

Tạo dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng kháng Progesterone

Cù Thị Thiên Thu^{1*}, Nguyễn Bá Mùi¹, Lê Văn Phan²,
Nguyễn Thị Phương Giang¹, Nguyễn Hoàng Thịnh¹, Phạm Kim Đăng¹

¹Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 24/7/2017; ngày chuyển phân biên 28/7/2017; ngày nhận phân biên 16/8/2017; ngày chấp nhận đăng 25/8/2017

Tóm tắt:

Nồng độ Progesterone trong huyết thanh cũng như trong một số dịch của cơ thể động vật là một trong những chỉ thị có thể dùng để chẩn đoán có thai hay một số ca rối loạn sinh sản ở gia súc. Trên thực tế, có nhiều phương pháp phát hiện Progesterone nhưng các phương pháp miễn dịch trên cơ sở sử dụng kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng có những ưu điểm vượt trội về tính đặc hiệu và khả năng ứng dụng. Để tạo tiền đề cho việc ứng dụng trong chẩn đoán liên quan đến sinh sản ở gia súc, kháng thể đơn dòng kháng Progesterone đã được tạo ra từ các dòng tế bào lai. Kháng nguyên chuẩn Progesterone (4-pregnene-3 20-dione 3-O-Carboxymethyl Oxime) do hãng Steraloids (Mỹ) cung cấp đã được dùng để gây miễn dịch trên chuột. Tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên thu được từ lách và hạch của chuột được dung hợp với tế bào Myeloma để tạo dòng tế bào lai hybridoma có khả năng sinh kháng thể đơn dòng. Bằng phản ứng ELISA đã sàng lọc được dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với Progesterone. Kết quả thu được từ nghiên cứu này cho thấy kháng nguyên Progesterone có khả năng gây đáp ứng miễn dịch ở chuột BALB/c tạo kháng thể đơn dòng kháng lại kháng nguyên Progesterone. Từ phản ứng ELISA cho thấy 2 dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với Progesterone.

Từ khóa: ELISA, glycoprotein, kháng thể đơn dòng, Progesterone, tế bào lai hybridoma.

Chỉ số phân loại: 4.2

Đặt vấn đề

Thời gian qua, ngành chăn nuôi bò ở nước ta đã có những bước phát triển quan trọng cả về quy mô và tính chuyên nghiệp, từng bước cung cấp thêm sản lượng thịt và sữa thiết yếu cho người tiêu dùng trong nước. Tuy nhiên, sản lượng sữa sản xuất trong nước mới đáp ứng được gần 34% nhu cầu về sữa tiêu dùng, 66% còn lại là nhập khẩu. Tương tự, bò thịt hiện nay cũng chỉ đáp ứng được 50-60% nhu cầu và lượng nhập khẩu hàng năm là rất lớn [1, 2]. Có nhiều nguyên nhân dẫn tới tình trạng chăn nuôi bò chưa phát triển và năng suất thấp như hiện nay là do chất lượng giống bò, chăm sóc, nuôi dưỡng, khai thác, quản lý đàn kém và đặc biệt là khả năng sinh sản còn thấp. Để nâng cao năng suất sinh sản ở bò thì việc phát hiện và chẩn đoán có thai sớm là rất quan trọng. Nếu thai không được phát hiện kịp thời sau

khi phối, sẽ dẫn đến tăng khoảng cách lứa đẻ và giảm tỷ lệ nhân giống cũng như sản lượng sữa. Nếu bò sữa mang thai được phát hiện ở giai đoạn sớm, sẽ được chăm sóc, nuôi dưỡng cẩn thận theo chế độ bò mang thai, từ đó có thể tăng tỷ lệ đẻ. Đối với bò không có thai, có thể kịp thời phối giống lại, rút ngắn khoảng cách lứa đẻ và giảm chi phí thức ăn, qua đó tăng hiệu quả kinh tế. Chính vì vậy, nghiên cứu về các kỹ thuật chẩn đoán thai sớm của bò sữa là rất quan trọng đối với sự phát triển của ngành công nghiệp bò sữa. Hiện nay, đã có một số phương pháp được ứng dụng để chẩn đoán có thai đối với gia súc nhai lại như siêu âm, khám qua trực tràng nhưng các phương pháp này thường chỉ phát hiện khi gia súc đã có thai sau 2 tháng trở đi.

Trong các chất nội tiết thì Progesterone có nguồn gốc từ thể vàng là chỉ thị phản ánh thực trạng hoạt

động nội tiết của buồng trứng và thể vàng, thực trạng sinh lý cũng như bệnh lý sinh sản của bò. Sự thay đổi nồng độ của Progesterone trong huyết thanh hay trong sữa là một trong những chỉ thị phản ánh trạng thái hoạt động của buồng trứng. Độ dài trung bình chu kỳ tính của bò bình thường kéo dài 21 ngày, Progesterone thấp vào đầu chu kỳ, sau đó tăng dần, đạt cao nhất trong giai đoạn giữa chu kỳ, nếu bò không mang thai nồng độ Progesterone bắt đầu giảm xuống ở mức thấp nhất vào ngày thứ 17 sau khi giao phối. Nếu có chữa thì nồng độ tiếp tục duy trì ở nồng độ cao trong máu và sữa [3]. Dựa trên quy luật này, rất nhiều công trình nghiên cứu đã được thực hiện và ứng dụng thành công như định lượng bằng sắc ký, ELISA, RIA, que thử nhanh [4]. Một số sản phẩm đã được nhập khẩu vào Việt Nam, tuy nhiên do giá thành còn cao nên việc sử dụng cho các trang trại lớn và hộ nuôi còn

* Tác giả liên hệ: Email: cttthu@vnua.edu.vn

Production of hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against Progesterone

Thi Thien Thu Cu^{1*}, Ba Mui Nguyen¹, Van Phan Le²,
Thi Phuong Giang Nguyen¹, Hoang Thinh Nguyen¹, Kim Dang Pham¹

¹Department of Animal Husbandry, Vietnam Academy of Agriculture

²Faculty of Veterinary Medicine, Vietnam Academy of Agriculture

Received 24 July; accepted 25 August 2017

Abstract:

Progesterone is a steroid hormone and is secreted from the corpus luteum and placenta during pregnancy. Serum progesterone concentrations are strongly correlated with the dynamics of the reproductive cycle. In cattle, the progesterone level reaches a peak on the 21st and 22nd day of pregnancy; therefore, progesterone levels in milk and serum are indicators of pregnancy in cattle. Monoclonal antibodies specific to progesterone could be used for the immunodetection of milk and serum progesterone levels. We report here the development of hybrid cells that produce monoclonal antibodies specific to progesterone using hybridoma technology. Hybridoma cells secreting monoclonal antibodies against progesterone were developed by the fusion of spleen cells of an immunized BALB/c mouse. The screening of hybridomas producing monoclonal antibodies specific to progesterone was determined by ELISA. ELISA test results showed that antibodies produced by 2 hybrids reacted specifically with progesterone.

Keywords: ELISA, glycoprotein, hybridoma cell, monoclonal antibodies, progesterone.

Classification number: 4.2

rất hạn chế. Do đó, việc chủ động sản xuất được que thử thai sớm trên bò tại Việt Nam là rất cần thiết. Nghiên cứu này nhằm bước đầu tạo ra được kháng thể đơn dòng kháng Progesterone, từ đó làm cơ sở cho việc sản xuất que thử thai sớm cho bò tại Việt Nam trên nguyên lý sắc ký miễn dịch.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

- Kháng nguyên chuẩn 4-PREGNEN-3, 20-DIONE 3-O-CARBOXYMETHYLOXIME: BSA (Q2606-000) do Hãng Steraloids (Mỹ) cung cấp.

- Chuột BALB/c thuần chủng và tế bào Myeloma Sp2/0 (tế bào ung thư tủy của chuột cùng dòng BALB/c) do Sigma (Mỹ) cung cấp là những nguyên

liệu tiêu chuẩn đang được ứng dụng trong nghiên cứu sản xuất kháng thể đơn dòng.

- Dung dịch PBS 1x, Tween 20 (Sigma, Mỹ).

- HRP conjugated anti-Mouse, kháng nguyên Staphylococcal enterotoxin, TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), HCl 1M, Bicarbonate, Bovine Serum Albumin (BSA).

Phương pháp

Phương pháp gây miễn dịch cho chuột: Sau khi xác định liều tối ưu (200 µg/con/lần), 6 chuột cái đã được gây miễn dịch bằng cách tiêm kháng nguyên chuẩn Progesterone 3-CMO được trộn với chất bổ trợ là freund's complete adjuvants và freund's

incomplete adjuvants (invitrogen) vào gan bàn chân. Chuột được gây miễn dịch 3 lần, mỗi lần cách nhau 3 ngày. Ngày thứ 10 kể từ khi gây miễn dịch, giết chuột để thu tế bào lympho B ở lách và hạch bẹn, sau đó sử dụng để dung hợp (fusion) với tế bào Myeloma Sp2/0.

Phương pháp tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng: Ba ngày sau lần gây miễn dịch cuối cùng, chuột được gây mê bằng chloroform, sát trùng chuột bằng cồn 70° và lấy máu ở tim để thu huyết thanh.

Quy trình tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng được thực hiện theo phương pháp của Köhler và Milstein [5]. Tế bào Myeloma Sp 2/0 và tế bào lympho B được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:10, sau đó ly tâm tế bào ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút và thu cận tế bào. Nhỏ 0,3 ml dung dịch PEG 50% (M.W. 1450; Sigma) vào cận tế bào và ủ trong 60 giây ở nhiệt độ phòng, sau đó bổ sung tiếp 10 ml môi trường tế bào DMEM (Invitrogen), ly tâm tế bào ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút và thu cận tế bào. Sau khi loại bỏ dịch nổi và hoàn nguyên cận tế bào trong môi trường chọn lọc DMEM có bổ sung HAT (Hypoxanthine Aminopterin Thymidine), 150 µl dung dịch tế bào sẽ được đưa vào mỗi giếng trên đĩa 96 giếng và ủ trong tủ ấm 37°C. Sau 10 ngày, loại bỏ dịch nuôi cấy tế bào và thêm vào mỗi giếng 150 µl môi trường chọn lọc DMEM có bổ sung HT (Hypoxanthine Thymidine). Sau 2-4 ngày, tiến hành kiểm tra khả năng tiết kháng thể đơn dòng của các dòng tế bào lai bằng phản ứng ELISA để sàng lọc các tế bào dương tính.

Phương pháp tách dòng (cloning) tế bào lai hybridoma: Các tế bào lai (hybridoma) tiết kháng thể đơn dòng được tách dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn (limiting dilution). Cụ thể chọn giếng trong đĩa nuôi cấy tế bào có chứa tế bào lai (hybridoma) cho kết quả ELISA dương tính cao nhất. Tế bào lai sau đó được pha loãng sao cho số tế bào đạt 1 tế bào/100 µl/giếng, nuôi cấy tế bào ở 37°C với 5%

CO₂. Kiểm tra lại khả năng sinh kháng thể đơn dòng bằng phản ứng ELISA. 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 (ascited fluid).

Phương pháp ELISA để sàng lọc dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng: Nguyên tắc của phương pháp ELISA này là kháng thể đơn dòng đặc hiệu sẽ kết hợp với kháng nguyên là Progesterone 3-CMO. Sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể này sẽ được phát hiện thông qua một kháng thể cộng hợp (conjugate) đặc hiệu loài gắn enzyme và một cơ chất hiện màu. Các bước tiến hành như sau: Gắn (coating) đĩa ELISA với 100 µl kháng nguyên là Progesterone 3-CMO qua đêm ở nồng độ thích hợp. Rửa đĩa ELISA đã được gắn kháng nguyên bằng dung dịch rửa (PBS + 0,05% Tween 20) để loại bỏ những kháng nguyên không gắn vào bề mặt bản. Che chắn (blocking) đĩa ELISA bằng 300 µl dung dịch rửa có bổ sung 5% sữa loại bơ (Skim milk), ủ đĩa ELISA trong 1 h ở 37°C. Rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Cho kháng thể đơn dòng (là dịch nuôi cấy tế bào lai tiết kháng thể) 100 µl vào mỗi giếng. Ủ đĩa ELISA ở 37°C trong 1 h. Rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Cho 100 µl/giếng kháng thể cộng hợp đặc hiệu loài gắn enzyme vào. Ủ đĩa ELISA ở 37°C trong 1 h. Rửa đĩa ELISA bằng dung dịch rửa. Cho 100 µl/giếng dung dịch cơ chất hiện màu TMB. Ủ ở 37°C trong 10 phút sau đó dùng phản ứng bằng 50 µl H₂SO₄ 1N. Tiến hành đo giá trị mật độ quang (OD) ở bước sóng 450 nm rồi tiến hành đánh giá kết quả. Những giếng có giá trị OD ≥ 0,5 được coi là dương tính, tức là có mặt của kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên Progesterone 3-CMO.

Kết quả và thảo luận

Kết quả gây miễn dịch cho chuột

Liều kháng nguyên tối ưu để gây miễn dịch đã được xác định thông qua việc thăm dò ở các liều lượng kháng nguyên khác nhau. Kết quả kiểm tra

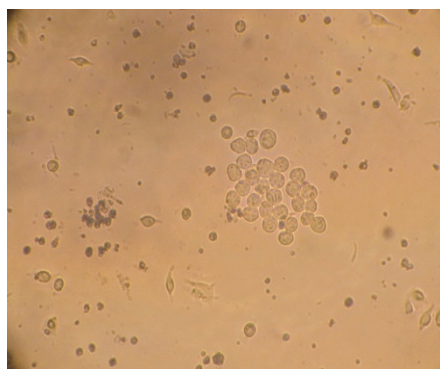
khả năng đáp ứng miễn dịch cho thấy, chuột ở lô được gây miễn dịch ở liều kháng nguyên 200 µg/con/lần cho đáp ứng cao nhất thể hiện qua giá trị OD cao nhất trong phản ứng ELISA.

Sàng lọc các tế bào lai hybridoma tiết kháng thể đơn dòng bằng phản ứng ELISA

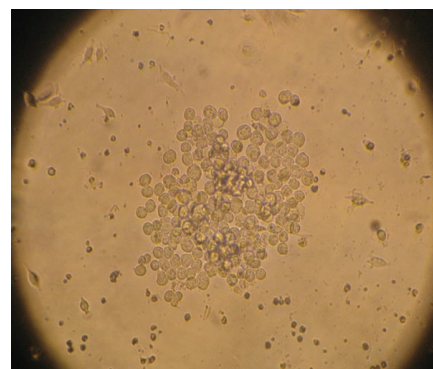
Để tạo được dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng Progesterone 3-CMO, tiến hành lai tế bào Myeloma Sp2/0 với tế bào lympho B miễn cảm kháng nguyên, dung hợp hai loại tế bào trên, nuôi cấy trên môi trường chọn lọc HAT và HT, tiến hành kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10x20 và đánh dấu những giếng có tế bào lai, xác định hình ảnh tế bào lai hybridoma thu được ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau. Kết quả hình ảnh tế bào lai được thể hiện ở hình 1.

Sau 3 lần lai khác nhau, kết quả cho thấy tỷ lệ lai tạo thành công tế bào lai là rất cao. Tỷ lệ các giếng nuôi cấy có tế bào lai dao động trong phạm vi từ 90,63 đến 96,35%. Cụ thể, ở lần lai thứ nhất có 740/768 giếng nuôi cấy tế bào có tế bào lai (đạt 96,35%), lần lai thứ hai có 696/768 giếng có tế bào lai (đạt 90,63%) và lần lai thứ ba có 728/768 giếng có tế bào lai (đạt 94,79%) (bảng 1). Như vậy, có thể thấy hiệu quả lai trong nghiên cứu này là rất cao và cao hơn nhiều so với kết quả của một số công bố trước đây khi nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng đối với các kháng nguyên khác của Đỗ Thị Thảo và cs năm 2008, 2013 [6, 7].

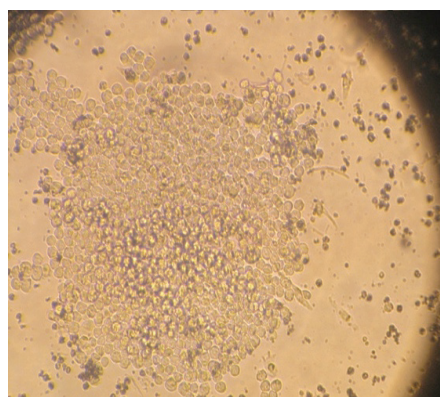
Để sàng lọc được các dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng mong muốn, dịch nuôi cấy tế bào của tất cả các giếng có tế bào lai đã được thu nhận và được dùng cho phản ứng ELISA. Trong



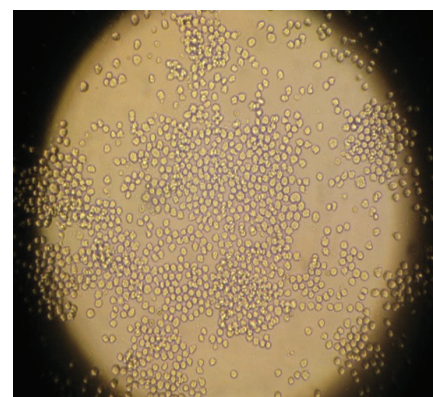
Tế bào lai sau 5 ngày nuôi cấy



Tế bào lai sau 7 ngày nuôi cấy



Tế bào lai sau 10 ngày nuôi cấy



Tế bào lai sau 13 ngày nuôi cấy (sau khi thay môi trường HAT bằng HT)

Hình 1. Tế bào lai hybridoma ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau sau khi dung hợp (fusion) tế bào lympho B và tế bào Myeloma Sp2/0.

Bảng 1. Kết quả lai (fusion) giữa tế bào Myeloma Sp2/0 và tế bào lympho B của chuột BALB/c được gây miễn dịch với Progesterone 3-CMO.

Lần lai (fusion)	Số lượng tế bào dùng để lai		Số đĩa nuôi cấy tế bào dùng (đĩa 96 giếng)	Tổng số giếng nuôi cấy tế bào	Tổng số giếng có tế bào lai	Tỷ lệ % số giếng có tế bào lai/giếng nuôi cấy tế bào
	Tế bào Myeloma	Tế bào lympho B				
1	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	8	768	740	96,35
2	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	8	768	696	90,63
3	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸	8	768	728	94,79

nghiên cứu này, kháng nguyên thương mại Progesterone 3-CMO dùng để gây miễn dịch cho chuột đã được dùng để gắn bản ELISA (200 µg/giếng), đây là kháng nguyên đã được gắn với protein mang là BSA (abumin huyết thanh bò). Điều này cũng có nghĩa là sẽ có 3 khả năng xảy ra đối với tế bào lai được sinh ra, bao gồm: (1) tế bào lai được tạo ra nhưng không tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu, (2) tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên Progesterone 3-CMO, và (3) tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho bản BSA. Để sàng lọc và thu nhận được đúng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên Progesterone 3-CMO, hai loại kháng nguyên là Progesterone 3-CMO và BSA đã được sử dụng một cách riêng rẽ để gắn bản ELISA.

Ở lần lai thứ nhất có 5/740 giếng (0,64%) và lần lai thứ 2 có 14/696 giếng (2,01%) đều cho kết quả ELISA dương tính khi sử dụng hai loại kháng nguyên gắn bản riêng rẽ là Progesterone 3-CMO và BSA. Đối với lần lai thứ 3, có 22/728 giếng (3,02%) cho kết quả ELISA dương tính với kháng nguyên Progesterone 3-CMO, trong khi chỉ có 17/728 giếng (2,34%) cho kết quả ELISA dương tính với kháng nguyên gắn bản BSA. Điều này cũng có nghĩa là trong số 22 giếng cho kết quả ELISA dương tính với kháng nguyên gắn bản là Progesterone 3-CMO thì có đến 17 (77,27%) giếng có kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên là BSA và

chỉ có 4 (18,18%) giếng có kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho kháng nguyên là Progesterone 3-CMO mà không bắt cặp chéo với kháng nguyên BSA (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả sàng lọc tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên Progesterone 3-CMO bằng phản ứng ELISA.

Lần lai (fusion)	Tổng số giếng kiểm tra	Kết quả phản ứng ELISA					
		Sử dụng kháng nguyên gắn bản là Progesterone 3-CMO		Sử dụng kháng nguyên gắn bản là BSA		Số giếng cho kết quả dương tính với kháng nguyên Progesterone 3-CMO mà không dương tính với kháng nguyên là BSA	
		Số giếng dương tính	Tỷ lệ %	Số giếng dương tính	Tỷ lệ %	Số giếng dương tính	Tỷ lệ %
1	740	5	0,64	5	0,64	0	0
2	696	14	2,01	14	2,01	0	0
3	728	22	3,02	17	2,34	5	0,68

Như vậy, sau 3 lần lai đã lai tạo thành công 5 dòng tế bào lai hybridoma tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu là P1, P2, P3, P4, P5. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Yucel và cs, 1999 [8]. Năm dòng tế bào đã chọn lọc này được tiến hành nuôi in vitro để có số lượng lớn tế bào. Để quá trình nhân nuôi đạt kết quả tốt, từ 5 dòng tế bào

chọn được đưa vào 5 chai nuôi cấy đến khi đạt nồng độ 1×10⁵ tế bào/ml. Các chai nuôi cấy được bổ sung môi trường thích hợp cho các tế bào lai phát triển tốt và nuôi trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂.

Đánh giá tính đặc hiệu của 5 dòng tế bào được chọn lọc

Tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng là khả năng kết hợp duy nhất kháng nguyên Progesterone mà không bắt cặp chéo với các kháng nguyên khác có cấu trúc tương tự, cùng nhóm Steroid [9]. Ngoài Progesterone trong huyết thanh động vật còn các hormone

cùng nhóm steroid khác có cấu tạo hoá học gần giống với Progesterone như Estradiol, Testosterone, Corticosterone và Aldosterone [10]. Kháng thể đơn dòng mới thu được lần lượt thử nghiệm với đại diện các nhóm kháng nguyên có cấu tạo hoá học gần giống với Progesterone nói trên và kết quả được tổng hợp ở bảng 3.

Bảng 3. Tính đặc hiệu của 5 dòng tế bào sinh kháng thể đơn dòng kháng Progesterone.

STT	Dòng TB	Progesterone	Estradiol	Testosterone	Corticosterone	Aldosterone
1	P1	+	-	+	-	+
2	P2	+	-	-	-	-
3	P3	+	-	-	+	-
4	P4	+	-	-	-	-
5	P5	+	-	+	+	-

Ghi chú: (+) có kết quả dương tính với giá trị OD ≥ 0,5 trong phản ứng ELISA; (-) là kết quả âm tính với giá trị OD ≤ 0,5 trong phản ứng ELISA.

Kết quả cho thấy dòng tế bào P2 và P4 có độ đặc hiệu cao khi có phản ứng dương tính với Progesterone và âm tính với tất cả các kháng nguyên còn lại. Hai dòng tế bào này tiếp tục nhân nuôi thu dịch nổi, lưu giữ tế bào trong Nitor lỏng và gây băng cho chuột nhằm thu lượng kháng thể cao trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Từ những kết quả nêu trên cho thấy, nghiên cứu đã tạo được 2 dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu với Progesterone. Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo chế tạo que chẩn đoán thai sớm ở gia súc dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hoàng Kim Giao (2017), "Chăn nuôi bò thịt Việt Nam, hiện trạng và giải pháp", *Tạp chí Chăn nuôi online*, <http://nhachannuoi.vn/chan-nuoi-bo-thit-tai-viet-nam-hien-trang-va-giai-phap/>.
- [2] Thủy Dung (2016), "Chăn nuôi bò, cơ hội hay thách thức", *Kinh tế Sài Gòn online*, <http://www.thesaigontimes.vn/141254/Chan-nuoi-bo-co-hoi-hay-thach-thuc.html>.
- [3] D. Dadarwal, R.J. Mapletoft, G.P. Adams, L.F.M. Pfeifer, C. Creelman, J. Singh (2013), "Effect of Progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination", *Theriogenology*, **79**(5), pp.859-866.
- [4] Guang-Min Yu, Teruo Maeda (2017), "Inline Progesterone Monitoring in the Dairy Industry", *Trends in Biotechnology*, **35**(7), pp.579-582.
- [5] G. Köhler, C. Milstein (1975), "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, **256**, pp.495-497.
- [6] Đỗ Thị Thảo, Đỗ Thị Phương, Đỗ Khắc Hiếu, Hà Thị Thu, Đinh Thương Vân, Đinh Duy Kháng, Lê Trần Bình (2008), "Tạo dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng protein vỏ VP28 của virus gây bệnh đốm trắng trên tôm sú", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **6**(2), tr.203-208.
- [7] Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Bá Mùi, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Thị Phương, Phạm Kim Đăng (2013), "Tạo các dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu hormone FSH", *Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, **4**, tr.33-39.
- [8] F.S. Yucel & B. Cirakoglu (1999), "Production of Monoclonal Antibodies specific for Progesterone", *Turkish Journal of Biology*, **23**(4), pp.393-400.
- [9] Zheng Jiasan, Zhang Hongyou, Bao Kai, Gao Weiming, Xu Chuang, and Xia Cheng (2015), "Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy", *Mary Ann Liebert, Inc. Publishers*, **34**(4), pp.275-277.
- [10] R. Patnayak, A. Jena, N. Rukmangadha, A.K. Chowhan, K. Sambasivaiah, B.V. Phaneendra, M.K. Reddy (2015), "Hormone receptor status (estrogen receptor, progesterone receptor), human epidermal growth factor-2 and p53 in South Indian breast cancer patients: A tertiary care center experience", *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, **36**(2), pp.117-122.