

## NGHIÊN CỨU CỐ ĐỊNH KHÁNG THỂ HCG TRÊN ĐỂ POLYSTYRENE SỬ DỤNG TRONG PHÂN TÍCH BETA-HCG

Tạ Văn Thao<sup>1</sup>, Trần Hải Yến<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Quỳnh<sup>3</sup>,  
Phạm Trường Long<sup>4</sup>, Nguyễn Trường Chung<sup>5</sup>, Mai Xuân Dũng<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, <sup>2</sup>Trường PTTH Ứng Hòa A,  
<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Hà Nội, <sup>4</sup>Đại học Cần Thơ,  
<sup>5</sup>Bệnh viện Đa khoa Xanh Pôn, <sup>6</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

### TÓM TẮT

Phân tích nồng độ beta-hCG có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán và sàng lọc sơ sinh. Trong nghiên cứu này chúng tôi tối ưu hóa các điều kiện định kháng thể hCG lên đế polystyrene (PS) bằng phương pháp hấp phụ để sử dụng phân tích beta-hCG bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang. Sử dụng kết hợp kháng thể hCG đánh dấu với Eu(III) và dung dịch tăng cường tín hiệu huỳnh quang chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện hấp phụ tối ưu là nồng độ dung dịch là 2,5µg/L, thời gian hấp phụ là 24 giờ. Hoạt tính của kháng thể hCG cố định trên đế PS thay đổi không đáng kể khi lưu giữ ở 4°C trong 3 tuần. Quy trình phân tích sử dụng đế PS cố định hCG có độ chọn lọc đặc hiệu với beta-hCG, có độ lệch trung bình -2,1% so với Kit phân tích chuẩn, có giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn phân tích (LOQ) lần lượt là 11,9 và 17,9 ng/ml. Kết quả này cho phép sử dụng quy trình phân tích tự xây dựng dựa trên đế PS cố định hCG để phân tích beta-hCG với độ chính xác cao, chi phí thấp với công nghệ hoàn toàn chủ động.

**Từ khóa:** Phân tích, beta-hCG, cố định kháng thể, miễn dịch huỳnh quang, hấp phụ.

*Ngày nhận bài: 30/9/2019; Ngày hoàn thiện: 05/11/2019; Ngày đăng: 07/11/2019*

## A STUDY TO ANCHOR HCG ON POLYSTYRENE FOR IMMUNOANALYSIS OF BETA-HCG

Van-Thao Ta<sup>1</sup>, Hai-Yen Tran<sup>1,2</sup>, Quynh Nguyen Thi<sup>3</sup>,  
Truong Long Pham<sup>4</sup>, Truong Chung Nguyen<sup>5</sup>, Xuan-Dung Mai<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Hanoi University of Education, <sup>2</sup>Ung Hoa A high school,  
<sup>3</sup>VNU University of Science, <sup>4</sup>College of Natural Science - Can Tho University,  
<sup>5</sup>St. Paul Hospital, <sup>6</sup>Hanoi Pedagogical University 2

### ABSTRACT

Measurements of beta form of human chorionic gonadotropin (hCG) provide important information in a variety of clinical situations and prenatal screening. In this study, we optimized conditions to absorb hCG antibody onto polystyrene (PS) substrates for immunofluorescence analysis of hCG. The conditions were monitored by evaluating the photoluminescent (PL) intensity obtained upon using Eu(III) labelled hCG antibody and PL enhancement solution. The optimized concentration of hCG antibody in the absorbent solution was found to be 2.5µg/L and the absorption time was 24 hours. The reactivity of the absorbed hCG antibody decreased negligibly after three weeks of storing at 4°C. The immunofluorescence procedure based on the hCG/PS substrates was highly selective to beta-hCG, giving good analytical results when compared with standard Kit. Lower limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LOQ) of the analytical procedure were estimated to be 11.9 and 17.9 ng/ml, respectively. The results demonstrated in this paper provide a cost-effective and precise method for quantification of beta-hCG based on hCG antibody absorbed on PS substrates.

**Keywords:** Analytical method, beta-hCG, hCG antibody anchoring, immunofluorescence, absorption.

*Received: 30/9/2019; Revised: 05/11/2019; Published: 07/11/2019*

\* Corresponding author. Email: xdmai@hpu2.edu.vn

## 1. Giới thiệu

hCG (human chorionic gonadotropin) là sialoglycoprotein với trọng lượng phân tử khoảng 46.000 dalton, gồm hai tiểu đơn vị là Alpha ( $\alpha$ ) và Beta ( $\beta$ ).  $\alpha$ -hCG là một glycopeptide có 92 amino acid có trình tự trùng với các kích thích tố tuyến yên glycoprotein, luteinizing, kích thích tố nang trứng và kích thích tố hormone tuyến giáp [1].  $\beta$ -hCG có 145 amino acid có trình tự đặc trưng chỉ tìm thấy ở hCG [2]. hCG sinh ra từ trophoblast, là hormone mang thai quan trọng giúp quá trình dung nạp thai nhi thành công bằng cách tăng cường Tregs (T regulatory cell recruitment) đến bề mặt phân cách giữa bào thai và bà mẹ [3]. Ngoài ra, hCG còn tác động đến nhiều loại tế bào liên quan đến quá trình mang thai như: giảm sự sinh sôi và chức năng kháng nguyên của tế bào tua (dendritic cells), giảm hoạt tính của tế bào NK gây độc máu ngoại vi, tăng cường sự sinh sôi của tế bào NK sản xuất cytokine từ cung và tế bào nội mạc [4].

Việc phân tích nồng độ hCG trong huyết thanh cũng như trong nước tiểu cung cấp thông tin quan trọng cho nhiều trường hợp chuẩn đoán như sàng lọc và theo dõi thai, rối loạn thai kỳ, sàng lọc trước sinh và ung thư phụ khoa [5]. Tuy nhiên, xuất phát từ sự chuyển hóa phức tạp, hCG có thể tồn tại trong huyết thanh ở nhiều dạng cấu trúc khác nhau [6] làm cho việc phân tích nồng độ hCG với độ chính xác cao, trong khoảng nồng độ rộng, vẫn đang là vấn đề được quan tâm cải tiến [7,8]. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang được sử dụng khá phổ biến để phân tích hCG do có nhiều ưu điểm như thời gian phân tích ngắn, khoảng phân tích rộng, cường độ tín hiệu lớn, tín hiệu ít bị nhiễu bởi sự phát xạ của nền [9]. Trong phương pháp này, kháng thể hCG được cố định trên bề mặt để trong khi phần còn lại của cặp kháng thể hCG được đánh dấu với chất huỳnh quang. Cố định kháng thể hCG lên bề mặt để bằng hấp phụ vật lý đảm bảo được độ chọn lọc cao theo cơ

chế miễn dịch do hoạt tính của hCG được duy trì như trạng thái tự do trong pha lỏng. Tuy vậy, quá trình hấp phụ vật lý của hCG hay các protein nói chung trên bề mặt để cứng như polystyrene (PS) phụ thuộc vào nhiều yếu tố thực nghiệm như độ phân cực và điện tích bề mặt PS, sự hấp phụ cạnh tranh, nồng độ, nhiệt độ và thời gian [10].

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu tối ưu hóa phương pháp cố định kháng thể hCG trên bề mặt polystyrene (PS) để phân tích hCG bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang.

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Nguyên vật liệu

Đĩa 96 giếng polystyrene (PS) tiêu chuẩn, PBS (phosphate buffer saline), sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), BSA (Bovine Serum Albumin), kháng thể (antibody) và kháng nguyên (antigen) hCG được mua từ ThermoFisher. Dung dịch đánh dấu kháng thể hCG có chứa 300 nmol phức chất của 1-(4-isothiocyanatobenzyl) diethylenetriamine-N,N',N'',N'''-pentaacetic acid (DTTA) và Eu(III); DELFIA<sup>®</sup> Enhancement Solution có chứa phối tử 2-naphthoylethyltrifluoroacetone (NTA), chất hỗ trợ phân lập triethylphosphine oxide (TOPO), chất hoạt động bề mặt Triton X-100 và acetic acid để tạo môi trường acid (pH= 3,2) được mua từ PerkinElmer.

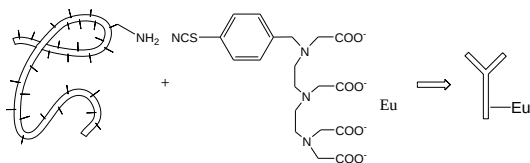
### 2.2. Cố định hCG lên trên bề mặt PS

Pha loãng dung dịch hCG gốc, có nồng độ gốc là 4750  $\mu\text{g/mL}$ , bằng hỗn hợp dung dịch gồm dung dịch đệm PBS nồng độ 0,01M và  $\text{NaN}_3$  nồng độ 5% với tỷ lệ thể tích 90:1 để thu được các dung dịch hCG có nồng độ khác nhau. Lấy 0,2 ml dung dịch này cho vào 1 giếng PS và ủ ở 20°C trong 20h trước khi rửa hai lần với dung dịch PBS 0.01M để loại bỏ hCG bám dính kém trên bề mặt. Sau đó thêm 0.3 ml dung dịch BSA 1% pha trong đệm PBS 0,01M và ủ tiếp 2h ở 4°C để ghim hCG trên bề mặt PS.

### 2.3. Đánh dấu kháng thể hCG với Eu (III)

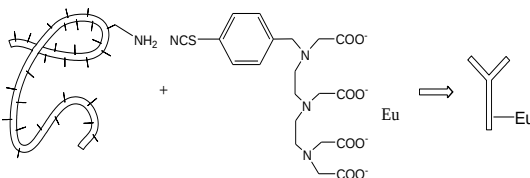
Pha loãng dung dịch kháng thể hCG gốc bằng đệm carbonate (pH= 9,5) để thu được dung

dịch có nồng độ 4 mg/ml. Lấy 250  $\mu$ L dung dịch hCG này cho vào 1 vial chứa dung dịch đánh dấu Eu-DTAA và ủ ở 4°C qua đêm. Làm sạch hCG đã đánh dấu với Eu (ký hiệu hCG-DTAA-Eu) khỏi phức Eu-DTAA bằng phương pháp lọc gel sử dụng cột Superdex 200 (Pharmacia) với pha động là dung dịch đệm Tris-HCl (pH= 7,8) có chứa 0,9% NaCl và 0,05% NaN<sub>3</sub>. Quá trình đánh dấu hCG được biểu diễn như sau:



#### 2.4. Xây dựng đường chuẩn

Pha các dung dịch kháng nguyên hCG có nồng độ là: 10,6; 106; 1030; 5180 và 10100 ng/ml từ dung dịch gốc ban đầu bằng đệm PBS 0,01M. Thêm lần lượt 25  $\mu$ L dung dịch kháng nguyên hCG và 0,2 ml đệm PBS 0,01 M vào giếng PS đã cố định kháng thể hCG rồi tiến hành ủ trong 1h ở 25°C. Rửa giếng với dung dịch PBS 0,01M để loại bỏ kháng nguyên hCG chưa phản ứng với kháng thể hCG cố định. Thêm vào mỗi giếng 200  $\mu$ L dung dịch hCG-DTTA-Eu nồng độ 0,4  $\mu$ g/ml rồi ủ mẫu trong 30 phút ở nhiệt độ phòng kết hợp với lắc nhẹ. Rửa sạch giếng với dung dịch PBS 0,01M để loại bỏ hCG-DTTA-Eu không phản ứng. Sau đó, thêm 200  $\mu$ L dung dịch tăng cường tín hiệu huỳnh quang (dung dịch chứa phối tử NTA, xem phần 2,1 ở trên) và lắc nhẹ trong 5 phút. Quá trình này tạo thành phức chất mới của Eu với NTA và TOPO như sau:



Do cặp kháng thể hCG (một cố định trên đế PS và một đánh dấu với Eu) liên kết kiểu “bánh kẹp” với kháng nguyên hCG nên nồng độ của kháng nguyên hCG sẽ bằng nồng độ

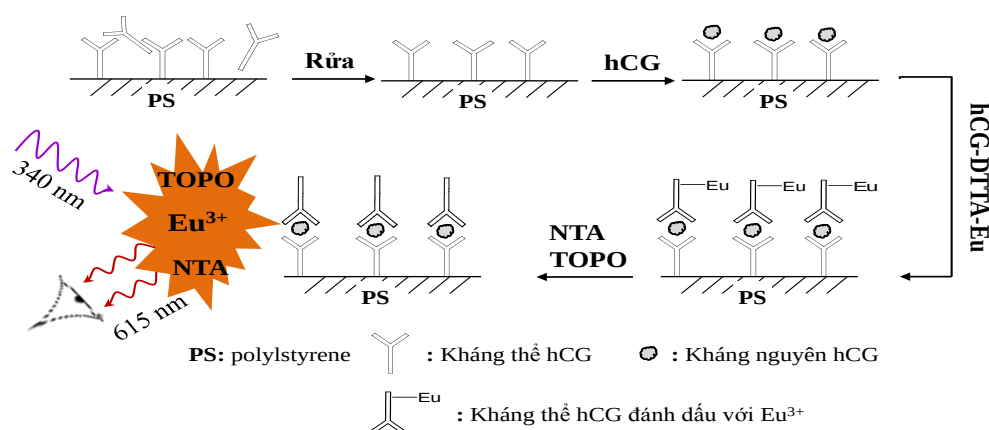
của phức (NTA)<sub>3</sub>-Eu-(TOPO)<sub>3</sub>. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên nồng độ chuẩn của kháng nguyên hCG ban đầu và cường độ huỳnh quang của phức (NTA)<sub>3</sub>-Eu-(TOPO)<sub>3</sub> thu được ở bước sóng 615 nm, khi kích thích ở 340 nm.

#### 3.5. Phương pháp nghiên cứu

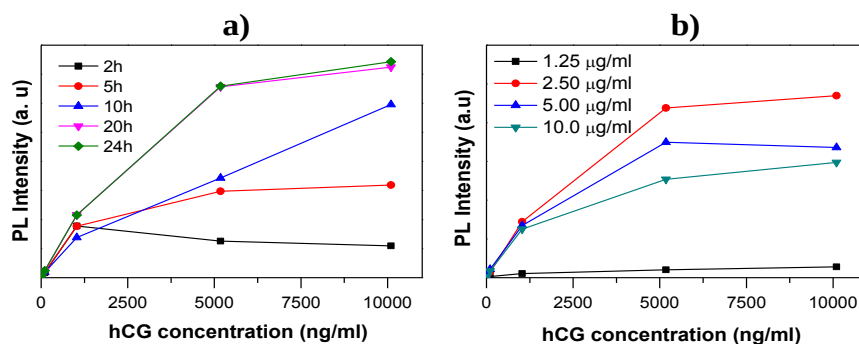
Cường độ tín hiệu huỳnh quang được đo trên máy huỳnh quang Victor2 Fluorometer (PerkinElmer). Phương trình đường chuẩn sự phụ thuộc của cường độ huỳnh quang vào nồng độ kháng nguyên hCG xây dựng dựa trên data fitting trên phần mềm Origin 8 Pro.

#### 3. Kết quả và thảo luận

Phân tích hCG bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang được vẽ tắt trên sơ đồ hình 1. Ban đầu kháng thể hCG được cố định trên bề mặt đế PS bằng phương pháp hấp phụ vật lý. Thời gian ủ và nồng độ hCG ban đầu quyết định đến chất lượng của đơn lớp hCG trên bề mặt PS. Khi cho mẫu kháng nguyên hCG cần phân tích và hCG-DTTA-Eu vào giếng chứa kháng thể hCG cố định trên bề mặt PS, quá trình bắt cặp theo cơ chế “bánh kẹp” xảy ra đặc hiệu với kháng nguyên hCG [11]. Do đó, nồng độ kháng nguyên hCG cần phân tích tỷ lệ với mật độ Eu<sup>3+</sup> có trên bề mặt. Tuy nhiên, do cường độ huỳnh quang của phức chất giữa Eu<sup>3+</sup> và DTTA khá thấp nên cần sử dụng dung dịch tăng cường độ huỳnh quang [12]. Cơ chế hóa học của quá trình này là phản ứng trao đổi phối tử từ DTTA sang NTA ở pH acid (xem phản ứng phần 2.4). Ngoài ra, TOPO vừa là phối tử tương hỗ vừa làm cho phức chất trở nên kỵ nước, ngăn cản ảnh hưởng dập tắt huỳnh quang của các phân tử nước với Eu<sup>3+</sup> [13]. Chất hoạt động bề mặt X-100 giúp cho phức NTA-Eu-TOPO phân tán tốt trong nước. Do phản ứng trao đổi phối tử xảy ra hoàn toàn, nên dựa vào cường độ huỳnh quang của phức NTA-Eu-TOPO ở 615 nm, thu được khi kích thích ở 340 nm, có thể phân tích được nồng độ của kháng nguyên hCG ban đầu.



**Hình 1.** Sơ đồ quy trình phân tích nồng độ kháng nguyên hCG bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang

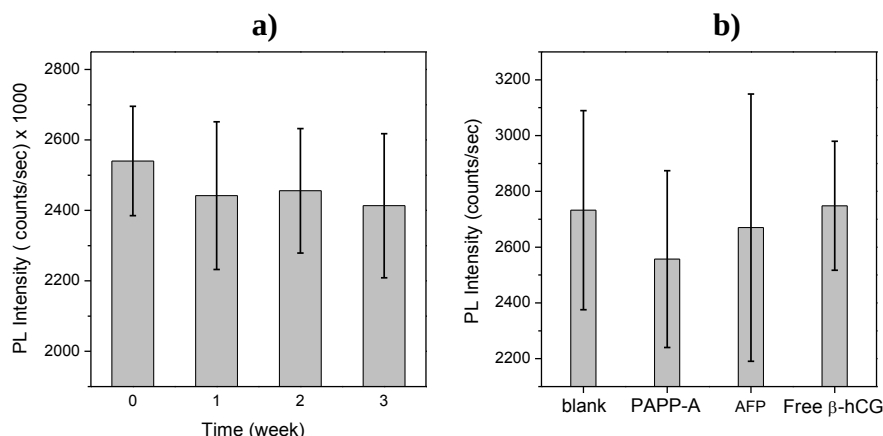


**Hình 2.** Ảnh hưởng của cường độ huỳnh quang theo nồng độ kháng nguyên hCG ở các điều kiện cố định kháng thể hCG khác nhau: a) thời gian ủ mẫu và b) nồng độ kháng thể hCG trong dung dịch hấp phụ.

Nồng độ kháng thể hCG trong a) là 2,50 µg/ml; thời gian ủ mẫu trong b) là 24h

Để tìm điều kiện tối ưu cho quá trình cố định kháng thể hCG trên bề mặt giếng PS, chúng tôi thay đổi nồng độ hCG trong dung dịch hấp phụ ban đầu và thay đổi thời gian lưu rồi tiến hành đo huỳnh quang với các nồng độ kháng nguyên hCG chuẩn. Hình 2 là kết quả sự phụ thuộc của cường độ huỳnh quang theo nồng độ kháng nguyên hCG ở các điều kiện cố định kháng thể hCG khác nhau. Có thể thấy trên hình 2a, ở thời gian ủ ngắn, như 2h, cường độ huỳnh quang không biến đổi tuyến tính theo nồng độ của kháng nguyên hCG. Điều này là do mật độ kháng thể hCG cố định trên bề mặt PS không ổn định từ mẫu này sang mẫu khác ở thời gian ủ ngắn. Khi tăng thời gian ủ mẫu, mật độ kháng thể hCG cố định được trên bề mặt PS tăng dần, thể hiện bởi cường độ huỳnh quang tăng, và đạt giá trị bão hòa sau thời gian 20h. Do đó, chúng tôi lựa chọn thời gian ủ mẫu là 24h cho tất cả các thí nghiệm tiếp

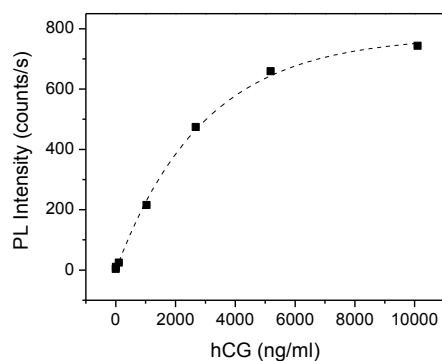
theo. Hình 2b thể hiện sự phụ thuộc của cường độ huỳnh quang theo nồng độ kháng nguyên hCG khi thay đổi nồng độ của kháng thể hCG trong dung dịch hấp phụ và giữ nguyên thời gian ủ mẫu là 24h. Có thể thấy rằng, ở tất cả các nồng độ kháng thể hCG khảo sát, cường độ huỳnh quang tăng tuyến tính theo nồng độ kháng nguyên hCG. Kết quả này phù hợp với kết luận về sự hấp phụ bão hòa của kháng thể hCG trên bề mặt PS ở thời gian 24h trên hình 2a. Cường độ huỳnh quang đạt cực đại trên khoảng nồng độ kháng nguyên hCG khảo sát khi nồng độ kháng thể trong dung dịch hấp phụ là 2,50 µg/ml. Có thể ở nồng độ hCG cao hơn đã dẫn tới sự hấp phụ đa lớp xếp chồng lên nhau làm giảm mật độ của các vị trí hoạt động, vị trí sẽ bắt cặp với kháng nguyên hCG, trên bề mặt. Từ kết quả hình 2b, chúng tôi đi đến kết luận nồng độ hấp phụ tối ưu của kháng thể hCG là 2,50 µg/ml.



**Hình 3.** a) Ảnh hưởng của thời gian lưu đến cường độ huỳnh quang đo trên mẫu kháng nguyên hCG chuẩn. b) Cường độ huỳnh quang khi thực hiện quy trình phân tích trên mẫu trắng (blank) và trên một số loại protein khác nhau như PAPP-A, AFP, và β-hCG tự do

Để đánh giá độ bền của lớp kháng thể hCG cố định trên bề mặt PS, chúng tôi lưu mẫu ở 4°C trong túi nylon kín. Sau các khoảng thời gian lưu khác nhau, để PS có hCG cố định được sử dụng để tiến hành đo cường độ huỳnh quang với mẫu kháng nguyên hCG chuẩn có nồng độ 1030 ng/ml. Kết quả đo cường độ huỳnh quang trên 10 đế PS khác nhau được trình bày trên hình 3a. Có thể thấy, cường độ huỳnh quang trung bình giảm dần, giảm khoảng 5% sau 3 tuần lưu giữ. Giá trị này tương đương với độ lệch của cường độ huỳnh quang trong cùng một thời gian lưu chứng tỏ hoạt tính của kháng thể hCG được duy trì khá tốt trên đế PS khi lưu giữ ở 4°C trong túi nylon kín.

Để đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp phân tích dựa vào đế PS gắn kháng thể hCG, chúng tôi tiến hành phép phân tích lặp lại sử dụng một số loại protein khác nhau như PAPP-A, AFP và β-hCG tự do để thay thế kháng nguyên hCG. Cường độ huỳnh quang được so sánh trên hình 3b trong so sánh với mẫu trắng (blank). Kết quả cho thấy, cường độ huỳnh quang thu được khi phân tích các mẫu protein chỉ tương đương với mẫu trắng, hay tương đương với 1% cường độ tín hiệu thu được khi phân tích hCG (xem hình 3a). Điều này chứng tỏ kháng thể hCG cố định trên đế PS bắt cặp đặc hiệu với kháng nguyên hCG.



**Hình 4.** Đường chuẩn sự phụ thuộc của cường độ huỳnh quang vào nồng độ hCG.

Hình 4 trình bày cường độ huỳnh quang theo nồng độ hCG và đường chuẩn. Phương trình đường chuẩn được xác định bằng phương pháp tối ưu hóa cường độ tín hiệu huỳnh quang ( $y$ ) theo nồng độ ( $x$ ) theo phương trình:

$$y = y_0 - Ae^{-x/t};$$

trong đó  $y_0$  là cường độ huỳnh quang cực đại;  $t$  là nồng độ phân rã và  $A$  là thừa số trước hàm mũ. Các giá trị này được xác định bằng data fitting có trong phần mềm OriginPro 8 SR4. Để đánh giá độ tin cậy của phương pháp, chúng tôi đã tiến hành phân tích ngẫu nhiên các mẫu hCG và so sánh đối chứng với kết quả được phân tích theo quy trình chuẩn; kết quả được tổng hợp trong bảng 1. Có thể thấy rằng kết quả phân tích kháng nguyên hCG bằng phương pháp xây

dùng trong nghiên cứu có độ tin cậy khá tốt, với sai lệch trung bình so với phương pháp phân tích chuẩn khoảng -2,1%. Sử dụng số liệu về tín hiệu huỳnh quang xác định trên mẫu trắng (hình 4b) và phương trình đường chuẩn (hình 5) giá trị giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn phân tích định lượng (LOQ) được xác định theo tài liệu [14] tương ứng là 11,9 ng/ml và 17,9 ng/ml. Kết quả này tốt hơn so với phương pháp phân tích miễn dịch huỳnh quang sử dụng hạt nano từ trong nghiên cứu [15].

**Bảng 1.** So sánh kết quả phân tích hCG mẫu thực

| Mẫu        | TN<br>(ng/ml) | ĐC<br>(ng/ml) | %<br>sai khác | Mẫu        | TN<br>(ng/ml) | ĐC<br>(ng/ml) | %<br>sai khác |
|------------|---------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|
| HN01250419 | 810           | 870           | -6,9          | ND01270419 | 2437          | 2660          | -8,4          |
| HN02250419 | 4460          | 4473          | -0,3          | HN02270419 | 1787          | 1899          | -5,9          |
| HN03250419 | 1957          | 2107          | -7,1          | HN01050519 | 2513          | 2613          | -3,8          |
| HD04250419 | 510           | 477           | 7,0           | HP02050519 | 2847          | 2633          | 8,1           |
| HN05250419 | 4697          | 4400          | 6,7           | HB03050519 | 1153          | 1192          | -3,3          |
| HN06250419 | 1220          | 1300          | -6,2          | HN01110519 | 803           | 790           | 1,7           |
| HY01260419 | 1767          | 1907          | -7,3          | HN02110519 | 3207          | 3346          | -4,2          |
| HN02260419 | 1463          | 1600          | -8,5          | HN02110519 | 3475          | 3450          | 0,7           |
| HN03260419 | 2380          | 2443          | -2,6          | HN03110519 | 2850          | 2787          | 2,3           |
| VP04260419 | 1487          | 1457          | 2,1           | HN04110519 | 1773          | 1847          | -4,0          |

TN: Kết quả phân tích hCG theo quy trình thực nghiệm sử dụng để PS cố định kháng thể hCG; ĐC: Kết quả phân tích hCG sử dụng KIT phân tích chuẩn.

#### 4. Kết luận

Trong bài báo này, chúng tôi đã nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện cố định kháng thể hCG lên bề mặt để PS để sử dụng cho phân tích hCG theo cơ chế miễn dịch huỳnh quang. Điều kiện xác định được là nồng độ dung dịch hấp phụ là 2,5µg/L, thời gian hấp phụ là 24 giờ. hCG vẫn giữ được hoạt tính trên để PS trong khoảng thời gian từ 1 đến 3 tuần khi được bọc kín và lưu giữ ở 4°C. Quy trình phân tích miễn dịch huỳnh quang sử dụng để PS gắn kháng thể hCG có độ chọn lọc đặc hiệu với kháng nguyên hCG; có giới hạn phát hiện và giới hạn phân tích. Kết quả phân tích hCG trên mẫu thực tế cho độ sai lệch trung bình -2,1% so với quy trình chuẩn.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí đề tài cấp Bộ, kinh phí KHCN của Trường ĐHTN Hà Nội 2 cho đề tài mã số: B.2018-SP2-13. Cảm ơn công ty ChemedicVN đã tài trợ chi phí phân tích các mẫu hCG đối sánh.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Glycoprotein hormones alpha chain precursor - Homo sapiens. UniProt accession number P01215. UniProt Consortium.
- [2]. Choriongonadotropin subunit beta 3 - Homo sapiens. UniProt accession number P01233. UniProt Consortium.
- [3]. D. Lachlan Hay, "Placental histology and the production of human choriongonadotrophin and its subunits in pregnancy", *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, T.95, tr.1268-1275, 1988.
- [4]. A. Schumacher, K. Heinze, J. Witte, E. Poloski, N. Linzke, K. Woidacki, A. C. Zenclussen, "Human chorionic Gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance", *The Journal of Immunology*, T.190, pp. 2650-2658, 2013.
- [5]. A. S. Bansal, S. A. Bora, S. Saso, J. R. Smith, M. R. Johnson, M-Y. Thum, "Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy", *Expert Review of Clinical Immunology*, T.8, S.8, pp. 747-753, 2012.
- [6]. U-H. Stenman, A. Tiitinen, H. Alfthan, L. Valmu, "The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG", *Human reproduction update*, T.12, pp.769-784, 2006.
- [7]. Laurence A. Cole, "Antibodies and hCG tests", in *Human Chorionic Gonadotropin (hCG)*, Elsevier, second edition, 2015, pp. 313-320.

- [8]. Laurence A. Cole, "Problems with today's hCG pregnancy tests", in *Human Chorionic Gonadotropin (hCG)*, Elsevier, second edition, 2015, pp. 323-334.
- [9]. Luigi Cinquanta, Desré E. Fontana, Nicola Bizzaro, "Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?", *Autoimmun Highlights*, T.8, tr9, 2017.
- [10]. Weiping Qian, Danfeng Yao, Fang Yu, Bin Xu, Rong Zhou, Xiang Bao, Zuhong Lu, "Immobilization of Antibodies on Ultraflat Polystyrene Surfaces", *Clinical Chemistry*, T.46,S.9, pp.1456-1463, 2000.
- [11]. K. R. Blomberg, V-M. Mikkala, H. H. O. Hakala, P. H. Makinen, M. U. Suonpaa, I. A. Hemmila, "A dissociative fluorescence enhancement technique for one-step time-resolved immunoassays", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, T.399, pp. 1677-1682, 2011.
- [12]. T. K. Christopoulos, E. P. Diamandis, "Fluorescence immunoassays", in *Immunoassay*, Academic Press, pp. 309-335, 1996.
- [13]. M. Hogmander, C. J. Paul, S. C. Elina, H. V. Eskonen, T. Pahikkala, S. Pihlasalo, "Luminometric label array for counting and differentiation of bacteria", *Analytical Chemistry*, T.89, S.5, pp. 3208-3216, 2017.
- [14]. A. Shrivastava, V. B. Gupta, "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods", *Chronicles of Young Scientists*, T.2, S.1, pp.21-25, 2011.
- [15]. Ng. T. B. Việt, T. V. Thảo, Ng. B. Ngân, Ng. V. Minh, "Nghiên cứu ứng dụng nano từ trong phân tích beta-hCG", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, T.50, tr. 96-99, 2019.