp. Cuối cùng, que thử cũng cho thấy sự bất ổn định của sản phẩm trong hiệu quả phát hiện kháng nguyên [76], [77].

Xét nghiệm ngưng kết hạt latex gần như là một biện pháp khả dĩ để khắc phục các vấn đề trên khi có thể đảm bảo được độ nhạy, độ đặc hiệu, thời gian xét nghiệm ngắn và giá thành, đặc biệt là có thể thực hiện *in situ*. Trong ứng dụng chẩn đoán virus SARS-CoV 2, các phương pháp lai miễn dịch sử dụng hạt latex cho thấy hiệu quả cao trong việc chẩn đoán. Xét nghiệm ngưng kết hạt latex do Sally Esmail và cộng sự phát triển có khả năng phát hiện kháng thể trong huyết thanh bệnh nhân với độ nhạy 97.5% và độ đặc hiệu 100% [78]. Các protein kháng nguyên của virus SARS-CoV 2 lên bề mặt hạt latex giúp phát hiện mẫu bệnh phẩm dương tính trong giai đoạn sớm của bệnh; khi đó, lượng kháng thể được tạo ra nhờ đáp ứng miễn dịch thấp và các loại xét nghiệm khác chưa đủ độ nhạy để phát hiện. Thêm vào đó, LAT có thể trả kết quả chỉ trong vòng hai phút, có thể quan sát bằng mắt thường và không cần bất kỳ máy móc hay trang thiết bị nào phức tạp. Bên cạnh đó, protein phản ứng C (C-Reactive Protein - CRP) phản ánh sự viêm hệ thống khi có sự xâm nhiễm của virus cũng là một yếu tố chỉ thị để phát hiện sự xâm nhiễm của SARS-CoV 2 trong giai đoạn sớm [79]. Công trình của Kumada và cộng sự (2009) đã cho thấy kháng thể chuỗi đơn kháng CRP có thể phát hiện được CRP ở nồng độ ~9 ng/ml khi được định hướng tốt trên bề mặt vật liệu thông qua các đuôi peptide ái lực [80].

8. KẾT LUẬN

Hiện nay, nhiều nhóm nghiên cứu/phòng thí nghiệm đang hướng tới việc phát triển các phương pháp gắn định hướng hạt latex. Đề thu được một sản phẩm vừa kiểm soát protein gắn định hướng vừa có tính đa năng cần có một chiến lược tiếp cận mới. Trong bài tổng quan này, chúng tôi đã tóm tắt các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng gắn protein lên hạt latex cũng như một số cải tiến mới nhất hiện nay để gắn định hướng kháng thể lên hạt latex thông qua protein cầu nối (protein A, G, L hay dạng lai). Chiến lược này sẽ mở ra một giải pháp tiếp cận có kiểm soát cho việc gắn kháng thể lên vật liệu nói chung và hạt latex nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. M. Singer, and C. M. Plotz, "The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis", *The American journal of medicine*, vol. 21, no. 6, pp. 888–892, 1956.
- [2] F. Önen, "Prevalence of Rheumatoid Factor (RF) and Anti-native-DNA Antibodies (anti-n DNA) in Different", *Turkish Journal of Medical Sciences*, vol. 28, no. 1, pp. 85-88, 1998.

- [3] Attar Z. J, Chance M. L, el-Safi, S. Carney, ...and Hommel M, "Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis", *Acta tropica*, vol. 78, no. 1, pp. 11–16, 2001.
- [4] A. Mert, R. Ozaras, F. Tabak, Bilir M.,... and R. Ozturk, "The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests", *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 46, no. 4, pp. 241–243, 2003.
- [5] K. Nakanishi, T. Sakiyama, Y. Kumada, K. Imamura, and H. Imanaka, "Recent Advances in Controlled Immobilization of Proteins onto the Surface of the Solid Substrate and Its Possible Application to Proteomics", *Current Proteomics*, vol. 5, no. 3, pp. 161–175, 2008.
- [6] Bangs Laboratories Inc, "Absorption protocols", 2013 . [Online]. Available: <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TechNote%20204%20Web.pdf> [Accessed 05 12 2021].
- [7] Bangs Laboratories Inc, "Polymer micropheres", 2016 . [Online]. Available: <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TechNote%20100%20Web.pdf> [Accessed 05 12 2021].
- [8] P. Pladis, and C. Kiparissides, *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Place of publication: Elsevier, 2014.
- [9] S. Koltzenburg, M. Maskos, and O. Nuyken, *Polymer Chemistry*, First Edition. Place of publication: Springer Heidelberg, 2017.
- [10] L. Yang and Y. Ke, "Synthesis of polystyrene nanolatexes via emulsion polymerization using sodium dodecyl sulfonate as the emulsifier", *High Performance Polymers*, vol. 26, no. 8, pp. 900–905, 2014.
- [11] W. D. Harkins, "A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization", *Journal of American Chemistry Society*, vol. 69, no. 6, pp. 1428–1444, 1947.
- [12] F. K. Hansen, and J. Ugelstad, "Particle nucleation in emulsion polymerization-1. A Theory for homogenous nucleation", *Journal Polymê Science Polymer Chemistry Edition*, vol. 16, no. 8, pp. 1953–1979, 1978.
- [13] Cho Young-Sang, Cheol Hwan Shin, and Sujin Han, "Dispersion Polymerization of Polystyrene Particles Using Alcohol as Reaction Medium", *Nanoscale research letters*, vol. 11, no. 1, 2016.
- [14] A. M. van Herk, *Chemistry Technology Emulsion Polymerisation*, 2nd Edition. Place of publication: John Wiley & Sons Ltd , 2013.
- [15] A. Wanger, V. Chavez, R. S. P. Huang,... and A. Dasgupta, *Microbiology Molecular Diagnosis in Pathology*, First Edition, Elsevier, 2017.
- [16] D. H. Napper, and R. G. Gilbert, *An Introduction to Polymer Colloids*, First Edition. Place of publication: Springer Netherlands, 1990.
- [17] L. Zhu, and L. Liu, M. Jiang, "Synthesis of monodisperse hydroxyl-containing polystyrene via chemical modification", *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 17, no. 1, pp. 37–42, 1996.
- [18] Bohuslav Dobias, Xueping Qiu, and Wolfgang von Rybinsky, *Solid - liquid dispersions*, 1st Edition. Place of publication: CRC Press, 1999.
- [19] A. B. Jódar-Reyes, J. L. Ortega-Vinuesa, and A. Martín-Rodríguez, "Electrokinetic behavior and colloidal

stability of polystyrene latex coated with ionic surfactants", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 297, no. 1, pp. 170–181, 2006.

[20] ThermoFisher Scientific, "Latex Bead Technical Overview", 2018. [Online]. Available: <http://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cell-analysis/qdots-microspheres-nanospheres/idc-surfactant-free-latex-beads/latex-bead-technical-overview.html> [Accessed 06 18 2021].

[21] Jia Dongdong, Jonathan Hamilton, Lenu M. Zaman, and Anura Goonewardene, "The time, size, viscosity, and temperature dependence of Brownian motion of polystyrene microspheres", *American Journal of Physics*, vol. 75, no. 2, pp. 111-115, 2007.

[22] J. Hierrezuelo, A. Sadeghpour, I. Szilagyi, A. Vaccaro, and M. Borkovec, "Electrostatic stabilization of charged colloidal particles with adsorbed polyelectrolytes of opposite charge", *Langmuir*, vol. 26, no. 19, pp. 15109-15111, 2010.

[23] K. Kim, K. Park, G. Kim, ... and S. Q. Choi, "Surface Charge Regulation of Carboxyl Terminated Polystyrene Latex Particles and Their Interactions at the Oil/Water Interface", *Langmuir*, vol. 30, no. 41, pp. 12164-12170, 2014.

[24] Peter A. Lovell, and Mohamed S. El-Aasser, *Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers*, First Edition. Place of publication: Wiley, 1997.

[25] P. JM, H.-A. R, and de las Nieves FJ, "Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex: II. Colloidal stability and immunoreactivity", *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, vol. 7, no. 3, pp. 241–251, 1995.

[26] W. Norde, and J. Lyklema, "The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces. I. Adsorption isotherms. Effects of charge, ionic strength, and temperature", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 66, no. 2, pp. 257–265, 1978.

[27] M. Shen, J. Rusling, and C. K. Dixit, "Site-Selective Orientated Immobilization of Antibodies and Conjugates for Immunodiagnosics Development", *Methods (San Diego, California)*, vol. 116, p. 95-111, 2017.

[28] Y. Kumada, "Site-specific immobilization of recombinant antibody fragments through material-binding peptides for the sensitive detection of antigens in enzyme immunoassays", *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics*, vol. 1844, no. 11, pp. 1960–1969, 2014.

[29] Y. Kumada, Y. Miyamura, R. Tanibata, ... and H. Jun-Ichi, "Design and site-directed immobilization of single-chain Fv antibody to polystyrene latex beads via material-binding peptides and application to latex turbidimetric assay", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 131, no. 1, pp. 84–89, 2021.

[30] L. Dávalos-Pantoja, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, and R. Hidalgo-Álvarez, "Colloidal stability of IgG-and IgY-coated latex microspheres", *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 20, no. 2, pp. 165-175, 2001.

[31] J. L. Ortega-Vinuesa, J. A. Molina-Bolívar, and R. Hidalgo-Álvarez, "Particle enhanced immunoaggregation of F(ab')₂ molecules", *Journal of Immunological Methods*, vol. 190, no. 1, pp. 29–38, 1996.

[32] F. Ingegnoli, R. Castelli, and R. Gualtierotti, "Rheumatoid Factors: Clinical Applications", *Disease Markers*, vol. 35, no. 6, pp. 727-734, 2013.

- [33] V. de Angelis and P. L. Meroni, *Autoantibodies*, Second Edition. Place of publication: Elsevier, 2007.
- [34] Y. Kumada, Y. Ishikawa, Y. Fujiwara, ... and M. Kishimoto, "Efficient refolding and immobilization of PMMA-tag-fused single-chain Fv antibodies for sensitive immunological detection on a PMMA plate", *Journal of Immunological Methods*, vol. 411, pp. 1–10, 2014,.
- [35] Y. Kumada, K. Hamasaki, E. Sasaki, ... and M. Kishimoto, "Immobilization and functional reconstitution of antibody Fab fragment by solid-phase refolding", *Journal of Immunological Methods*, vol. 400–401, no. 1, pp. 70–77, 2013.
- [36] J. L. Ortega-Vinuesa, R. Hidalgo-Álvarez, F. J. De Las Nieves, ... and C. P. Price, "Characterization of immunoglobulin G bound to latex particles using surface plasmon resonance and electrophoretic mobility", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 204, no. 2, pp. 300–311, 1998.
- [37] E. A. Jemima, S. Manoharan, and K. Kumanan, "Development and evaluation of a recombinant-glycoprotein-based latex agglutination test for rabies virus antibody assessment", *Archives of Virology*, vol. 159, no. 8, pp. 1987–1993, 2014.
- [38] M. Jansson, D. Belić, J. Forsman, and M. Skepö, "Nanoplatelet interactions in the presence of multivalent ions: The effect of overcharging and stability", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 579, pp. 573–581, 2020.
- [39] M. Galli, S. Sáringer, I. Szilágyi, and G. Trefalt, "A simple method to determine critical coagulation concentration from electrophoretic mobility", *Colloids and Interfaces*, vol. 4, no. 2, pp. 20, 2020.
- [40] J. A. Molina-Bolívar, F. Galisteo-González, and R. Hidalgo-Álvarez, "Colloidal stability of protein-polymer systems: A possible explanation by hydration forces", *Physical Review E*, vol. 55, no. 4, pp. 4522–4530, 1997.
- [41] J. J. Valle-Delgado, J. A. Molina-Bolívar, F. Galisteo-González, and M. J. Gálvez-Ruiz, "Study of colloidal stability of an amphoteric latex", *Colloid and Polymer Science*, vol. 281, no. 8, pp. 708–715, 2003.
- [42] A. B. Jódar-Reyes, J. L. Ortega-Vinuesa, and A. Martín-Rodríguez, "Adsorption of different amphiphilic molecules onto polystyrene latices", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 282, no. 2, pp. 439–447, 2005.
- [43] T. López-León, A. B. Jódar-Reyes, J. L. Ortega-Vinuesa, and D. Bastos-González, "Hofmeister effects on the colloidal stability of an IgG-coated polystyrene latex", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 284, no. 1, pp. 139–148, 2005.
- [44] Othman, and Abdulrazzag Abdulaziz, "The Use of Antibody-Coated Latex Beads to Determine Single Positive and Double Positive Mouse Spleen Cells Expressing CD5 and/or CD19 Glycoproteins" (2015). Browse all Theses and Dissertations", 2018 [Online]. Available: https://corescholar.libraries.wright.edu/etd_all/1394/?utm_source=corescholar.libraries.wright.edu%2Fetd_all%2F1394&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages [Accessed 20 06 2021]
- [45] Y. Kumada, Y. Tokunaga, H. Imanaka, ... and K. Nakanishi, "Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins", *Biotechnology Progress*, vol. 22, no. 2, pp. 401–405, 2006.
- [46] S. Sáringer, R. A. Akula, A. Szerlauth, and I. Szilagy, "Papain Adsorption on Latex Particles: Charging,

- Aggregation, and Enzymatic Activity", *Journal of Physical Chemistry. B*, vol. 123, no. 46, pp. 9984–9991, 2019.
- [47] J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, and R. Hidalgo-Álvarez, "Effect of storage time on the immunoreactivity of IgG physically adsorbed or chemically bound to latex beads", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 184, no. 1, pp. 331–334, 1996.
- [48] Bedabrata Saha, Pål Songe, T. H. Evers, and M. W. J. Prins, "The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles", *Analyst*, vol. 142, no. 22, pp. 4247–4256, 2017.
- [49] Xiyan Deng, Min Zeng, Xuan Wang, ... and Liang Xu, "Preparation and characterization of cyclic citrullinated peptide-immobilized latex beads for measurement of anti-citrullinated protein antibody through latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay", *Journal of Chromatography A*, vol. 1642, 2021
- [50] D. Sung, S. Yang, J. W. Park, and S. Jon, "High-density immobilization of antibodies onto nanobead-coated cyclic olefin copolymer plastic surfaces for application as a sensitive immunoassay chip", *Biomedical Microdevices*, vol. 15, no. 4, pp. 691–698, 2013.
- [51] D.T Cheung, and M.E Nimni, "Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I: reaction with model compounds", *Connective Tissue Research*, vol. 10, no. 2, pp. 187–199, 1982.
- [52] S. Roy, C. K. Dixit, R. Woolley, R. O'Kennedy, and C. McDonagh, "Synthesis and characterization of a Noble metal Enhanced Optical Nanohybrid (NEON): A high brightness detection platform based on a dye-doped silica nanoparticle", *Langmuir*, vol. 28, no. 21, pp. 8244–8250, 2012.
- [53] J. M. J. M. Ravasco, and H. Faustino A., "Trindade, and P. M. P. Gois, Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology", *Chemistry - A European Journal*, vol. 25, no. 1, pp. 43–59, 2019.
- [54] M. J. Hortigüela, and J. G. Wall, "Improved detection of domoic acid using covalently immobilised antibody fragments", *Marine Drugs*, vol. 11, no. 3, pp. 881–895, 2013.
- [55] J. Sarobe, J. A. Molina-Bolívar, J. Forcada, F. Galisteo, and R. Hidalgo-Álvarez, "Functionalized Monodisperse Particles with Chloromethyl Groups for the Covalent Coupling of Proteins", *Macromolecules*, vol. 31, no. 13, pp. 4282–4287, 1998.
- [56] C. E. Chivers, A. L. Koner, E. D. Lowe, and M. Howarth, "How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: Investigation via crystallography and a chimaeric tetramer", *Biochemical Journal*, vol. 435, no. 1, pp. 55–63, 2011.
- [57] T. Sakiyama, S. Ueno, K. Imamura, and K. Nakanishi, "Use of a novel affinity tag selected with a bacterial random peptide library for improving activity retention of glutathione S-transferase adsorbed on a polystyrene surface", *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, vol. 28, no. 4–6, pp. 207–214, 2004.
- [58] Y. Kumada, Y. Shiritani, K. Hamasaki, T. Ohse, and M. Kishimoto, "High biological activity of a recombinant protein immobilized onto polystyrene", *Biotechnological Journal*, vol. 4, no. 8, pp. 1178–1189, 2009.
- [59] Y. Kumada, Y. Shiritani, K. Hamasaki, T. Ohse, and M. Kishimoto, "High biological activity of a recombinant protein immobilized onto polystyrene", *Biotechnological Journal*, vol. 4, no. 8, pp. 1178–1189, 2009.

- [60] Y. Kumada, D. Kuroki, H. Yasui, T. Ohse, and M. Kishimoto, "Characterization of polystyrene-binding peptides (PS-tags) for site-specific immobilization of proteins", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 109, no. 6, pp. 583–587, 2010.
- [61] ISO 13099-1:2012, "Colloidal systems - Methods for Zeta- potential determination - Part 1: Electroacoustic and electrokinetic phenomena", 2012. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/52807.html> [Accessed 07 12 2021]
- [62] W. Choe, T. A. Durgannavar, and S. J. Chung, "Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides", *Materials (Basel, Switzerland)*, vol. 9, no. 12, pp. 994, 2016.
- [63] Bangs Laboratories Inc, "ProActive® Microspheres", 2016. [Online]. Available: <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TechNote%20101%20Web.pdf> [Accessed 07 12 2021].
- [64] J. B. Tang, X.F Sun, H.M Yang,... and Z.Q Gao, "Well-oriented ZZ-PS-tag with high Fc-binding onto polystyrene surface for controlled immobilization of capture antibodies", *Analytica Chimica Acta*, vol. 776, pp. 74–78, 2013.
- [65] T. S. Tran-Nguyen, D. T. Ngo-Luong, K. H. Nguyen-Phuoc, T. L. Tran, and H. Tran-Van, "Simultaneously targeting nitrocellulose and antibody by a dual-headed protein", *Protein Expression and Purification*, vol. 177, 2021.
- [66] Bio-Techne, "LUMINEX ASSAY USERS GUIDE", 2019. [Online]. Available: https://offers.the-scientist.com/hubfs/downloads/TS/Bio-Techne/TS_PPL_Bio-Techne_Immunoassay_Guide/L-941.pdf [Accessed 07 05 2021].
- [67] S. Morais, Á. Maquieira, and R. Puchades, "Immunofiltration: A methodology for preconcentration and determination of organic pollutants", *Analytical Chemistry*, vol. 71, no. 9, pp. 1905–1909, 1999.
- [68] Bangs Laboratories Inc, " Immunological Application TechNote 301", 2013. [Online]. Available: <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TechNote%20301%20Web.pdf> [Accessed 07 05 2021].
- [69] L. Xiao, J. Yang, Q. Li, Y. Wang,... and G. Zhang, "A strip test for the optical determination of influenza virus H3 subtype using gold nanoparticle coated polystyrene latex microspheres", *Mikrochimica Acta*, vol. 187, no. 5, 2020.
- [70] S. Hiraoka, S. Takashima, T. Inokuchi,... and H. Okada, "The novel latex agglutination turbidimetric immunoassay system for simultaneous measurements of calprotectin and hemoglobin in feces", *Intestinal Research*, vol. 17, no. 2, pp. 202–209, 2019.
- [71] L.-Å. Nilsson, *Encyclopedia of Immunology*, Elsevier, 1998.
- [72] K. Eía, K. Vesa, M.Ahava, and S.T Jokiranta, "Real-life clinical sensitivity of SARS-CoV-2 RT-PCR test in symptomatic patients", *PLoS One*, vol. 16, no. 5, 2021.
- [73] F. Amanat, D. Stadlauer, and F. Krammer, "A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans", *Nature Medicine*, vol. 26, no. 7, pp. 1033–1036, 2020.
- [74] C. Chaimayo, B. Kaewnephan, N. Tanlieng, and N. Horthongkham, "Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand", *Virology*

Journal, vol. 17, no. 1, pp. 177, 2020.

[75] G.C Mak, S.S Lau, K.K Wong,... and D.N Tsang, "Analytical sensitivity and clinical sensitivity of the three rapid antigen detection kits for detection of SARS-CoV-2 virus", *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, vol. 133, 2020.

[76] S.M Oh, H. Jeong, E. Chang,... and N.J Kim, "Clinical Application of the Standard Q COVID-19 Ag Test for the Detection of SARS-CoV-2 Infection", *Journal of Korean Medical Science*, vol. 36, no. 14, 2021.

[77] C. Chaimayo, B. Kaewnaphan, N. Tanlieng, and N. Horthongkham, "Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand", *Virology Journal*, vol. 17, no. 1, p. 177, 2020.

[78] S. Esmail, M.J Knauer, H. Abdoh, and S.C Li, "Rapid and accurate agglutination-based testing for SARS-CoV-2 antibodies", *Cell Reports Methods*, vol. 1, no. 2, 2021.

[79] Wang L., "C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19", *Medecine et maladies infectieuses*, vol. 50, no. 4, pp. 332–334, 2020.

[80] Y. Kumada, K. Hamasaki, Y. Shiritani,... and M. Kishimoto, "Direct immobilization of functional single-chain variable fragment antibodies (scFvs) onto a polystyrene plate by genetic fusion of a polystyrene-binding peptide (PS-tag)", *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 395, no. 3, pp. 759–765, 2009.

[81] Doris Urlaub, and Carsten Watzl, "Coated Latex Beads as Artificial Cells for Quantitative Investigations of Receptor/Ligand Interactions", *Current Protocols in Immunology*, vol. 131, no. 1, 2020.

Ngày nhận bài: 05/08/2021

Ngày chấp nhận đăng: 22/11/2021