

**TẠO DÒNG TẾ BÀO LAI SINH KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG
KHÁNG KHÁNG NGUYÊN NS1 CỦA 4 TÝP VI RÚT DENGUE
Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM**

*Phạm Hùng Tiến^{1,2}, Hoàng Xuân Cường³, Võ Thị Bích Thủy⁴
Trịnh Thế Sơn³, Đỗ Như Bình^{3*}*

Tóm tắt

Mục tiêu: Tạo dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên NS1 cho 4 tít của vi rút Dengue trên dòng chuột nhắt trắng BALB/c thuần chủng. **Phương pháp nghiên cứu:** Gây miễn dịch cho chuột BALB/c bằng kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 chủng; thu tế bào lympho B và dung hợp với tế bào Myeloma Sp2/0 để tạo dòng tế bào lai hybridoma có khả năng sinh kháng thể đơn dòng kháng NS1. Sàng lọc dòng tế bào lai dương tính bằng phản ứng ELISA. **Kết quả:** Nồng độ kháng nguyên NS1 tiêm cho chuột là 100 µg/mL trong dung dịch PBS 1x vô trùng, trộn với tá dược FCA và FIA theo thể tích 1:1. Dung hợp tế bào lympho B và tế bào Myeloma Sp2/0 theo tỷ lệ 1:5, nuôi cấy trong môi trường HAT và HT. Tỷ lệ tế bào lai phát triển sau 3 ngày chiếm từ 91,15% - 92,92%. Bằng phản ứng ELISA, lựa chọn được 2 dòng tế bào lai 1A2 và 2A1 có giá trị OD (Optical Density - mật độ quang học) cao nhất là 1,0324 và 1,3765. **Kết luận:** Tạo thành công 2 dòng tế bào lai 1A2 và 2A1 sinh kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 chủng vi rút Dengue.

Từ khóa: Kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên NS1; Tế bào lai; Dung hợp tế bào.

¹Trường Đại học Y tế Công cộng

²Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương

³Học viện Quân y

⁴Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Đỗ Như Bình (nhubinh.do@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 29/8/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 28/9/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i1.489>

**CREATION OF HYBRIDOMA CELL LINES
SECRETING MONOCLONAL ANTIBODIES
AGAINST NS1 ANTIGEN OF FOUR DENGUE SEROTYPES**

Abstract

Objectives: To create hybridoma cell lines that secrete monoclonal antibodies against NS1 antigen for 4 types of Dengue virus in BALB/c mice. **Methods:** Immunize BALB/c mice with recombinant NS1 antigen with 4 strains; collect B lymphocytes and fuse with Myeloma Sp2/0 cells to create a hybridoma cell line capable of producing monoclonal antibodies against NS1; screen the positive hybrid cell line by ELISA reaction. **Results:** The concentration of NS1 antigen injected into mice was 100 µg/mL in sterile 1x PBS solution, mixed with FCA and FIA adjuvant in 1:1 volume. Fusion of B lymphocytes and Myeloma Sp2/0 cells were conducted in the ratio 1:5, cultured in HAT and HT medium. The percentage of hybrid cells that developed after 3 days accounted for 91.15% - 92.92%. By ELISA reaction, 2 hybrid cell lines 1A2 and 2A1 were selected with the highest OD (Optical Density) values of 1.0324 and 1.3765. **Conclusion:** Successfully created 2 hybrid cell lines 1A2 and 2A1 producing monoclonal antibodies specific to the recombinant NS1 antigen pooling 4 strains of Dengue virus.

Keywords: Monoclonal antibody against NS1 antigen; hybridoma cells; cell fusion

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt xuất huyết là một bệnh do vi rút Dengue gây ra, lây truyền bởi muỗi *Aedes aegypti*, phổ biến tại các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Việc chẩn đoán nhiễm vi rút Dengue sớm thường phải dựa vào các xét nghiệm phát hiện kháng nguyên NS1, kháng thể Dengue IgM/IgG hoặc Real-time PCR để phát hiện vi rút Dengue [1, 2]. Tuy nhiên, kháng thể Dengue IgM/IgG thường xuất hiện muộn vào ngày thứ 3 - 4

(IgM) hoặc ngày thứ 14 (IgG) sau khi nhiễm Dengue khiến cho việc chẩn đoán trở nên chậm trễ hơn. Mặc dù, xét nghiệm Real-time PCR có thể phát hiện Dengue sớm nhưng chỉ thực hiện được ở những nơi có cơ sở vật chất xét nghiệm hiện đại [3].

Kháng nguyên NS1 được phát hiện như một marker sinh học hiệu quả cho việc chẩn đoán sớm nhiễm vi rút Dengue do xuất hiện trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm vi rút giai đoạn sớm

(từ ngày thứ 1 - 9). Xét nghiệm kháng nguyên Dengue huyết thanh có độ nhạy 92,4% và có độ đặc hiệu là 98,4% [2, 3].

Kháng thể đơn dòng sản xuất bằng công nghệ tế bào lai được ứng dụng rộng rãi trong phát triển các công cụ chẩn đoán nhanh, trong đó có phát hiện nhanh NS1 của vi rút Dengue [4, 5, 6]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành: *Tạo dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên NS1 cho 4 tít của vi rút Dengue trên dòng chuột nhắt trắng BALB/c thuần chủng ở quy mô phòng thí nghiệm.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, hóa chất dụng cụ và thiết bị nghiên cứu

** Đối tượng nghiên cứu:*

Kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 chủng vi rút Dengue được tổng hợp trong tế bào vi khuẩn *E.coli BL21* (sản phẩm của đề tài KH-CN cấp thành phố mã số: 01C-08/01-2020-3). Động vật thí nghiệm gồm 02 con chuột cái BALB/c thuần chủng, khỏe mạnh, không mang thai, sáu tuần tuổi (Charles River Laboratories, USA) được dùng để gây miễn dịch và thu nhận tế bào lympho B.

** Hóa chất, dụng cụ thí nghiệm:*

Hóa chất: Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Sigma, Mỹ); Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) (Sigma, Mỹ); PBS 1X vô trùng; tế bào Myeloma Sp2/0 (Sigma, Mỹ); FBS 5% (Fetal Bovine Serum huyết thanh bào thai bò); môi trường HAT (Sigma, Mỹ); môi trường HT (Sigma, Mỹ); môi trường DMEM (Invitrogen), PEG 50% (Polyethylene glycol-PEG 1500 Sigma, Mỹ); dung dịch đệm Bicarbonate 0.05M - pH 9.6 (Sigma, Mỹ); Tween 20 (Sigma, Mỹ); kháng nguyên BL21; HRP-IgG Goat anti Mouse (Invitrogen, Mỹ); Bovine Serum Albumin (BSA) (Invitrogen, Mỹ); cơ chất TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) (Invitrogen, Mỹ); HCL 1M.

Dụng cụ: Xi lanh 3mL, bộ kết nối xi lanh, bông, cồn 70°C, micropipet loại 1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 20 μ L, 10 μ L, găng tay, đĩa petri vô trùng, ống fancel, ống eppendorf, bông cồn, túi zipper, bình nito lỏng, bơm kim vô trùng, chày thủy tinh vô trùng, cối có ray lọc vô trùng, pan và kéo vô trùng, đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, buồng đếm hồng cầu, đĩa Immunoplate (SPL Life Sciences, Hàn Quốc), cuvet, túi thẩm tích.

** Thiết bị:*

Tủ cấy an toàn sinh học (Esco, Singapore), kính hiển vi soi ngược

(Leica Microsystems, Đức), máy ly tâm (Eppendorf, Đức), tủ ấm nuôi cấy tế bào, tủ lạnh 4° (LG, Việt Nam), tủ đông -20° (Kangaroo, Việt Nam), tủ đông -80°, cân phân tích, cân kỹ thuật, nồi hấp vô trùng, máy vortex, máy spin down và các thiết bị khác.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu thực nghiệm ở labo.

* *Phương pháp nghiên cứu:*

- Tạo dòng tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên NS1:

Sử dụng chuột Balb/c (4 - 6 tuần tuổi, cùng 1 lô) được tiêm gây miễn dịch với liều kháng nguyên NS1 được pha loãng tới nồng độ 100 - 200 µg/mL trong dung dịch PBS 1x vô trùng. Dùng kháng nguyên đã pha loãng để tạo nhũ tương với chất bổ trợ Freund's Complete Adjuvant (FCA) và Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) theo tỷ lệ 1:1 và tiến hành tiêm gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. Quá trình tiêm gây miễn dịch tiến hành ba lần/tuần trong hai tuần liên tục với cùng liều.

Ba ngày sau lần gây miễn dịch cuối cùng với FIA, mổ chuột để thu hạch bẹn và lách để thu nhận tế bào lympho B.

- Tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng NS1 gộp 4 chủng vi rút Dengue:

Phục hồi và nuôi tế bào Myeloma: Chuyển ống tế bào Myeloma Sp2/0 từ nitơ lỏng sang bể ủ ấm 37°C cho rã đông. Chuyển dung dịch chứa tế bào sang ống ficol 15mL có chứa 10mL môi trường DMEM. Tiến hành ly tâm với tốc độ 1.000rpm trong 5 phút thu cặn tế bào. Sau khi loại bỏ dịch nổi và hoàn nguyên cặn tế bào trong 10mL môi trường DMEM có bổ sung 5% FBS rồi chuyển vào chai nuôi cấy T75. Tế bào được nuôi trong tủ ấm với điều kiện 37°C, 5% CO₂. Hằng ngày quan sát sự phát triển của tế bào dưới kính hiển vi quang học. Sau khi phục hồi tế bào khoảng 2 - 3 ngày, mật độ tế bào trong chai nuôi cấy đạt độ bao phủ từ 80 - 90% thì dừng nuôi cấy.

Dung hợp tế bào lympho B và tế bào Myeloma Sp2/0: Tiến hành dung hợp tế bào theo phương pháp của Köhler & Milstein [4]. Cụ thể như sau: Lắc mạnh chai nuôi cấy tế bào Myeloma cho tế bào bung ra khỏi bề mặt nuôi cấy và chuyển toàn bộ huyền phù tế bào vào chai ficol 50, ly tâm 1.000rpm trong 5 phút loại dịch, hoàn nguyên cặn trong 10mL DMEM. Chuyển huyền phù tế bào lympho B và huyền phù tế bào myeloma Sp2/0 vào ống ficol 50mL, phối trộn theo tỷ lệ 1:5 (1 Myeloma: 5 lympho B). Nhỏ từ từ 1mL dung dịch PEG 50% đã được làm ấm vào cặn tế bào, lắc nhẹ và ủ

trong 1 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó bổ sung tiếp 10mL dung dịch DMEM, ly tâm hỗn hợp ở 1.000rpm trong 5 phút và thu cặn tế bào. Hòa tan cặn tế bào trong môi trường HAT. Sử dụng pipet đa kênh chuyên 200 μ L huyền phù tế bào đưa vào các giếng trên đĩa 96 giếng và ủ trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Sau 10 ngày loại bỏ dịch nuôi cấy HAT và thêm vào mỗi giếng 200 μ L môi trường nuôi cấy DMEM có bổ sung HT. Sau 2 - 4 ngày dung hợp, tiến hành đánh giá khả năng tiết kháng thể đơn dòng của các dòng tế bào lai bằng phản ứng ELISA để sàng lọc tế bào dương tính.

- Kiểm tra khả năng tiết kháng thể đơn dòng của các tế bào lai bằng phương pháp ELISA:

Phương pháp tách dòng tế bào lai (hybridoma): Chọn giếng trong đĩa nuôi cấy tế bào có chứa tế bào lai cho kết quả ELISA dương tính cao nhất, pha loãng sao cho số tế bào đạt 1 tế bào/100 μ L/giếng, nuôi cấy tế bào ở 37°C với 5% CO₂ theo phương pháp pha loãng giới hạn. Kiểm tra lại khả năng sinh kháng thể đơn dòng bằng phản ứng ELISA và chọn dòng tế bào có hiệu giá kháng thể cao nhất, nhân lên với lượng lớn để bảo quản hoặc tiêm vào ổ bụng chuột, thu dịch báng.

Phương pháp ELISA kiểm tra khả năng tiết kháng thể đơn dòng của các

tế bào lai: Phủ đĩa ELISA với 100 μ L/giếng kháng nguyên NS1 ở 4°C qua đêm (kháng nguyên được pha loãng trong đệm Bicarbonate về nồng độ 10 μ g/mL). Rửa đĩa ELISA đã được gắn kháng nguyên bằng 200 μ L/giếng dung dịch PBS với 0,05% Tween 20 để loại bỏ những kháng nguyên không gắn vào bề mặt bản. Khóa bản (blocking) đĩa ELISA bằng 100 μ L dung dịch rửa 0.5% BSA trong 1 giờ ở 37°C. Rửa lại đĩa ELISA ba lần bằng 200 μ L/giếng dung dịch PBS với 0,05% Tween 20. Bổ sung 100 μ L/giếng kháng thể đơn dòng (kháng thể 1 - dịch nuôi cấy tế bào lai tiết kháng thể), ủ ở 37°C trong 1 giờ. Rửa lại đĩa 2 lần bằng 200 μ L/giếng dung dịch PBS với 0,05% Tween 20 loại bỏ những kháng thể không liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Cho 100 μ L kháng thể đặc hiệu loài gắn enzyme vào (kháng thể 2 - HRP-IgG Goat anti Mouse), ủ ở 37°C trong 1 giờ. Rửa đĩa lại bằng 200 μ L/giếng dung dịch PBS với 0,05% Tween 20. Đưa vào mỗi giếng 50 μ L dung dịch cơ chất TMB, ủ ở 37°C trong 10 phút tránh ánh sáng. Dừng phản ứng bằng cách cách bổ sung 50 μ L HCl 1M. Tiến hành đo giá trị OD 450nm bằng ELISA reader để đánh giá kết quả. Những giếng có giá trị OD \geq 0,5 được coi là dương tính, tức là có mặt của kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên NS1 [7].

Kiểm tra đồng thời với kháng nguyên của *E. coli* BL21 để chắc chắn sàng lọc được dòng tế bào lai chỉ đặc hiệu với kháng nguyên NS1. Các bước tiến hành như đã nêu ở trên. Nếu kết quả ELISA với kháng nguyên *E. coli* BL21 cũng có $OD \geq 0,5$ thì chứng tỏ dòng tế bào đó không đạt yêu cầu, kháng thể sinh ra không đặc hiệu với duy nhất kháng nguyên NS1.

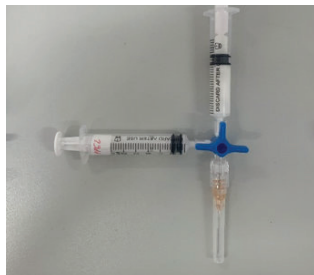
3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được Hội đồng Đạo đức Nghiên cứu trên Động vật, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam thông qua. Các nghiên cứu viên cam kết tuân thủ các quy định của pháp luật hiện hành về đạo đức nghiên cứu. Chúng tôi xin cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả tạo dòng tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên NS1

Kháng nguyên NS1 được pha loãng tới nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ trong dung dịch PBS 1x vô trùng, sau đó được trộn với chất bổ trợ FCA và FIA theo thể tích 1:1. Bơm trộn đều bằng xi lanh để tạo nhũ tương (Hình 1). Trộn đều để đồng nhất hỗn dịch trong các xi lanh và tiến hành tiêm gây đáp ứng miễn dịch trên chuột.



a

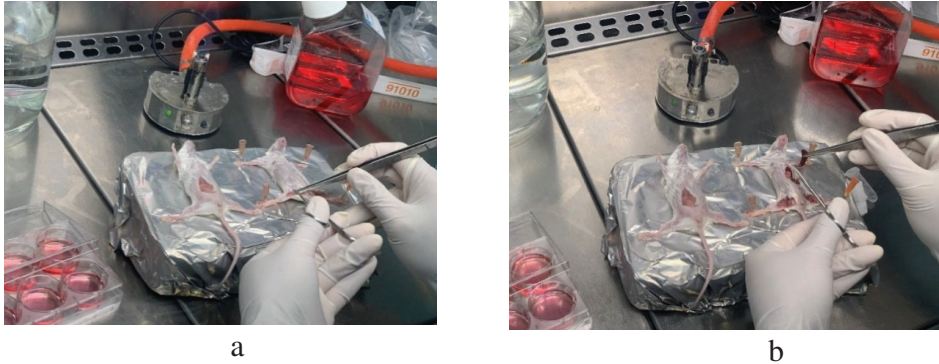


b

Hình 1. Kháng nguyên NS1 được phối trộn với FCA (a) và FIA (b) theo tỷ lệ 1:1 để tạo hỗn hợp đồng nhất tiêm chuột.

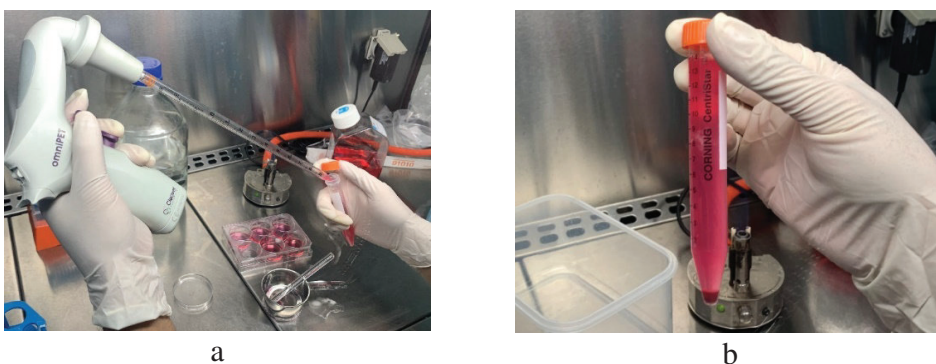
Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột: Tiêm 50 μL nhũ tương (FCA:NS1) dưới da gan bàn chân của chuột BALB/c. Cung cấp đủ thức ăn, nước uống cho chuột và theo dõi chuột ít nhất 2 lần/ngày, nếu vết tiêm có dấu hiệu hoại tử cần loại bỏ chuột và gây miễn dịch thay thế cho con khác. Ngày thứ 4 sau khi tiêm lần 1, gây miễn dịch nhắc lại lần 1, tiêm 50 μL nhũ tương (FIA:NS1) dưới da hai gan bàn chân chuột, thăm chuột 2 lần/ngày. Ngày thứ 7 sau khi tiêm lần 2, gây miễn dịch nhắc lại lần 2 tiêm 50 μL nhũ tương (FIA:NS1) vào dưới da hai gan bàn chân chuột.

Thu tế bào lympho B từ hạch lách và hạch bẹn chuột: Ba ngày sau lần gây miễn dịch cuối cùng với FIA, chuột được gây mê bằng chloroform, sát trùng vùng mổ chuột bằng cồn 70°C và lấy máu ở tim để thu huyết thanh. Mổ chuột để thu lấy hai hạch bẹn và lách (Hình 2).



Hình 2. Mổ chuột thu hạch bẹn (a) và thu hạch lách (b).

Rửa lách và hạch bẹn từ 2 đến 3 lần, mỗi lần trong 5mL môi trường DMEM. Nghiền nhỏ và trộn đều với 10 mL môi trường DMEM. Chuyển hỗn hợp dịch vào ống fancel 15mL, li tâm 1000 rpm/5 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch nổi, hoàn nguyên tế bào vào 10mL DMEM có bổ sung 5mL NH_4Cl 0,85% để phá hồng cầu. Ly tâm 1000rpm 5 phút để loại bỏ dịch nổi. Loại bỏ NH_4Cl trong 10mL môi trường DMEM, ly tâm 1000rpm trong 5 phút để thu tế bào. Tế bào lympho B được giữ trong môi trường DMEM và được sử dụng ngay để tạo tế bào lai khi dung hợp với tế bào myeloma Sp2/0 (Hình 3).



Hình 3. Huyền phù tế bào Lympho B trong môi trường DMEM có bổ sung NH_4Cl 0,85% để loại bỏ tế bào hồng cầu (a) và tế bào lympho B sau khi li tâm dịch huyền phù (b).

2. Kết quả tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng

Tế bào Myeloma Sp2/0 sau khi phục hồi được nuôi hoạt hóa lại trong bình T75. Quan sát hằng ngày dưới kính hiển vi quang học sự phát triển của tế bào, sau 3 ngày nuôi cấy nhận thấy các tế bào phát triển bình thường, độ bao phủ đạt 90%, đủ điều kiện để tiến hành dung hợp.

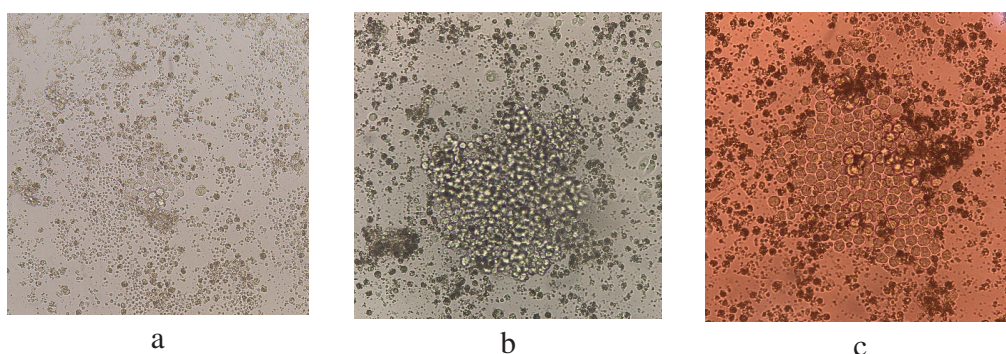
Để tạo tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng, tiến hành dung hợp tế bào

lympho B và tế bào Myeloma Sp2/0 theo tỷ lệ 1:5 (1 Myeloma: 5 lympho B), nuôi cấy chọn lọc trên môi trường HAT và HT. Tiến hành xác định kết quả dung hợp dựa vào hình ảnh tế bào lai hybridoma thu được ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10 x 20 và đánh dấu những giếng có tế bào lai phát triển. Kết quả dung hợp và hình ảnh tế bào lai được thể hiện ở bảng 1 và hình 3.

Bảng 1. Kết quả lai dung hợp tế bào lympho B và tế bào Myeloma Sp2/0.

Lần lai	Số đĩa ELISA sử dụng	Số giếng nuôi cấy tế bào (96 giếng/đĩa ELISA)	Tổng số giếng có tế bào lai phát triển (n, %)	
1	10	960	875	91,15
2	10	960	892	92,92
3	10	960	886	92,29

Kết quả lai dung hợp 10 dòng tế bào, qua 3 lần lai cho thấy tỷ lệ tế bào lai phát triển chiếm từ 91,15 - 92,92%.



Hình 3. Các giếng nuôi cấy tế bào lai quan sát sau 3 ngày (a), 6 ngày (b) nuôi cấy trên môi trường HAT và 3 ngày sau khi thay môi trường HT (c) độ phóng đại 10 x 20.

Quan sát kết quả các giếng nuôi cấy sau 3 ngày cho thấy, những tế bào không được dung hợp trong môi trường chọn lọc HAT sẽ chết. Do tế bào myeloma không có khả năng tổng hợp purine trong môi trường HAT có aminotepirin. Sau 6 ngày nuôi, các tế bào lai sống được sẽ mọc thành cụm sát nhau do vừa có khả năng tổng hợp purine trong môi trường HAT có aminotepirin, vừa có khả năng bám dính bề mặt giống tế bào myeloma. Các tế bào không được lai sẽ chết, chỉ còn lại tế bào lai. Sau khi thay môi trường HT, quan sát sau 3 ngày nuôi cấy thấy các cụm tế bào đều phát triển tốt và ổn định.

3. Kết quả kiểm tra khả năng tiết kháng thể đơn dòng của các tế bào lai bằng phương pháp ELISA

Bảng 2. Kết quả so sánh hiệu giá kháng thể của tế bào lai sử dụng kháng nguyên gắn bản NS1 và BL21 (đối chứng).

Tế bào lai	Kháng nguyên gắn bản	
	NS1	BL21
1A2	1,0324	0,3356
2A1	1,3765	0,3905
3D7	0,657	0,657
3F7	0,580	0,387
4A1	0,556	0,090

Kết quả đọc ELISA ở bảng 2 cho thấy, có 5 dòng tế bào tiết kháng thể đơn dòng kháng NS1 cho kết quả OD > 0,5 lần lượt là 1A2, 2A1, 3D7, 3F7 và 4A1 với 2 dòng 1A2 và 2A1 cho kết quả cao nhất. Khi sử dụng kháng nguyên gắn bản *E. coli* BL21 (vật chủ chứa kháng nguyên NS1 tái tổ hợp) tại vị trí giếng khác tương ứng, kết quả đọc ELISA của dòng tế bào 1A2 và 2A1 cho giá trị lần lượt là 0,3356 và 0,3905. Do đó, 2 dòng tế bào này đặc hiệu với kháng nguyên NS1 và không đặc hiệu với kháng nguyên BL21. Ta lựa chọn được giếng chứa tế bào lai 1A2 và 2A1, đem tách dòng tế bào này, nhân lên với lượng lớn để bảo quản trong nitơ lỏng và đem tiêm vào ổ bụng chuột, thu dịch báng có lượng kháng thể cao nhất.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nêu trên cho thấy nghiên cứu đã tạo được 2 dòng tế bào lai 1A2 và 2A1 tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp NS1 gộp 4 chủng vi rút Dengue. Kết quả này là tiền đề để triển khai nghiên cứu sản xuất lượng lớn kháng thể đơn dòng kháng NS1 trên chuột.

Lời cảm ơn: Công trình sử dụng kinh phí Đề tài cấp Thành phố Hà Nội, mã số 01C-08/01-2020-3 và trang thiết bị của Phòng Vi sinh, Viện Công nghệ Gen, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fisher R, Lustig Y, Sklan EH, Schwartz E. The role of NS1 protein in the diagnosis of flavivirus infections. *In Viruses*. 2023; 15(2). MDPI. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15020572>.
2. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*. 2013; 98(2):192-208. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.03.008>.
3. Tayal A, Kabra SK, Lodha R. Management of dengue: An updated review. *Indian J Pediatr*. 2023; 90(2):168-177. DOI: 10.1007/s12098-022-04394-8. Epub 2022 Dec 27. PMID: 36574088; PMCID: PMC9793358.
4. G Köhler, C Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256:495-497.
5. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021; 19(1):159. DOI: 10.1186/s43141-021-00264-6. PMID: 34661773; PMCID: PMC8521504.
6. Sootichote R, Puangmanee W, Benjathummarak S, Kowaboot S, Yamanaka A, Boonnak K, Ampawong S, Chatchen S, Ramasoota P, Pitaksajakul P. Potential protective effect of dengue NS1 human monoclonal antibodies against dengue and zika virus infections. *Biomedicines*. 2023; 11(1):227. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010227>.
7. Crowther JR. Chapter 2: Basic Principles of ELISA. ELISA: Theory and Practice. *Methods in Molecular Biology*. 1995; 42:35-62.