

OPTIMAL SDS-PAGE AND WESTERN BLOT TECHNIQUES FOR IDENTIFICATION TESTING OF ERYTHROPOIETIN IN HIGH-TECH BIOLOGICAL PRODUCT

Vu Thi Thu Huong*, Pham Thi Hong Thuy, Vladimir Pēna Sánchez², Oscar Nicolas Ramírez²,
Nguyen Thi Mai Huong¹, Nguyen Thi Tuong An¹, Ngo Doan Dinh¹, Dinh Thi Phuong Thao¹,
Vu Thi Phuong¹

¹ National institute for control of vaccine and biologicals

² Centro de Immunología Molecular-CIM-Cuba

Received 30 May 2025

Accepted 26 June 2025

Abstract: Erythropoietin (EPO) is an erythropoiesis-stimulating factor produced by recombinant DNA technology, used in the treatment of anemia. Identification testing using sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot are important quality control procedures for biological products containing EPO. In National institute for control of vaccine and biologicals (NICVB), our researcher established an EPO identification approach using SDS-PAGE and Western Blot techniques on two biological products containing epoietin alpha. At the same time, the optimal primary and secondary antibody concentrations were selected for nitrocellulose membrane hybridization testing using two dilutions of 1:500 and 1:800. In addition, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was used to detect the antigen-antibody reaction. The results showed that using TMB as the detection substrate provided quick results, simple preparation and an optimal implementation process. Our results provide evidence to implement SDS-PAGE and Western Blot for identification of EPO in High Tech Biological Products in NICVB.

Keywords: *Erythropoietin, SDS-PAGE, Western Blot, TMB*

* Corresponding author:

E-mail address: huongvu.nicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i5.209>

TỐI ƯU KỸ THUẬT SDS-PAGE VÀ WESTERN BLOT CHO NHẬN DẠNG ERYTHROPOIETIN TRONG SẢN PHẨM CÔNG NGHỆ CAO SINH HỌC

Vũ Thị Thu Hường^{1*}, Phạm Thị Hồng Thủy¹, Vladimir Pëna Sánchez², Oscar Nicolas Ramírez², Nguyễn Thị Mai Hương¹, Nguyễn Thị Tường An¹, Ngô Doãn Định¹, Đinh Thị Phương Thảo¹, Vũ Thị Phụng¹

¹ Viện Kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế

² Trung tâm miễn dịch phân tử CuBa (Centro de Immunología Molecular-CIM)

Nhận ngày 30 tháng 05 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 26 tháng 06 năm 2025

Tóm tắt: Erythropoietin (EPO) là yếu tố kích thích tạo hồng cầu được sản xuất bằng công nghệ tái tổ hợp DNA, sử dụng trong điều trị các bệnh thiếu máu. Thử nghiệm nhận dạng bằng điện di trên sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) và Western Blot là thử nghiệm quan trọng trong kiểm định chất lượng sinh phẩm chứa EPO. Tại Viện Kiểm định Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB), nhóm nghiên cứu đã thiết lập quy trình nhận dạng EPO bằng kỹ thuật SDS-PAGE và Western Blot trên hai loại sinh phẩm chứa epoietin alpha. Đồng thời, cũng thực hiện lựa chọn hiệu giá kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai tối ưu cho thử nghiệm lai màng nitrocellulose trên hai độ pha loãng 1:500 và 1:800. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu đã sử dụng 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) của Invitrogen trong phản ứng phát hiện phức hợp kháng nguyên kháng thể. Kết quả cho thấy sử dụng TMB làm cơ chất phát hiện phức hợp kháng nguyên kháng thể nhanh, thuận tiện và hiệu quả. Kết quả nghiên cứu là cơ sở triển khai SDS-PAGE và Western Blot nhận dạng EPO trong sản phẩm công nghệ cao sinh học tại NICVB.

Từ khoá: Erythropoietin, SDS-PAGE, Western Blot, TMB

1. Đặt vấn đề

Erythropoietin, bản chất là glycoprotein, là hormon do thận sản xuất, có vai trò quan trọng trong việc kích thích tuỷ xương sản xuất hồng cầu [1]. Erythropoietin tác dụng như một yếu tố tăng trưởng, kích thích hoạt tính gián phân các tế bào gốc dòng hồng cầu và các tế bào tiền thân

sớm hồng cầu (tiền nguyên hồng cầu). Hormon này cũng còn có tác dụng gây biệt hóa, kích thích tế bào gốc trong tuỷ xương phát triển thành hồng cầu trưởng thành, từ đó tăng lượng hồng cầu trong máu [4].

Epoetin alpha và epoetin beta là những Erythropoietin người tái tổ hợp, chứa 165 acid amin với trọng lượng phân tử khoảng 30.400 Da đến 42000 Da. Epoetin và Erythropoietin tự nhiên hoàn toàn giống nhau về trình tự acid amin và có chuỗi oligosaccharid rất giống nhau trong cấu trúc hydrat carbon[1]. Phân tử của chúng có nhiều nhóm glycosyl nhưng epoetin alpha và epoetin beta khác nhau về vị trí các nhóm glycosyl. Epoetin được chỉ định cho bệnh nhân bị thiếu hụt khả năng sản xuất tế bào hồng cầu. Epoetin được FDA cấp phép từ năm 1993 và darbepoetin từ năm 2002 cho bệnh nhân mắc bệnh thiếu máu do suy thận mạn và thiếu máu do hoá trị ở bệnh nhân ung thư [5].

Thử nghiệm nhận dạng là một trong các thử nghiệm quan trọng trong kiểm định sinh phẩm điều trị chứa EPO. Theo hướng dẫn của dược điển Châu Âu phiên bản 11 và dược điển Nhật Bản phiên bản XVII, thử nghiệm nhận dạng EPO được thực hiện bằng phương pháp điện di trên Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) và Western Blot [2,6]. Tuy nhiên các phương pháp này đã được chứng minh có thể bị ảnh hưởng tới độ mạnh bởi một số yếu tố như thiết bị, hóa chất, nguyên vật liệu, do đó cần thiết phải tối ưu quy trình tùy thuộc vào cơ sở vật chất của từng phòng thí nghiệm[7]. Mặt khác quá trình phân tích sử dụng kháng thể sơ cấp kháng EPO và kháng thể thứ cấp liên hợp HRP (horse radish peroxidase) để phát hiện liên kết miễn dịch bằng phản ứng hóa phát quang. Độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình phụ thuộc vào độ pha loãng của hai loại kháng thể và thời gian ủ cũng như cơ chất sử dụng để phát hiện màng[8]. Tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, nhóm nghiên cứu đã thực hiện triển khai thử nghiệm SDS-PAGE cho phát hiện EPO trên hai loại sinh phẩm điều trị chứa Epoetin alpha. Ngoài ra nhóm nghiên cứu thực hiện tối ưu nồng độ kháng thể sơ cấp đưa vào thử nghiệm Western Blot và sử dụng cơ chất TMB làm cơ chất phát hiện màng thay thế cho phức hợp 3’3-diaminobenzidine-DAB/ Dimethylformamide-DMFA/ Hydroperoxidase (H₂O₂) được sử dụng trong các nghiên cứu trước đây. TMB là chất nền sinh màu, an toàn, dễ dàng sử dụng và ở dạng pha sẵn trong khi phức hợp DAB/DMFA truyền thống là hóa chất độc, thao tác pha phức tạp, hạn sử dụng ngắn được khuyến cáo thay thế bằng TMB từ những năm 2000.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Quy trình nhận dạng Erythropoietin bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western Blot trên sinh phẩm điều trị Epoetin.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: Từ tháng 9 năm 2024 đến tháng 10 năm 2024
- Địa điểm: Phòng thí nghiệm của khoa Kiểm định Sinh phẩm Y tế, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB).

2.3. Vật liệu và hóa chất

- Mẫu chuẩn Erythropoietin for physicochemical tests CRS- Mã Y0001725- Hãng: EQDM- Hàm lượng 100µg Erythropoietin/lọ gồm 2 loại Epoetin alpha và Epoetin beta với tỷ lệ bằng nhau.
- Hóa chất cho thử nghiệm SDS-PAGE: dung dịch 30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 (Serva); buffer 10x Tris/Glycine/SDS (Biorad); dung dịch SDS 10% cho sinh học phân tử (Biorad); Ammonium persulfate cho điện di (M:228,20g/mol-Biobasic); dung dịch buffer gel tách 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 cho PAGE (Biorad); dung dịch buffer gel co 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 (Biorad); thuốc nhuộm Coomassie® Brilliant Blue G (M:854,02g/mol -Biorad); dung dịch glacial acetic acid (Merck); chất trùng hợp polymer N,N',N'- Tetramethyl ethylene-diamine (TEMED) (Biorad); thang chuẩn kích thước 10-250kDa (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged recombinant- Biorad); kháng thể sơ cấp kháng EPO (R&D Biotechne); kháng thể thứ cấp từ chuột gắn HRP (R&D Biotechne).
- Hóa chất cho thử nghiệm Western Blot: màng nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific); dung dịch 10x Tris/Glycine (Biorad); dung dịch 10x Tris Buffered Saline (Biorad); Tween 20 (Sigma); dung dịch cơ chất phát hiện màng TMB (Invitrogen); Glycine (Biorad); Tris hydroxymethyl-lamino methane- Trizbase (Sigma); Sodium chloride (Sigma); HRP Color Development Reagent, DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Biorad); 30% hydrogen peroxide solution (Sigma); N,N-Dimethylformamide (Sigma); HCl 1M/5M; Nước pha tiêm (NICVB); thang chuẩn kích thước 10-250kDa đã nhuộm màu (Precision Plus Protein™ All Blue

Standards- Biorad); Bovine serum Albumin (Sigma).

- Trang thiết bị và vật tư tiêu hao: Máy ủ nhiệt khô (Eppendorf); bể điện di đứng Mini Small II (Hoefer); Máy chuyển màng bán khô- Trans blot Turbo Transfer System (Biorad); Máy ủ phiến (Thermo Fisher); pipet; tuýp nhựa, đầu côn, hộp nhựa...
- Mẫu thử nghiệm: Mẫu chuẩn nhà sản xuất (MRT inhouse) và hoạt chất (API) của sản phẩm Ior®EPOCIM- Trung tâm miễn dịch và phân tử -Cuba- hàm lượng $2,42 \pm 0,16$ mg/ml; sinh phẩm Epokine prefilled injection 2000 Units/0,5ml- CJ Health Care.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm

2.4.1 Tối ưu nồng độ kháng thể sơ cấp bằng kỹ thuật dot blot

Kháng thể thứ nhất được pha loãng theo tỷ lệ 1:500 và 1:800 bằng dung dịch Tris Buffered Saline 1X chứa 1% BSA. Pha loãng kháng thể thứ hai theo tỷ lệ 1:500 bằng 1X TBS/BSA 1%. Chuẩn bị 2 màng nitrocellulose có kích thước 2x2cm, làm khô màng, nhỏ 10µl mẫu chuẩn Erythropoietin lên màng. Để mẫu thấm hoàn toàn cho tới khi màng khô. Khóa màng bằng cách ngâm màng trong dung dịch 1X TBS/BSA 1%, lắc nhẹ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Đổ bỏ dung dịch khóa màng, rửa màng 3 lần bằng dung dịch 1X TBS- 0,1% Tween 20 trong 5 phút. Đổ dung dịch rửa, ủ lắc ngập 2 màng với dung dịch chứa kháng thể thứ nhất ở 2 nồng độ 1:500 và 1:800 trong 1 tiếng ở nhiệt độ phòng. Rửa màng và tiếp tục ủ lắc ngập 2 màng với dung dịch chứa kháng thể thứ hai ở nồng độ 1:500 trong 1 tiếng ở nhiệt độ phòng. Rửa màng và phát hiện protein gắn màng bằng TMB với thể tích TMB cần dùng 0,1ml/cm² diện tích màng. Dùng phản ứng bằng nước cất. Kiểm tra độ sáng của vết protein và màu nền của màng ở hai hiệu giá kháng thể thứ nhất.

2.4.2. Điện di SDS-PAGE.

Biến tính mẫu EPO bằng cách ủ ở 65°C trong 2 giờ. Pha loãng mẫu chuẩn EQDM và mẫu chuẩn nhà sản xuất về hàm lượng 0,5mg/ml và 0,2mg/ml, mẫu thử hoạt chất của Ior®EPOCIM về hàm lượng 0,15mg/ml bằng nước cất pha tiêm. Tiếp tục pha mẫu chuẩn và mẫu thử Ior®EPOCIM theo tỷ lệ 1:1 với buffer Laemli 2X để khối lượng ước tính đưa vào điện di là 10µg. Biến tính mẫu bằng cách ủ ở nhiệt độ 100°C/ 5 phút. Mẫu thử Epokine 2000 có hàm lượng

Erythropoietin khoảng 0,02mg/ml được pha loãng theo tỷ lệ 4:1 bằng buffer 4X về hàm lượng đưa vào giếng điện di là 0,3-0,4 μ g. Biến tính mẫu bằng cách ủ ở nhiệt độ 100°C/ 5 phút. Chuẩn bị 2 bản gel tách acrylamide 12%. Đổ dung dịch điện di vào buồng điện di. Lần lượt nạp vào mỗi giếng của từng bản gel 20 μ l đối với mẫu chuẩn và mẫu hoạt chất của Ior®EPOCIM, 40 μ l đối với mẫu Epokine 2000 và 10 μ l thang chuẩn. Chạy điện di khoảng 30 phút ở 80V cho tới khi mẫu đi hết phần gel co, tiếp tục chạy 1 giờ 30 ở hiệu điện thế 120V cho tới khi dye màu chạm đáy bản gel. Kết thúc quá trình điện di, 1 bản gel đưa vào chuyển màng và 1 bản gel ngâm trong dung dịch nhuộm Coomassie Blue G250 trong 30 phút, tẩy nhuộm cho tới khi nhìn rõ các băng protein. Chụp ảnh và đưa vào phần mềm phân tích.

2.4.3. Chuyển màng, thực hiện Western Blot.

Làm ẩm 2 tấm giấy lọc trong dung dịch buffer chuyển màng Tris/Glycine 1X. Đặt 1 tấm giấy lọc đã làm ẩm vào bản cực dương, làm ẩm màng nitrocellulose trong dung dịch buffer chuyển màng, đặt lên tấm giấy lọc, dùng con lăn để loại bỏ bóng khí. Đặt miếng gel vừa điện di trên trên màng và phủ tấm giấy lọc ẩm lên phía trên. Dùng con lăn loại bỏ bóng khí nhẹ nhàng. Phủ bản cực âm và đặt vào buồng chuyển. Cài đặt hiệu điện thế 25V, 10mA trong 30 phút để tiến hành chuyển màng. Bản gel sau khi chuyển được ngâm trong dung dịch nhuộm Coomassie Blue G250 trong 30 phút để kiểm tra hiệu suất chuyển màng.

Xử lý màng bằng cách ngâm màng trong dung dịch 1X TBS- 1%BSA. Bổ sung kháng thể sơ cấp anti EPO-HRP mAb vào dung dịch 1XTBS-1%BSA theo theo độ pha đã tối ưu ở nhiệt độ phòng, lắc nhẹ trong 1 giờ. Rửa màng 3 lần bằng cách ngâm trong dung dịch 1X TBS-0,1% Tween 20 trong 5 phút. Ngâm ủ màng trong dung dịch 1X TBS-1% BSA, bổ sung kháng thể thứ cấp Anti-mouse IgG-HRP theo tỷ lệ 1:500 trong 1 giờ. Tiếp tục rửa màng, phát hiện màng bằng dung dịch TMB trong 1 đến 3 phút, dùng pipet hút trải đều dung dịch lên màng cho tới khi hiện rõ các băng protein. Rửa màng bằng nước cất để dừng phản ứng. Chụp ảnh và phân tích kết quả.

2.5. Xử lý và phân tích số liệu

Ảnh chụp bản gel được chuyển về định dạng TIFF và đưa vào phần mềm phân tích Image Lab version 6.0.1- Biorad. Xây dựng đồ thị tuyến tính giữa logarit kích thước của thang chuẩn và giá trị di chuyển tương đối (Rf) giữa các băng của thang chuẩn với băng màu (dye front) bằng phần mềm Excel để kiểm tra giá trị của thử nghiệm thông qua giá trị R^2 của đồ thị dựng được.

3. Kết quả

3.1. Kết quả tối ưu hiệu giá kháng thể thứ nhất bằng kỹ thuật dot plot và sử dụng cơ chất TMB phát hiện màng



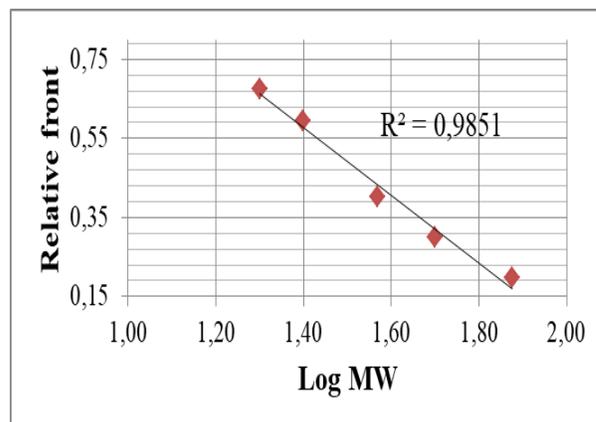
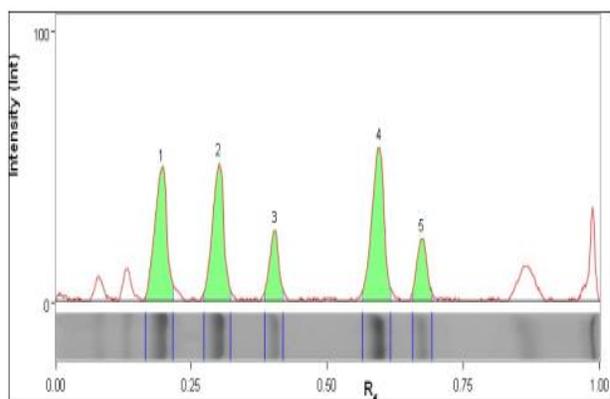
**Hình 1. Kết quả 2 màng nitrocellulose với 2 hiệu giá kháng thể sơ cấp khác nhau:
Bên trái: 1:500; Bên phải: 1:800**

Với hiệu giá kháng thể thứ nhất Anti EPO 1:500 và hiệu giá kháng thể thứ hai anti EPO-HRP mAb là 1:500: màu nền của màng có màu sáng nhạt cho phép hiện rõ vết mẫu màu tím. Với hiệu giá kháng thể thứ nhất là 1:800 và hiệu giá kháng thể thứ hai anti EPO-HRP mAb là 1:500, nền màng tím đậm và vết mẫu bị mờ. Khi sử dụng cơ chất TMB làm cơ chất phát hiện màng, thời gian từ khi ủ đến khi phát hiện được vết protein khoảng 1-3 phút.

3.2. Điện di SDS-PAGE

Phương trình đồ thị giữa trọng lượng phân tử các băng của thang chuẩn với giá trị Rf là

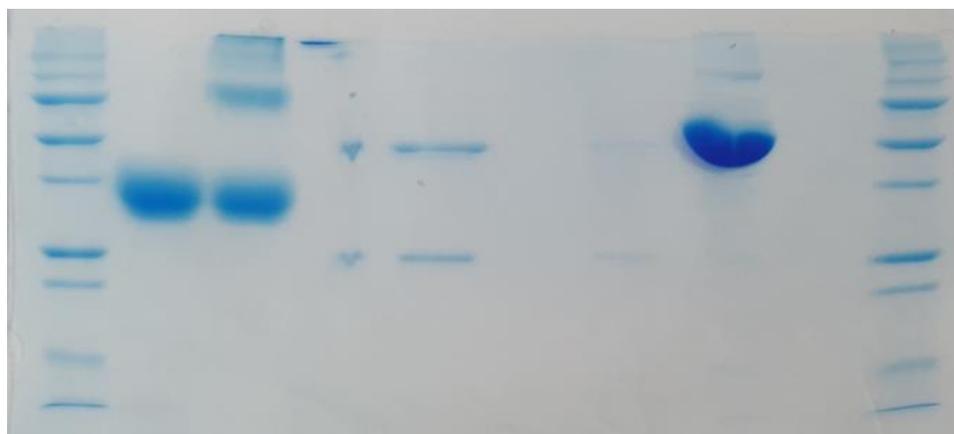
$y = -1,15x + 2,06$ với $R^2 = 0,99$. Từ phương trình đồ thị xác định được mẫu chuẩn EPO và mẫu thử hoạt chất Ior®EPOCIM có kích thước băng chính khoảng 35kDa, mẫu EPOkine 2000 xuất hiện băng Albumin với kích thước 50kDa



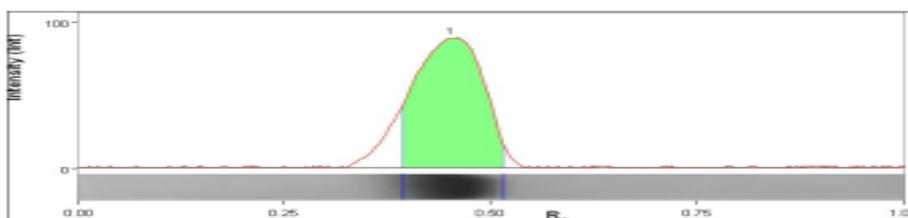
A

B

Hình 2. A: Cường độ sáng của các băng thang chuẩn khi phân tích bằng phần mềm Image Lab-Biorad ; **B:** phương trình đồ thị giữa giá trị Rf và trọng lượng phân tử các băng thang chuẩn.

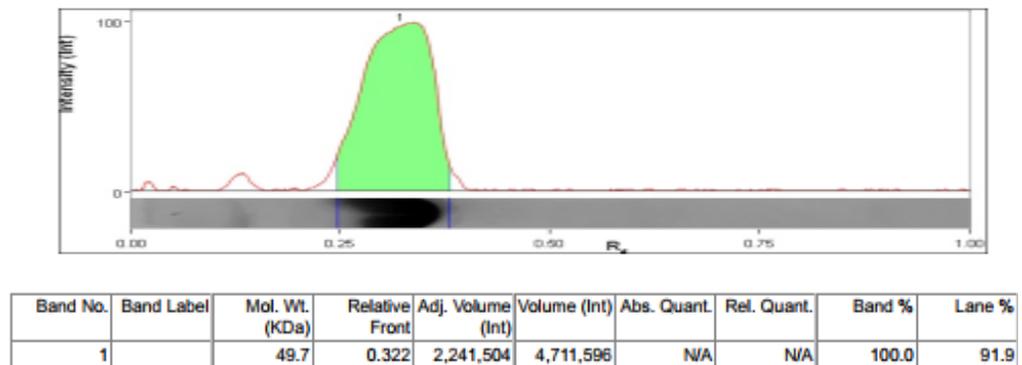


A



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		35.3	0.452	2,036,160	4,176,350	N/A	N/A	100.0	85.2

B



C

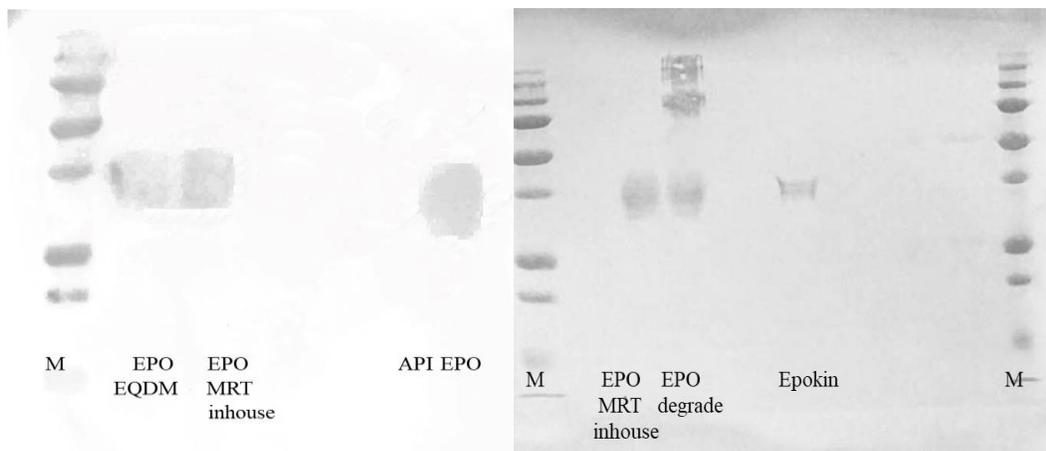
Hình 3. Ảnh phân tích gel

A: Thứ tự giếng trên bản gel: 1- Thang chuẩn; 2- EPO MRT; 3- EPO biến tính; 4- Nimotuzumab; 5- Nimotuzumab reduced; 6- Epokine 2000; 8- Thang chuẩn

B: Phân tích cường độ sáng và trọng lượng phân tử của mẫu chuẩn EPO

C: Phân tích cường độ sáng và trọng lượng phân tử của mẫu thử Epokine 2000

3.3. Nhận dạng bằng Western Blot sử dụng cơ chất phát hiện TMB



Hình 4. Ảnh kết quả Western Blot

Ảnh A: Thứ tự: 1. Thang chuẩn; 2: mẫu chuẩn EPO-EDQM; 3. Mẫu chuẩn inhouse EPO; 4. Hoạt chất API EPO. **Ảnh B:** Thứ tự: 1. Thang chuẩn; 2. Mẫu chuẩn inhouse EPO; 3. Mẫu EPO biến tính; 4. Epokine 2000; 5. Thang chuẩn

Phương trình đồ thị giữa trọng lượng phân tử các băng của thang chuẩn với giá trị Rf là $y = -1,41x + 2,04$ với $R^2 = 0,98$ (hình A) và $y = -1,38x + 2,09$ với $R^2 = 0,98$ (hình B). Từ phương trình đồ thị xác định được mẫu chuẩn EPO-EDQM có kích thước băng chính đặc hiệu khoảng 35 kDa, mẫu chuẩn EPO-MRT inhouse là 35kDa; mẫu API EPO xuất hiện băng chính đặc hiệu với kích

thước 34 kDa. Mẫu EPO biến tính xuất hiện băng chính kích thước 37kDa, 2 băng phụ có kích thước 81,5kDa và 109,4kDa và Epokine 2000 có băng chính đặc hiệu khoảng 38kDa.

4. Bàn luận

Phương pháp điện di SDS-PAGE và Western Blot được sử dụng để nhận dạng cấu trúc và tính toàn vẹn của Erythropoietin trong kiểm định chất lượng và nghiên cứu độ ổn định của sinh phẩm. Thông qua hình ảnh gel điện di, phân biệt được các dòng sản phẩm khác nhau dựa vào kích thước phân tử và số lượng các băng trong khi kỹ thuật immunoblot cho phép phát hiện đặc hiệu hoạt chất có trong sinh phẩm. Sản phẩm Epokine 2000 Unit epoetin alpha sau quá trình điện di SDS-PAGE xuất hiện băng chính có kích thước xấp xỉ 50kDa, kích thước của băng chính này tương đương với kích thước phân tử albumin. Albumin là chất mang Erythropoietin thường được sử dụng trong các dòng sản phẩm chứa epoetin (Hình 3)[6]. Tuy nhiên giới hạn phát hiện của phương pháp nhuộm Coomassie là 1-10 μ g protein trên một giếng chạy trong khi hàm lượng epoetin alpha trong sản phẩm Epokine 2000 khi đưa vào khoảng 0,3-0,5 μ g trên một giếng chạy (Theo hệ số quy đổi của mẫu chuẩn quốc tế NIBSC lần 3 cho EPO-1650 đơn vị quốc tế tương đương với 11 μ g EPO tái tổ hợp)[2,9]. Vì thế không thể quan sát bằng mắt thường hình ảnh băng của erythropoietin trong sinh phẩm Epokine 2000 giống như mẫu chuẩn EDQM trên gel polyacrylamide. Do đó chỉ có thể nhận dạng EPO trong sinh phẩm Epokine 2000 bằng phương pháp Western Blot.

Độ dày của băng mẫu chuẩn inhouse Erythropoietin lớn hơn độ dày băng của kháng thể đơn dòng nimotuzumab cho thấy cấu trúc phân tử Erythropoietin gồm nhiều đồng phân hình học có kích thước xấp xỉ nhau. Điều này trùng khớp với nghiên cứu của Ren TJ năm 2020 cho thấy Erythropoietin thường bao gồm khoảng 8 đồng phân hình học trong khi kháng thể đơn dòng chỉ có khoảng 2-3 đồng phân hình học [10]. Đối với mẫu EPO biến tính xuất hiện các băng phụ với kích thước 106,7kDa và 71,1kDa và băng chính mờ cho thấy mẫu bị giảm hoạt tính và thay đổi cấu trúc khi ủ ở nhiệt độ 65°C trong 2 giờ.

Quy trình của nhóm nghiên cứu sử dụng cơ chất TMB làm cơ chất phát hiện màng so sánh với một số nghiên cứu trước đây sử dụng DAB. TMB là sản phẩm thương mại ở dạng dung dịch pha sẵn và sử dụng ngay trong khi DAB phải pha trong dung dịch có chứa DMFA và 30% hydroperoxide. DAB có tính gây độc tế bào, giá thành đắt đỏ, phức hợp sau khi pha không bền

chỉ bảo quản được trong 4 tuần theo nghiên cứu của Brand JA [11]. Do đó, quy trình nhận dạng Erythropoietin trong sản phẩm công nghệ cao sinh học do Khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế xây dựng mang tính thực tiễn và ứng dụng cao trong kiểm định chất lượng.

5. Kết luận và khuyến nghị

Kỹ thuật SDS-PAGE và Western Blot cho nhận dạng Erythropoietin trong sản phẩm sinh học công nghệ cao, được tối ưu với các thiết bị và hóa chất hiện có tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. Quy trình có ý nghĩa thực tiễn cao và có thể áp dụng không chỉ cho nhận dạng và phân tích sản phẩm điều trị có thành phần erythropoietin nói riêng, mà còn ứng dụng trong kiểm định chất lượng sinh phẩm có thành phần hoạt chất là protein nói chung.

Tài liệu tham khảo

- [1] Jelkmann W. Erythropoietin. *Front Horm Res.* 2016;47:115-27.
- [2] European Pharmacopeia phiên bản 11.0
- [3] World Health Organization. Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies as similar biotherapeutic products (SBPs). 2017.
- [4] Kato T. Handbook of Hormones. Yoshio Takei HAaKT, editor: Academic Press; 2016. 316-e35A-3 p.
- [5] Schoener B, Borger J. Erythropoietin Stimulating Agents. StatPearls. Treasure Island (FL)2024.
- [6] The Ministry of Health Law, Japan. The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth edition, 2016.
- [7] Voss SC, Orié NN, El-Saftawy W, Saghbazarian S, Al-Kaabi A, Georgakopoulos C, et al. Horseradish-peroxidase-conjugated anti-Erythropoietin antibodies for direct recombinant human Erythropoietin detection: Proof of concept. *Drug Test Anal.* 2021;13(3):529-38.
- [8] Ni D, Xu P, Gallagher S. Immunoblotting and Immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol.* 2016;114:10 8 1- 8 37.
- [9] World Health Organization ECOBS. WHO International Collaborative Study of the proposed 3rd International Standard for Erythropoietin, recombinant, for bioassay.; 2012. Report No.: WHO/BS/2012.2195.

- [10] Ren TJ, Zhang XX, Li X, Chen HX. Isoforms analysis of recombinant human Erythropoietin by polarity-reversed capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*. 2020 Dec;41(23):2055-2061. doi: 10.1002/elps.202000165. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32841408.
- [11] Brand JA, Tsang VC, Zhou W, Shukla SB. Comparison of particulate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and 3,3'-diaminobenzidine as chromogenic substrates for immunoblot. *Biotechniques*. 1990 Jan;8(1):58-60. PMID: 2322454.