

BỘ Y TẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI CẤP BỘ

**THIẾT KẾ VECTOR MANG GEN MÃ HÓA
TỔNG HỢP YẾU TỐ ĐÔNG MÁU VIII
TÁI TỔ HỢP**

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. TẠ THÀNH VĂN

7465
28/7/2009

HÀ NỘI – 2009

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hemophilia (còn gọi là bệnh ưa chảy máu) là một bệnh di truyền do thiếu hụt hay bất thường chức năng của các yếu tố đông máu như các yếu tố VIII, IX hay XI. Trong đó sự thiếu hụt yếu tố VIII là thường gặp nhất trong bệnh hemophilia. Mức độ biểu hiện bệnh trên lâm sàng liên quan trực tiếp đến nồng độ của yếu tố VIII trong huyết tương. Hemophilia thể nhẹ khi nồng độ yếu tố VIII trong huyết tương khoảng từ 6-30% so với người bình thường, ở thể này chảy máu thường xảy ra sau chấn thương hoặc sau phẫu thuật. Thể trung bình khi nồng độ của yếu tố VIII trong huyết tương từ 1-5%. Và thể bệnh nặng khi nồng độ của yếu tố VIII trong huyết tương dưới 1%. Ở thể nặng, chảy máu có thể xảy ra tự phát hoặc sau những sang chấn nhẹ, nhất là ở khớp và cơ, trung bình mỗi năm chảy máu 20-30 lần, nhưng cũng có thể nhiều hơn.

Việc chẩn đoán chính xác và điều trị sớm căn bệnh này có một ý nghĩa quan trọng nhằm hạn chế tối đa tình trạng chảy máu cũng như giảm thiểu khả năng trở thành tàn tật. Điều trị hemophilia bao gồm mấy nguyên tắc sau: điều trị chảy máu, điều trị dự phòng và phục hồi chức năng, trong đó việc sử dụng các chế phẩm thay thế đóng vai trò chủ chốt. Trong những năm vừa qua, mặc dù đã có nhiều tiến bộ trong điều trị bệnh như truyền máu toàn phần, huyết tương, huyết tương tươi đông lạnh, tủa lạnh yếu tố VIII, yếu tố cô đặc có độ tinh khiết từ mức độ thấp đến mức độ cao. Tuy nhiên, các sản phẩm có nguồn gốc từ máu thường có giá thành rất đắt, thời gian bán hủy ngắn nên phải tiêm tĩnh mạch đều đặn. Thêm vào đó, nguồn cung cấp các chế phẩm này cũng hạn hẹp trong khi nhu cầu điều trị ngày một gia tăng. Hơn nữa các sản phẩm có nguồn gốc từ máu không phải là tuyệt đối an toàn. Bệnh nhân sử dụng các phương pháp điều trị này vẫn có nguy cơ tiềm ẩn mắc các bệnh lây nhiễm qua đường truyền máu như HIV, HBV, HCV. Khoảng 60-70% bệnh nhân hemophilia nặng bị nhiễm HIV (Human Immunodeficiency Virus) và khoảng 80%

bệnh nhân hemophilia bị nhiễm virus viêm gan do điều trị các chế phẩm từ máu.

Với sự tiến bộ của kỹ thuật sinh học phân tử, các nhà khoa học đã phân tích DNA của bệnh nhân đã cho phép nhận biết những tổn thương gen gây ra hemophilia, cũng như kiểm soát bệnh tốt hơn nhờ phát hiện người mang gen bệnh và việc chẩn đoán trước sinh. Việc tạo thành công yếu tố VIII tái tổ hợp ứng dụng trong điều trị cho bệnh nhân hemophilia là một bước đột phá trong việc nghiên cứu điều trị căn bệnh này. Ưu điểm của sinh phẩm là hàm lượng yếu tố VIII cao, có hiệu quả rõ rệt, bảo quản dễ, không có các yếu tố nguy cơ gây các bệnh truyền nhiễm. Thêm vào đó, việc điều trị bệnh hemophilia bằng liệu pháp gen (gene therapy) đã được thử nghiệm thành công trên mô hình động vật ở chuột VIII^{-/-} đã đem lại những triển vọng đầy hứa hẹn đối với người bệnh hemophilia.

Ở Việt Nam, tỉ lệ người mắc hemophilia trong cộng đồng khá cao. Theo thống kê của Viện Huyết học và Truyền máu TW có khoảng 5.000 bệnh nhân hemophilia nhưng chỉ mới phát hiện và điều trị đặc hiệu khoảng 20% các trường hợp. Tuy nhiên phương pháp điều trị hiện nay ở nước ta là sử dụng yếu tố VIII trong máu toàn phần (truyền trực tiếp hoặc tách chiết) là rất tốn kém và hiệu quả không cao và đặc biệt có nguy cơ cao đối với các bệnh lây truyền qua đường máu. Chính vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất yếu tố VIII là một vấn đề cấp thiết trong giai đoạn hiện nay ở Việt Nam, nó có ý nghĩa khoa học và thực tiễn rất lớn trong huyết học lâm sàng, vừa mang tính nhân đạo và đem lại hiệu quả kinh tế cao, giải quyết trực tiếp một vấn đề bức thiết đang đặt ra cho y học nước nhà. Do vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu giai đoạn một của đề tài với mục tiêu: “**Lựa chọn và thiết kế vector mang gen mã hoá yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp**”.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. BỆNH HEMOPHILIA

1.1.1. Lịch sử phát triển của bệnh

Hemophilia (bệnh máu khó đông) là một trong những bệnh di truyền đã được biết đến từ thời cổ đại, tuy nhiên không có tên gọi chính thức cho nó. Trong các văn thư cổ của người Do Thái từ thế kỷ thứ 2 trước công nguyên đã miêu tả những đứa trẻ bị chết do chảy máu không cầm sau khi cắt bao quy đầu (tục lệ của người Do Thái: trẻ em trai sinh ra đều cắt bao quy đầu). Vào thế kỷ 12 một bác sĩ người Arap-Albucasis cũng miêu tả những đứa trẻ bị chết do chảy máu từ những vết thương nhỏ. Hemophilia được cho là bệnh di truyền hàng trăm năm qua các thế hệ trong gia đình. Sự di truyền của bệnh hemophilia liên kết với giới tính được phát hiện từ những năm 80 của thế kỷ 19. Vào thời điểm này, các nhà khoa học nhận thấy chỉ có nam giới mắc bệnh và không có khả năng truyền bệnh cho con trai. Con gái bệnh nhân mang gen bệnh truyền cho con trai mình. Bệnh hemoliphia còn được biết đến như căn bệnh của Hoàng Gia vì nữ hoàng Anh Victoria 1838-1901 mang gen bệnh này và truyền nó cho nhiều thế hệ khác [1, 17-19].

Danh từ hemophilia lần đầu tiên được dùng để chỉ bệnh máu khó đông là vào năm 1828 ở trường đại học Zurich. Sau đó, năm 1820, Nasse viết bài báo đầu tiên về hemophilia. Năm 1893, Wright đã chứng minh được bằng chứng về sự thiếu hụt yếu tố đông máu. Tuy nhiên, yếu tố VIII chưa được biết đến cho đến năm 1937, khi Patek và Taylor tách được yếu tố đông máu, được gọi là yếu tố chống chảy máu (antihemophilia factor – AHF). Thử nghiệm sinh học về yếu tố VIII bắt đầu được nghiên cứu vào năm 1950. Mặc dù vào thời điểm đó, mối quan hệ chặt chẽ giữa yếu tố VIII và von Willebrand (vWF) vẫn chưa được biết và hiểu rõ. Đến năm 1953, sự suy giảm yếu tố VIII ở những bệnh nhân thiếu hụt vWF đã được mô tả. Nghiên cứu

sau này của Nilson và cộng sự đã chỉ ra mối tương quan giữa 2 yếu tố đông máu này [17-19].

Năm 1952, bệnh Christmas được biết đến và đặt tên theo họ của bệnh nhân đầu tiên mắc bệnh này. Bệnh này khác biệt với bệnh hemophilia vì khi trộn huyết tương của bệnh nhân hemophilia thực sự với huyết tương của bệnh nhân Christmas, và thấy có khả năng đông bình thường. Từ đó, người ta phát hiện có hai bệnh hemophilia A và hemophilia B khác biệt nhau.

Trước những năm 1960, bệnh hemophilia và một vài bệnh về máu khác được chữa trị bằng cách truyền bổ sung máu 100% hoặc plasma tươi. Tuy nhiên yếu tố làm đông máu VIII và IX có trong đó rất ít nên không làm cầm máu ở những người bị thể nặng và kết quả họ vẫn tử vong. Đa số các trường hợp tử vong do bị chảy máu vào trong các cơ quan quan trọng như não, thận, hoặc bị chảy máu ngoài do vết thương lớn. Những trường hợp may mắn sống sót cũng bị què quặt, tàn tật do bị chảy máu trong cơ khớp. Để giúp bệnh nhân hemophilia có cuộc sống đỡ khổ hơn là một trong những động lực mạnh mẽ giúp các bác sỹ tìm ra nguyên nhân cũng như chế tạo ra thuốc. Khoảng năm 1960, bác sỹ Judith Pool tìm ra Cryoprecipitate. Cryoprecipitate là một thành phần của máu chứa nhiều yếu tố đông máu VIII. Việc này mở đường cho khả năng kiểm soát chảy máu ở những bệnh nhân thể nặng hoặc bị vết thương lớn [18, 19].

Thập niên 1970, hỗn hợp máu chứa nhiều yếu tố đông máu VIII & IX được sản xuất hàng loạt. Sản phẩm yếu tố VIII cô đặc ở dạng đông khô giúp cho việc bảo quản và vận chuyển được dễ dàng, đã cải thiện được tình hình sức khỏe bệnh nhân và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phẫu thuật và chăm sóc sức khỏe cho bệnh nhân tại nhà. Đây thật sự là một cuộc cách mạng trong việc chăm sóc bệnh nhân máu khó đông. Cuộc sống họ giờ đây không còn gắn mình với bệnh viện. Họ có thể đi du lịch, làm việc, tham gia cuộc sống cộng đồng như người thường vì họ luôn mang theo thuốc đông máu để truyền khi cần [1, 3, 4, 6, 19].

Tuy nhiên vào thời điểm đó do chưa có hiểu biết nhiều về HIV cũng như các bệnh lây qua đường máu nên nhiều sản phẩm đông máu đã nhiễm loại virus chết người này và nhiều bệnh nhân hemophilia là nạn nhân. Những năm 1980, nguy cơ nhiễm virus gây bệnh từ những sản phẩm đông máu ngày càng tăng cao. Đến giữa những năm 1980, hầu hết bệnh nhân hemophilia nặng bị nhiễm virus viêm gan A, B, C và HIV [6, 9, 19].

Thập kỷ 1990, các sản phẩm đông máu được sử dụng các kỹ thuật bất hoạt virus trong khi sản xuất nhằm loại trừ sự truyền nhiễm virus gây bệnh. Thêm vào đó, các yếu tố đông máu thay thế tái tổ hợp, được sản xuất bằng công nghệ gen, sử dụng trong điều trị bệnh hemophilia gần như đã ngăn chặn được nguy cơ lây nhiễm các bệnh lây truyền qua đường máu và có hiệu quả điều trị cao hơn [1, 3, 9, 17, 20].

1.1.2. Tình hình mắc bệnh

Hemophilia là bệnh rối loạn đông máu di truyền hay gặp nhất. Theo thống kê của tổ chức hemophilia thế giới, hiện nay có khoảng 250.000 bệnh nhân mắc bệnh hemophilia và chỉ có khoảng 50.000 được điều trị đặc hiệu. Tại Việt Nam, theo những thống kê không đầy đủ hiện tại nước ta có khoảng 5000 bệnh nhân hemophilia. Theo số liệu điều tra từ năm 1994-1996 về tình hình bệnh hemophilia ở Miền Bắc Việt Nam cho thấy tỷ lệ bệnh hemophilia là 25-60/1.000.000 dân [7, 27]. Tỷ lệ mắc bệnh hemophilia gần giống nhau ở các vùng, các nước, các chủng tộc (Harold R.Roberts, 1995). Hay gặp bệnh hemophilia A hơn chiếm tới 85%, hemophilia B chỉ chiếm 14% [7, 27]. Tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương, cùng với sự ra đời của trung tâm điều trị hemophilia, số bệnh nhân đến khám và điều trị tăng lên đáng kể. Đến nay trung tâm đã quản lý khoảng 500 bệnh nhân hemophilia ở các địa phương khác nhau, trong đó hemophilia A chiếm 85%, 13,16% là hemophilia B và còn lại là các bệnh nhân bị các bệnh rối loạn đông máu khác [27].

1.1.3. Sinh lý bệnh học [19]

Yếu tố VIII là một globulin do gan, lách và cả lưới nội mô sản xuất. Yếu tố này quan trọng cho sự tạo thành thromboplastin nội sinh (yếu tố XI) trong quá trình đông máu. Vai trò của hệ thống đông máu là tạo ra khối fibrin bền vững tại vị trí tổn thương. Cơ chế đông máu gồm 2 con đường: nội sinh và ngoại sinh.

Con đường nội sinh: có thể được xảy ra bên trong hoặc bên ngoài cơ thể với bước đầu tiên là sự hoạt hóa yếu tố XII. Trong cơ thể, sự hoạt hóa yếu tố XII xảy ra khi tiếp xúc với collagen, fibrin, màng tiểu cầu trong quá trình kết tụ tiểu cầu. Yếu tố XII cũng có thể được hoạt hóa trong một số trạng thái như stress, lo lắng, sợ hãi... Ở bên ngoài cơ thể (trong ống nghiệm) yếu tố XII được hoạt hóa khi máu tiếp xúc với bề mặt lạ. Yếu tố XII hoạt hóa sẽ xúc tác cho sự hoạt hóa yếu tố XI. Với sự có mặt của ion calci, yếu tố XI hoạt hóa sẽ tiếp tục hoạt hóa yếu tố IX. Yếu tố IX hoạt hóa tương tác với yếu tố VIII hoạt hóa trên bề mặt của các hạt phospholipid của tiểu cầu, với sự có mặt của ion calci để tạo ra một phức hợp enzym có khả năng hoạt hóa yếu tố X. Yếu tố X hoạt hóa, với sự có mặt của ion calci sẽ tương tác với yếu tố V trên bề mặt các hạt phospholipid của tiểu cầu để tạo ra phức hợp prothrombinase như con đường ngoại sinh.

Trong hệ thống ngoại sinh: khi máu tiếp xúc với mô tổn thương, yếu tố III của mô được giải phóng sẽ tương tác với yếu tố VII có trong huyết tương và ion calci để tạo thành tác nhân hoạt hóa yếu tố X. Yếu tố X hoạt hóa với sự có mặt của ion calci sẽ tương tác với yếu tố V trên các hạt phospholipid của mô để tạo ra phức hợp protrombinase.

Prothrombin là một globulin có trong huyết tương, do gan sản xuất. Đây là tiền chất không hoạt động của một enzym tiêu protein rất mạnh là trombin. Với sự có mặt của ion calci, prothrombinase sẽ chuyển protrombin thành trombin. Lúc đầu, sự chuyển prothrombin xảy ra rất chậm để tạo thành một lượng trombin cần cho máu đông. Sau đó trombin sẽ làm tăng tốc độ của quá trình tạo ra bản thân nó bằng

cách hoạt hóa yếu tố V và yếu tố VIII. Yếu tố VIII hoạt hóa là thành phần của phức hợp enzym hoạt hóa yếu tố X. Yếu tố V hoạt hóa là thành phần của prothrombinase. Như vậy cả hai yếu tố này góp phần làm tăng quá trình chuyển prothrombin thành trombin. Trombin cũng hoạt hóa yếu tố XIII để ổn định mạng lưới fibrin. Fibrinogen là một protein hòa tan trong huyết tương do gan sản xuất. Trombin chuyển fibrinogen thành các sợi fibrin đơn phân. Sau đó các fibrin đơn phân tự trùng hợp thành mạng fibrin không hòa tan. Trombin cũng hoạt hóa yếu tố XIII. Yếu tố XIII hoạt hóa, với sự có mặt của ion calci sẽ làm mạng lưới fibrin trở nên ổn định hơn nhờ các dây nối đồng hóa trị giữa các sợi fibrin để tạo thành cục máu đông.

Yếu tố VIII và IX lưu thông trong máu ở dạng bất hoạt. Khi được hoạt hóa, hai yếu tố này phối hợp với nhau để phân cắt và hoạt hóa yếu tố X, một enzym quan trọng điều khiển sự chuyển hóa fibrinogen thành fibrin. Vì vậy, thiếu một trong các yếu tố này có thể làm thay đổi đáng kể quá trình đông máu, dẫn đến sự chảy máu lâm sàng.

1.1.4. Triệu chứng và mức độ nặng của bệnh [2, 5, 8, 17, 19]

1.1.4.1. Những người có khả năng mắc bệnh hemophilia

Hemophilia A và hemophilia B khá phổ biến. Tỷ lệ gặp khoảng 1/10.000 nam giới. Đây là bệnh di truyền lặn, liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính X. Chủ yếu bệnh nhân là nam giới, 100 % con gái của người bệnh mang gen, cháu trai ngoại có biểu hiện bệnh. Ở khoảng 1/3 bệnh nhân, người ta không xác định được tiền sử gia đình. Nguyên nhân gây bệnh ở các bệnh nhân này được cho là do đột biến gen. Tỷ lệ hemophilia A/ hemophilia B từ 5 - 7 : 1.

Bệnh nhân hemophilia C hiếm gặp hơn và có biểu hiện lâm sàng nhẹ. Bệnh di truyền lặn, liên quan đến nhiễm sắc thể thường vì vậy cả nam và nữ đều có thể mắc bệnh.

1.1.4.2. Triệu chứng

Bệnh nhân hemophilia có thể bị chảy máu bất kì nơi nào trên cơ thể và chảy máu kéo dài, nhưng cơ khớp là hay bị chảy nhất, còn các vị trí còn lại ít xảy ra, nhưng thường rất nguy hiểm.

Chảy máu khớp

Chảy máu khớp thường gặp nhất ở bệnh nhân hemophilia. Đây là loại chảy máu nguy hiểm vì khi tái phát nhiều lần gây ra viêm khớp, biến dạng khớp. Chảy máu khớp có thể xuất hiện tự nhiên hoặc sau chấn thương. Nếu điều trị muộn sau 4 giờ thì cảm giác đau có thể tăng lên, khớp sẽ sưng và việc điều trị bị kéo dài tới vài ngày. Trẻ lớn có thể nhận biết được chảy máu khớp trước khi đau và sưng xảy ra với cảm giác gai châm hoặc kiến bò trong khớp. Điều trị sớm sẽ dự phòng được tình trạng đau mạn tính và biến dạng khớp.

Chảy máu trong cơ

Chảy máu trong cơ cũng thường gặp và xuất hiện tự nhiên hoặc sau chấn thương. Những cơ hay bị chảy máu là: cẳng chân, đùi, cánh tay. Chảy máu cơ gây ra sưng đau trong vài ngày. Một dấu hiệu quan trọng và kín đáo trong chảy máu cơ là cảm giác đau, nóng, ngứa ran hoặc tê bì. Nếu không được điều trị sớm cơ sẽ bị phá huỷ và có thể gây liệt.

Chảy máu não

Có thể xuất hiện tự nhiên hoặc sau chấn thương, ví dụ như ngã hoặc đập đầu vào vật cứng. Triệu chứng chảy máu não có thể xảy ra ngay hoặc vài ngày sau chấn thương bao gồm: dễ kích ứng, ngủ gà, đau đầu, lú lẫn, nôn, buồn nôn, nhìn đôi. Tất cả những sang chấn ở đầu đều nghiêm trọng và cần được điều trị sớm để tránh chảy máu não và các hậu quả của chúng.

Chảy máu trong cổ và ngực

Chảy máu ở mặt, cổ và ngực có thể được coi là nghiêm trọng vì sưng nề có thể gây chèn ép đường thở. Nhiễm trùng cũng có thể làm sưng cổ và đôi khi khó có

thể phân biệt hiện tượng sưng là do nhiễm trùng hay do chảy máu. Tất cả các trường hợp sưng cổ đều được coi là do chảy máu và phải được điều trị.

Chảy máu ở vị trí khác

Bệnh nhân hemophilia rất dễ bị chảy máu nhưng hiếm gặp xuất huyết dưới da. Chảy máu từ vết cắt sâu hoặc xước da có thể kéo dài và hồi phục sau vài ngày mà không cần điều trị. Chảy máu miệng, lợi và mũi cũng hay gặp. Có thể xuất huyết tiêu hoá và đại máu.

1.1.4.3. Xét nghiệm

- + Thời gian máu chảy kéo dài, thời gian đông máu kéo dài có thể hơn 1 giờ; chất lượng cục máu đông kém; thời gian Howel kéo dài...
- + Định lượng yếu tố VIII giảm hoặc không có.
- + Xét nghiệm DNA phát hiện đột biến gen.
- + Yếu tố von- Willebrand bình thường.
- + Số lượng tiểu cầu bình thường.

1.1.4.4. Phân loại thể bệnh hemophilia theo mức độ hoạt tính yếu tố VIII

Bình thường yếu tố VIII ở người bình thường dao động từ 50 đến 200 ng/ml. Trường hợp bị bệnh hoạt tính yếu tố VIII giảm dưới 30%. Hemophilia được chia làm ba thể: nặng, trung bình và nhẹ.

- + Thể nặng: Hoạt tính yếu tố VIII giảm dưới 1 %, những bệnh nhân này thường bị chảy máu vài lần trong tháng.
- + Thể trung bình: Hoạt tính yếu tố VIII từ 1-5%, những bệnh nhân này chỉ bị chảy máu sau những chấn thương nhẹ.
- + Thể nhẹ: Hoạt tính yếu tố VIII từ 5-25% so với mức bình thường, những người này chỉ bị chảy máu sau phẫu thuật hoặc những chấn thương nặng, sau những động tác mạnh khi chơi thể thao

1.1. 5. Điều trị thay thế yếu tố VIII

Điều trị hemophilia bao gồm: điều trị chảy máu, điều trị dự phòng và phục hồi chức năng, trong đó việc sử dụng các chế phẩm thay thế đóng vai trò quan trọng hàng đầu trong quá trình điều trị:

- Huyết tương tươi đông lạnh (HTTĐL) được chiết tách từ máu tươi toàn phần trong thời gian < 6 giờ kể từ khi lấy ra khỏi cơ thể người cho, sau đó bảo quản ngay ở độ lạnh sâu - 30°C. Ngoài các yếu tố đông máu, HTTĐL còn chứa nhiều thành phần khác như kháng thể nhóm máu, albumin, globulin... Nồng độ yếu tố VIII trong HTTĐL vào khoảng 0,6 - 0,8 đơn vị/ml, vì vậy để truyền cho bệnh nhân hemophilia thì cần đưa vào thể tích lớn, nguy cơ lây nhiễm các bệnh truyền qua đường máu cao [1, 3].
- Tủa lạnh yếu tố VIII là phần thu được sau khi phá đông chậm HTTĐL và loại bỏ phần dịch nổi bên trên. Nồng độ yếu tố VIII trong tủa lạnh phụ thuộc rất nhiều vào từng giai đoạn của quá trình sản xuất: người cho máu, thao tác lấy máu, quá trình làm đông, quá trình tan đông, quá trình bảo quản... Nồng độ trung bình khoảng 4 đơn vị/ml. Ưu điểm của chế phẩm này là nồng độ yếu tố VIII cao, ít gây phản ứng, đơn giản, dễ sản xuất, không đòi hỏi máy móc phức tạp và rẻ tiền hơn so với các chế phẩm khác [3, 6].
- Yếu tố VIII cô đặc được sản xuất từ huyết tương sau đó cô đặc và bất hoạt virus nên hạn chế việc lây nhiễm các bệnh truyền qua đường máu. Sản phẩm dễ bảo quản nhưng quá trình sản xuất đòi hỏi có trang thiết bị, giá thành sản phẩm cao [6].
- Yếu tố VIII tái tổ hợp được sản xuất từ kỹ thuật sử dụng qui trình công nghệ gen, có hiệu quả điều trị cao và an toàn, hoàn toàn loại trừ được nguy cơ lây truyền các bệnh truyền qua đường máu [20, 26]. Tuy nhiên giá thành của sản phẩm còn khá cao chưa phù hợp với điều kiện kinh tế của Việt Nam.
- Liệu pháp điều trị gen (gene therapy) hiện nay đang được các nhà khoa học nghiên cứu và đã bước đầu thành công trên mô hình động vật thực nghiệm [12, 24, 25, 36].

1.1.6. Các tác dụng không mong muốn khi phải sử dụng phương pháp truyền máu [17, 19, 22]

1.1.6.1. Do bất đồng miễn dịch

a/ Phản ứng tan máu cấp:

Xảy ra ngay trong quá trình truyền máu thường do nguyên nhân bất đồng nhóm máu ABO. Phản ứng kháng nguyên và kháng thể có trong huyết tương người nhận cùng với bổ thể gây tan máu.

b/ Phản ứng tan máu muộn:

Tan máu xảy ra muộn do bất đồng kháng nguyên hồng cầu của các nhóm máu hiếm: Rh, Kidd, Kell. Sau mỗi lần nhận máu bệnh nhân sẽ tăng miễn cảm tạo ra các kháng thể typ IgG, sự tăng nhanh của các kháng thể này làm giảm nhanh chóng đời sống hồng cầu, tan máu nhẹ...

c/ Phản ứng dị ứng:

Sau khi được truyền máu, nhất là khi được truyền hồng cầu, tiểu cầu, máu toàn phần có nhiều bạch cầu sẽ tạo ra histamin và các chất gây hoạt hóa khác từ các tế bào có gắn IgG, IgE bề mặt. Các triệu chứng hay gặp như mẩn ngứa, nổi mề đay hay nặng hơn có thể gây sốc phản vệ.

d/ Phản ứng miễn dịch đồng loại sau truyền máu:

Sau khi truyền máu, bệnh nhân có thể bị gây miễn dịch chống lại một số đồng kháng nguyên khác nhau trong máu truyền vào: kháng nguyên hồng cầu, kháng nguyên đặc hiệu tiểu cầu, kháng nguyên đặc hiệu bạch cầu hạt và kháng nguyên HLA (trên bề mặt lymphocyte và tiểu cầu).

1.1.6.2. Lây nhiễm các bệnh nhiễm trùng qua đường máu

Theo thống kê của tổ chức hemophilia thế giới, hiện nay có khoảng 250.000 bệnh nhân mắc bệnh hemophilia, trong đó có một số lượng lớn bệnh nhân hemophilia bị nhiễm HIV/AIDS là trên 20.000 người. Cùng với HIV, tỷ lệ các bệnh

nhiễm trùng qua đường truyền máu như: HAV, HBV, HCV cũng rất cao khoảng 80% bệnh nhân Hemophilia cũng bị nhiễm các virus này này do họ được truyền máu và các chế phẩm máu để điều trị

Bảng 1. Tình hình nhiễm các virus do quá trình truyền máu ở bệnh nhân hemophilia tại Việt Nam.

Các dạng nhiễm trùng	Nhóm nhận máu trên 3 lần, trước năm 1995 chưa có sàng lọc HCV	Nhóm truyền máu nhiều lần sau năm 1995	Chưa truyền máu
Anti HIV và anti HTLV (+)	0	0	0
Anti HCV (+)	50%	0	0
HBsAg	27.3%	0	0
Anti HAV (+)	66%	0	0
HCV+HAV+CMV	42.8%	0	0
HAV+CMV	100%	25%	0

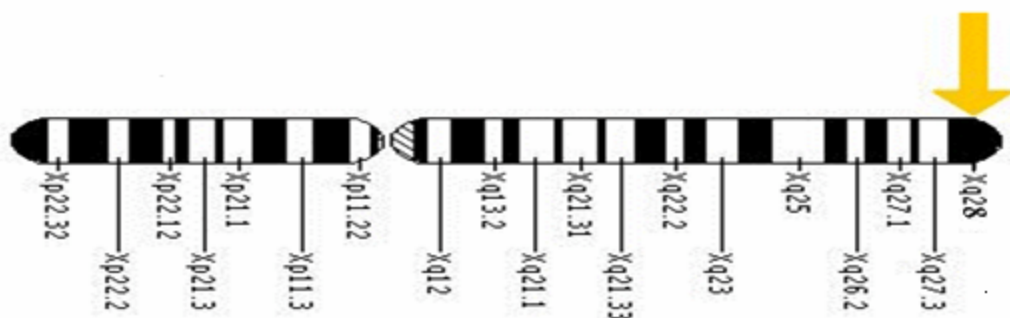
Ở Việt nam chưa gặp bệnh nhân hemophilia nào có Anti HIV type 1 và 2. Tỷ lệ có kháng thể chống virus viêm gan C (anti HCV) gặp ở bệnh nhân hemophilia được truyền máu nhiều lần trước khi có xét nghiệm sàng lọc HCV là khá cao 50%. Tỷ lệ HAV (+) gặp ở bệnh nhân hemophilia truyền máu nhiều lần là khoảng 66%. Bệnh nhân càng truyền máu và chế phẩm máu nhiều lần thì tỷ lệ nhiễm trùng phối hợp cũng cao 42,8% có nhiễm trùng phối hợp 3 loại virus: HCV,HAV,CMV; 100% có nhiễm trùng phối hợp với HAV và CMV (bảng 1).

Tóm lại, cũng giống như các nước khác trên thế giới, tỉ lệ người mắc hemophilia trong cộng đồng khá cao, nhu cầu yếu tố VIII dùng trong điều trị và dự phòng rất lớn, vì vậy việc nghiên cứu sản xuất yếu tố này thực sự là một vấn đề cấp

thiết ở Việt Nam. Do đó, việc nghiên cứu sản xuất yếu tố VIII tái tổ hợp là việc làm hết sức cần thiết vừa có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn.

1.2. GEN MÃ HÓA YẾU TỐ VIII

Hemophilia A là bệnh máu khó đông do sự thiếu hụt yếu tố đông máu số VIII. Gen mã hoá cho yếu tố này nằm tại vùng q28 (hình 1), trên cánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X và khi đột biến sẽ gây ra bệnh di truyền lặn liên kết với nhiễm sắc thể X. Gen quy định tổng hợp yếu tố VIII là một trong những gen lớn nhất cơ thể, có kích thước 186 kb. Gồm 25 intron và vùng gen mã hóa dài 9 kb với 26 exon [32, 33].



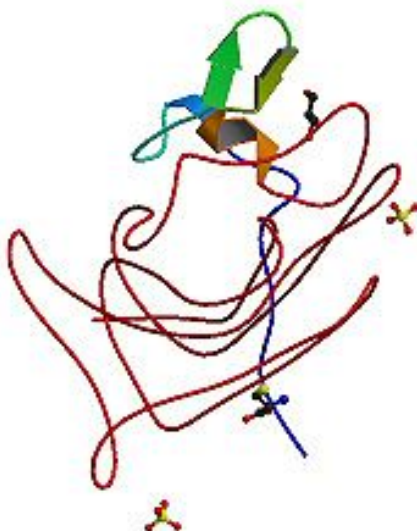
Hình 1. Vị trí của gen tổng hợp yếu tố VIII

Nhiều đột biến trong cấu trúc gen yếu tố VIII đã được nghiên cứu. Sự biến đổi di truyền bao gồm: sự biến dị của các mã kết thúc, sự thiếu hụt khung đọc, đột biến xóa nucleotide làm thay đổi kích thước gen. Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, 45% trường hợp hemophilia A nặng là do đột biến đảo đoạn. Ngoài ra, có khoảng 10- 15 % những bệnh nhân hemophilia lại tồn tại kháng thể kháng yếu tố VIII sau khi sử dụng liệu pháp điều trị bổ xung yếu tố VIII, những bệnh nhân này gọi là có nhân tố ức chế yếu tố VIII (inhibitor).

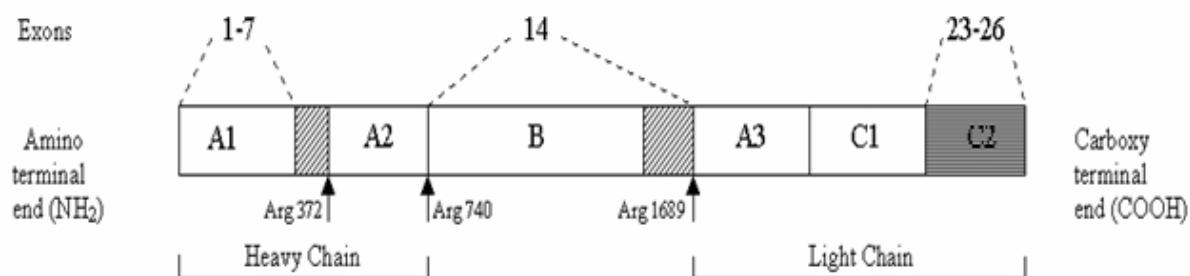
1.3. PROTEIN YẾU TỐ VIII

Protein yếu tố VIII gồm 2332 acid amin và có trọng lượng phân tử khoảng 300 kD. Gồm chuỗi nặng có kích thước 200 kD trong một phức hợp ion kim loại với

chuỗi nhẹ có kích thước 80 kD. Cấu trúc của phức hợp này được giữ ổn định nhờ sự tương tác giữa các liên kết ưa nước và kỵ nước với yếu tố von Willebrand (vWF - là một kháng nguyên liên quan đến yếu tố VIII) và Ca^{2+} , [35]. Mô hình cấu trúc 3-D của phân tử protein yếu tố VIII như hình dưới đây, (http://en.wikipedia.org/wiki/Factor_VIII)



Hình 2: Yếu tố VIII được tạo ra từ một chuỗi polypeptid có cấu trúc vùng, gồm: 3 vùng A (330-380 acid amin) là vùng quan trọng để gắn Ca^{2+} , 1 vùng B (908 acid amin) và 2 vùng C (160 acid amin) là vùng liên kết với phospholipid và yếu tố vWF. (Toole JJ et al., 1986)



Hình 3. Cấu trúc phân tử của yếu tố VIII

Chuỗi nặng có đầu cuối là N, gồm các domain A1-A2-B, chuỗi nhẹ có đầu cuối là C, gồm các domain A3-C1-C2. Vùng B được mã hóa bởi một exon lớn và không có sự tương đồng với bất kỳ gen nào đã biết (hình 3). Khi thủy phân hoàn toàn domain B tạo thành asparagines, serine và threonine (Kaufman, R. J et al., 1988). Vùng B không cần cho chức năng của yếu tố VIII và sau quá trình dịch mã, domain B bị cắt khỏi chuỗi nặng của yếu tố VIII. Cùng với trình tự acid amin bậc 1, việc xác định được gen mã hóa yếu tố VIII cho phép biểu hiện yếu tố VIII trong tế bào động vật, qua đó nghiên cứu quá trình sinh tổng hợp yếu tố VIII. Đồng thời cho phép tạo ra những đột biến đặc biệt trong yếu tố VIII để nghiên cứu những yêu cầu về cấu trúc ảnh hưởng đến chức năng, hoạt tính của yếu tố VIII (Kaufman, R. J et al., 1988). Một số nghiên cứu cho thấy rằng, sự xóa bỏ vùng B sẽ tạo thành phân tử yếu tố VIII có chức năng, mà không ảnh hưởng đến hoạt tính hay tính kháng nguyên của protein yếu tố VIII và yếu tố VIII cũng được biểu hiện hiệu quả hơn so với yếu tố VIII thể hoang dại (Toole JJ et al, 1986; Dorner AJ et al, 1987; Meulien P et al, 1988)

Yếu tố VIII được sản xuất chủ yếu từ tế bào gan, ngoài ra còn sản xuất tại thận, lách. Hàm lượng yếu tố VIII trong huyết tương thấp (20-50 mg/ml). Đầu tiên, yếu tố VIII được tổng hợp như một chuỗi đơn gồm 2351 acid amin ở lưới nội bào, sau đó được chuyển vào thể Golgi. Tại đây đã xảy ra một số phản ứng để rồi hình thành phân tử của yếu tố VIII (hình 3). Nó được lưu thông dưới dạng tiền “cofactor” không hoạt động. Yếu tố VIII được hoạt hóa nhờ quá trình xúc tác phân giải bởi thrombin hoặc yếu tố Xa với nguyên lý hoạt động cắt yếu tố VIII ở vị trí Arg 372 (chỗ nối A1-A2), vị trí Arg 740 (chỗ nối A2-B) và vị trí Arg 1689 (chỗ nối B-A3). Khi vùng A2 tương tác với phức hợp A1/A3-C1-C2 thì yếu tố VIII thực sự được hoạt hóa (Wion et al., 1985).

Hệ thống yếu tố VIII ở người bình thường, trong huyết tương có ba hoạt tính khác nhau:

- Chính lý thời gian đông của huyết tương do yếu tố VIII đông máu quyết định (Factor VIII conglutation- FVIIIc).
- Bị tủa bởi một kháng thể dị loài gọi là kháng nguyên liên quan đến yếu tố VIII(Factor VIII Related Antigen : FVIII-R.Ag).
- Điều chỉnh được tình trạng chảy máu trong bệnh Willebrand (Factor VIII Related Willebrand: FVIII-RW).

CHƯƠNG 2: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. NGUYÊN LIỆU, HOÁ CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.1.1. Nguyên liệu

Mô gan của người do bệnh viện K cung cấp, được bảo quản ở -70°C .

Chủng *Escherichia coli* DH5 α để tách dòng và *E.coli* SG13009 [pREP4] để biểu hiện.

2.1.2. Thiết bị

- Máy Gene Amp PCR System 9700 (USA)
- Tủ lạnh sâu: -30°C ; -80°C (SANYO)
- Máy điện di: Mupid (Nhật Bản)
- Máy điện di protein....
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động: Chemidoc EQ-Bio-Rad (USA)
- Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm để bàn Eppendorf (Đức)
- Lò vi sóng (Samsung)
- Tủ nuôi cấy có chế độ lắc.
- Máy phá tế bào bằng siêu âm...
- Cân phân tích
- Máy khuấy từ
- Máy voltex
- Máy đo pH
- Nồi hấp khử trùng ướt
- Pipetman các loại

2.1.3. Hoá chất

Các hóa chất dùng trong nghiên cứu này đều ở dạng tinh khiết rất cao và được mua từ các hãng hóa chất có uy tín trên thế giới.

- Hóa chất dùng để tách chiết RNA tổng số (*Wako*)

- + Isogen
- + Isopropanol
- + Ethanol 75%
- + DEPC-water

- Hóa chất dùng để tổng hợp cDNA (*Invitrogen*)

- + Random primer
- + dNTP 10mM
- + PCR buffer 5X
- + DTT 0,1M (proteinase inhibitor)
- + HPRI (RNAase inhibitor)
- + MMLV-RT (enzym tổng hợp chuỗi ngược)

- Hóa chất dùng cho PCR (*Invitrogen*)

- + 10 X buffer
- + dNTP mix
- + Taq polymerase
- + Các cặp mồi (xuôi và ngược)

-Hoá chất dùng để nối các đoạn gen (*Invitrogen*)

- + Bufer T4
- + T4 ligate

- Hoá chất dùng để nhân dòng gen (*Invitrogen*)

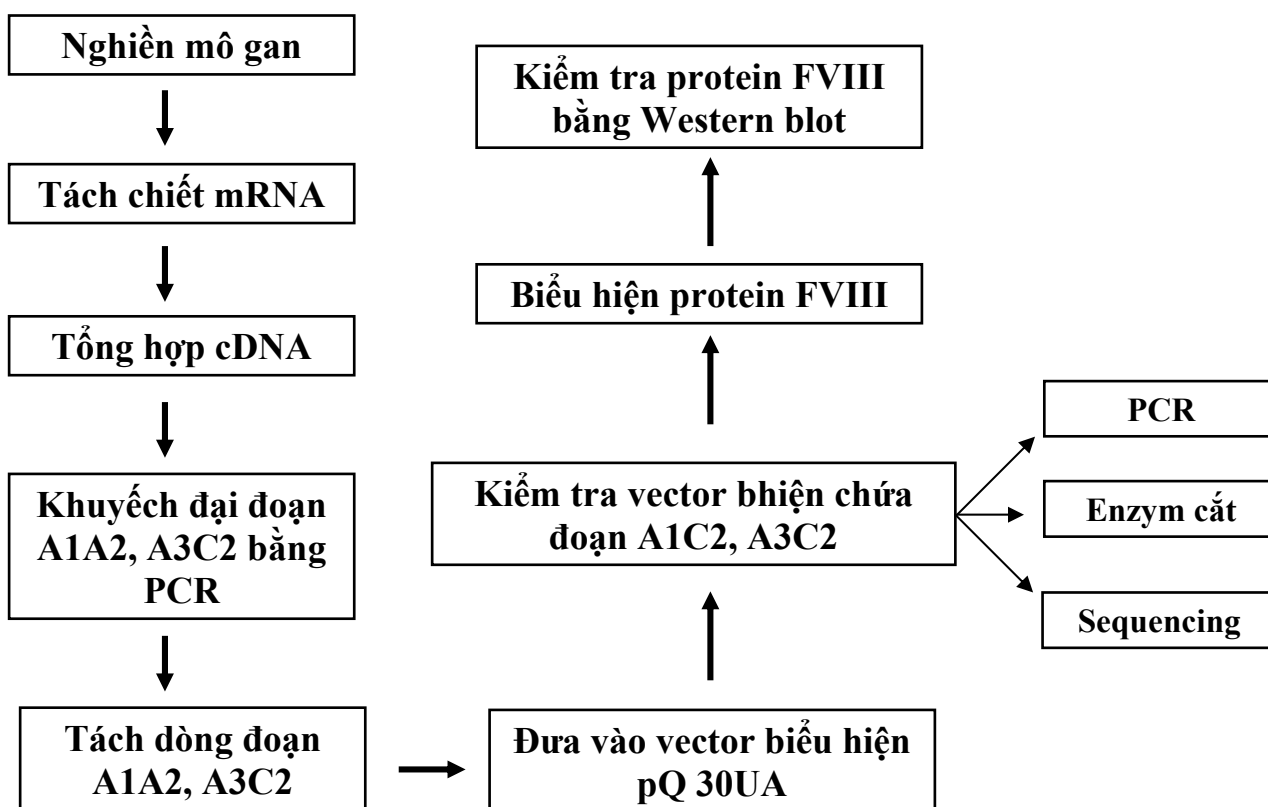
- + Vector tạo dòng: pQE 30 UA.
- + Enzym cắt giới hạn .
- + Môi trường nuôi cấy khuẩn lạc
- + Kháng sinh Kanamycin 30mg/ml, Ampicillin 100 µg/ml.
- + Đĩa petri

- Hoá chất dùng để kích thích vector biểu hiện protein(*Invitrogen*)

- + ITPG

2.2. PHƯƠNG PHÁP

Thiết kế quy trình nghiên cứu



2.2.1. Tách chiết RNA tổng số từ mô gan người

- Mô gan được nghiền trong 1ml isogen bằng cối nghiền đồng thể, sau đó chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml.
- Thêm 0,2 ml chloroform vào dung dịch nghiền mô ở trên, dùng tay lắc nhẹ ống để trộn đều các dung dịch, giữ ở nhiệt độ phòng 2 - 3 phút.
- Ly tâm với tốc độ 15.000 vòng/ phút trong 15 phút ở 4°C. Lúc này dịch ly tâm sẽ được phân tách làm 3 lớp: lớp trên cùng là lớp dịch chứa RNA, lớp giữa là DNA và lớp dưới cùng là hỗn hợp protein và chloroform.
- Hút lớp dịch trên cùng có chứa RNA. Để tránh dịch RNA bị lẫn DNA, tuyệt đối không hút vào lớp ở giữa.

- Thêm 0,5 ml dịch isopropanol và giữ ở nhiệt độ phòng 10 - 15 phút.
- Ly tâm với tốc độ 15000 vòng/ phút trong 5 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch nổi, thu lấy cặn màu trắng đục. Đây chính là cặn RNA thu được.
- Thêm 1ml ethanol 70% vào ống eppendorf có chứa cặn, dùng tay đảo ngược ống eppendorf vài lần để rửa cặn.
- Ly tâm với tốc độ 15000 vòng/ phút trong 5 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch nổi, thu lấy cặn RNA.
- Giữ khoảng 1 phút để khô cặn RNA. Lưu ý là không để cặn khô quá để tránh làm giảm chất lượng RNA và cặn sẽ khó được hoà tan.
- Hoà tan cặn trong nước DEPC, đây là một loại nước có chứa Rnasin, một chất ức chế Rnase.
- Bảo quản dịch RNA ở -70°C.

2.2.2. Xác định nồng độ, độ sạch RNA, cDNA bằng phương pháp quang phổ kế

Nguyên tắc của phương pháp dựa vào sự hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260 nm của các base purin và pyrimidin. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm ($OD_{260\text{ nm}}$ - Optical Density $_{260\text{ nm}}$) của các mẫu đo cho phép xác định nồng độ acid nucleic trong mẫu dựa vào tương quan sau:

Một đơn vị $OD_{260\text{ nm}}$ tương ứng với nồng độ là:

- 50 $\mu\text{l/ml}$ cho một dung dịch DNA sợi đôi.
- 40 $\mu\text{g/ml}$ cho một dung dịch RNA hay DNA sợi đơn.

Tuy nhiên, cách tính này chỉ đúng với các dung dịch nucleic acid sạch. Để kiểm tra độ sạch của dung dịch, người ta đo thêm giá trị OD ở 280 nm ($OD_{280\text{ nm}}$). Các protein có mức hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280 nm, nhưng cũng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260 nm như các acid nucleic. Do đó, làm sai lệch giá trị thật của

nồng độ acid nucleic. Một dung dịch nucleic acid đạt tiêu chuẩn về độ sạch (không tạp nhiễm protein) khi tỷ số $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ nằm trong khoảng 1,8 - 2.

Các mẫu RNA và cDNA trong nghiên cứu được pha loãng ở nồng độ 100 lần và tiến hành đo OD ở bước sóng 260 và 280 nm.

2.2.3. Phương pháp điện di acid nucleic

Nguyên lý của phương pháp điện di: dựa vào các đặc tính cấu trúc của các acid nucleic là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của một điện trường, chúng sẽ di chuyển về cực dương của điện trường.

Việc chọn loại gel cũng như nồng độ các chất tạo thành gel tùy thuộc kích thước trung bình của các đoạn acid nucleic cần phân tách. Gel agarose là loại gel thông dụng nhất, thường dùng để phân tách những đoạn có kích thước trong khoảng 0,5 - 20 kb. Gel được đổ trên một giá thể nằm ngang và điện di được thực hiện theo phương nằm ngang. Các acid nucleic trong gel agarose sẽ hiện hình (dưới dạng những vạch màu đỏ cam) dưới tia tử ngoại (UV) nhờ một hóa chất có tên là ethidium bromide. Chất này có khả năng gắn xen vào giữa các base của nucleic acid và sẽ phát huỳnh quang dưới tác dụng của tia tử ngoại.

Để kiểm tra chất lượng RNA tách chiết, kết quả khuếch đại và tách dòng 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2*, chúng tôi tiến hành điện di trên gel agarose như sau:

- Điện di RNA trên gel agarose 1%: 1 μ l RNA (3 - 4 μ g) được trộn với 4 μ l đệm tra mẫu.
- Điện di sản phẩm PCR đặc hiệu của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* trên agarose 1%: 10 μ l sản phẩm PCR được trộn với 2 μ l đệm tra mẫu.
- Điện di sản phẩm cắt plasmid với các enzym giới hạn trên gel agarose 1%: 10 μ l hoặc 30 μ l sản phẩm cắt được trộn với 2 μ l hoặc 6 μ l đệm tra mẫu.

- Tiến hành điện di trong đệm TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM acid acetic, 2 mM EDTA, pH 8.3), ở hiệu điện thế 110V, trong khoảng thời gian từ 15 phút đến 40 phút.
- Chụp ảnh để ghi lại kết quả điện di bằng hệ thống máy Genedoc, BioRad.

2.2.4. Tổng hợp cDNA sử dụng phương pháp MMLV-RT

Những mẫu RNA đạt được nồng độ tối ưu và có độ tinh sạch dao động từ 1,8 - 2 sẽ được sử dụng để tổng hợp cDNA.

Bước 1: Giai đoạn biến tính (*denaturation*).

- Sử dụng 2 - 3 µg RNA tổng số, thêm nước khử DEPC cho đủ 6 µl/1 ống.
- Để ở nhiệt độ 65°C trong vòng 5 phút.
- Đặt trên đá 1 phút để làm lạnh ống PCR.

Bước 2: Giai đoạn gắn môi (*annealing*).

- Thêm 2 µl random primer (5 pmol/µl) và 5µl dNTPs (2.5 mM).
- Để ở nhiệt độ 25°C trong vòng 10 phút.

Bước 3: Giai đoạn tổng hợp cDNA (*extention*).

- Thêm vào 7µl/ ống hỗn hợp sau: 4 µl 5 x first strand PCR buffer; 1 µl DTT (ức chế protein); 1 µl HPRI (ức chế Rnase); 1 µl MMLV-RT (enzym tổng hợp).
- Để ở nhiệt độ 37°C trong 55 phút và 70°C trong 15 phút, 15°C ~.
- cDNA được giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng cho PCR.

2.2.5. Khuếch đại 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII

Chúng tôi thiết kế 2 cặp môi đặc hiệu để khuếch đại 2 đoạn gen *A1A2* có kích thước 3 kb và *A3C2* có kích thước 2,1 kb. Những đoạn môi này được thiết kế chứa trình tự nhận biết của các enzym giới hạn *PmlI* (CAC GTG), *EcoRV* (GAT ATC),

*Sma*I (CCC GGG), *Sal*I (GAC GTC) sẽ được sử dụng để thiết kế vector biểu hiện yếu tố VIII.

Hai cặp mồi có trình tự như sau:

Tên mồi	Trình tự mồi
A1A2 - F	5' - TGT AGC CAC GTG ATG CAA ATA G - 3'
A1A2 - R	5' - GAA TAA GGC GAT ATC TTT AGT CAA - 3'
A3C2 - F	5' - GCA AAG CCC GGG AGG ACT GAA - 3'
A3C2 - R	5' - CAG TGG GTC GAC GTC AGT AGA GGT - 3'

Thành phần phản ứng PCR và chu trình nhiệt của phản ứng PCR để khuếch đại 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* đã được tối ưu hóa như sau:

Thành phần phản ứng PCR:

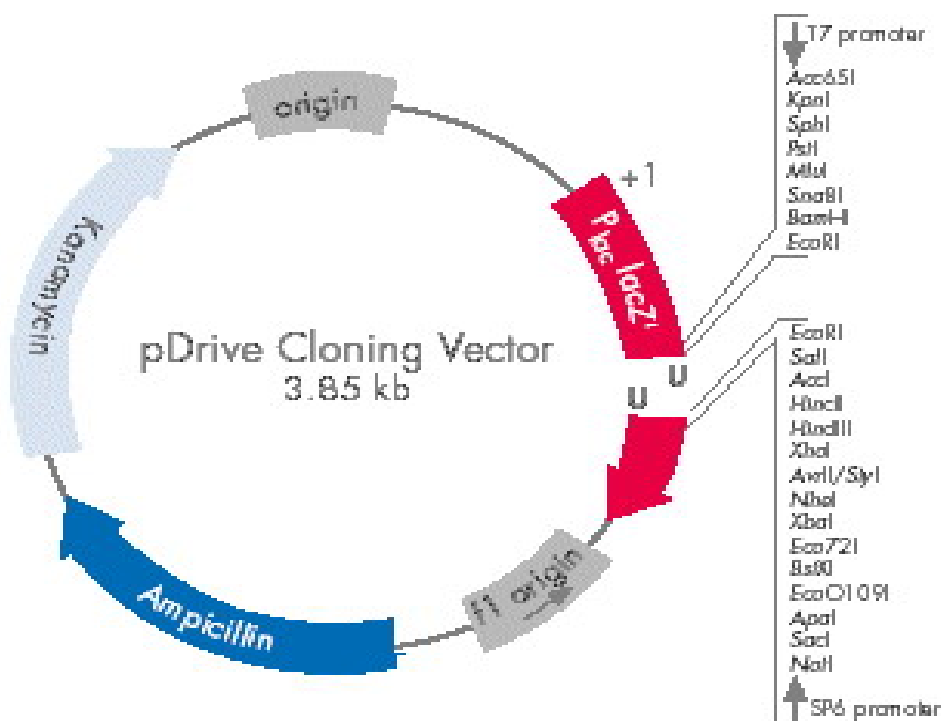
Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất 2x	3,9
10x buffer	1,0
dNTP (2,5 mM)	1,0
Mồi xuôi - F (10 pM)	0,5
Mồi ngược - R (10 pM)	0,5
<i>Taq</i> polymerase (5 u/μl)	0,1
cDNA	3,0
Tổng	10,0

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR:

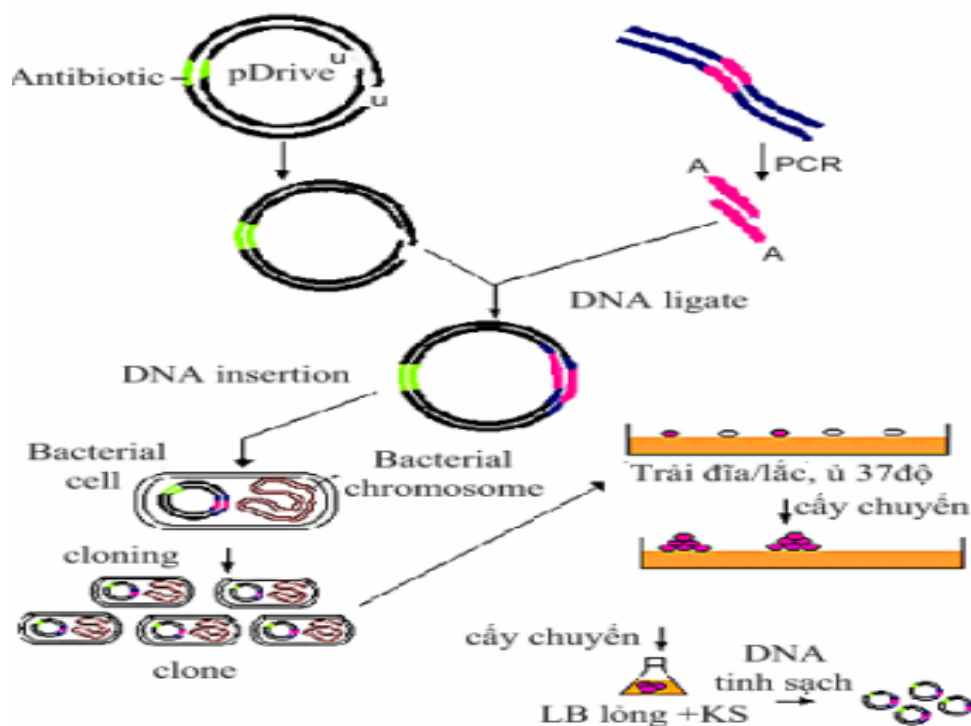
Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 - 34	95°C - 50 giây	55°C - 50 giây	72°C - 2 phút
35			72°C - 10 phút
Bảo quản ở 10°C			

2.2.6. Tách dòng 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII

2.2.6.1. Tách dòng gen



Hình 2.1. Bản đồ vector tách dòng - pDrive cloning vector



Sơ đồ tách dòng 2 đoạn gen A1C2 và A2C3

Để tách dòng gen *A1A2* và *A3C2* trước hết, sản phẩm PCR có dư nucleotid A ở đầu 3' (do sử dụng enzym *Taq* ADN polymerase để khuếch đại) được đưa vào vector tách dòng đã ở dạng thẳng có sẵn nucleotide U ở đầu 3' nhờ sự xúc tác của ADN ligase. Khi đó, một liên kết hydro được hình thành giữa A của sản phẩm PCR và U của vector, một liên kết phosphodiester được hình thành giữa gốc phosphat đầu 5' và gốc hydroxyl đầu 3' của hai nucleotide sát cạnh nhau. Sau đó, vector mang đoạn gen cần tách dòng được biến nạp vào tế bào *E. coli* để chọn lọc và tạo dòng.

Tạo vector tái tổ hợp:

Sản phẩm PCR của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* được trộn lẫn với DNA pDrive cloning vector, dưới tác dụng của enzym T4-ADN ligase, ở điều kiện 16°C, trong 16 giờ để tạo vector tái tổ hợp.

Thành phần phản ứng gắn đoạn gen *A1A2* và *A3C2* vào vector pDrive:

Thành phần	Thể tích (μ l)
Nước cất 2×	2,0
Ligation Master Mix 2x	5,0
DNA pDrive cloning vector (50 ng/ μ l)	1,0
Sản phẩm PCR	2,0
Tổng	10,0

Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* khả biến bằng sốc nhiệt:

- Tế bào khả biến lấy ra từ tủ -70°C được đặt ngay trên đá khoảng 10 phút để làm tan dần.
- Sau đó, 2 μ l sản phẩm lai được cho vào 10 μ l tế bào khả biến, đảo nhẹ để trộn đều. Để hỗn hợp mẫu trong đá 10 phút.
- Để biến nạp DNA vào tế bào, mẫu được làm nóng ở 42°C trong 45 giây. Mẫu được lấy ra và đặt vào đá lạnh trong 2 phút.
- Bổ sung 200 μ l môi trường SOC và lắc mẫu 200 vòng/ phút, ở 37°C , trong 1 giờ.
- Hút 200 μ l mẫu trải trên một đĩa môi trường LB có bổ sung ampicilin, X-gal, IPTG, ủ đĩa ở 37°C qua đêm.

2.2.6.2. Tách chiết DNA plasmid sử dụng KIT QIAgenTMminiprep

- Chọn khuẩn lạc trắng để cấy chuyển sang 3 ml môi trường LB lỏng có bổ sung 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilin nuôi qua đêm ở 37°C , lắc 200 vòng/ phút.
- Hút 2 ml dịch nuôi cấy vào ống 2 ml. Thu cận tế bào bằng ly tâm 5000 vòng/ phút, 10 phút, 4°C .

- Hoà tan tế bào bằng 250 µl dung dịch P1 bằng cách khuấy mạnh trên máy voltex.
- Bổ sung thêm 250 µl dung dịch P2 vào mẫu và đảo nhẹ ống để trộn đều mẫu. Dung dịch trở nên trong suốt và quánh.
- Tiếp tục cho vào 350 µl dung dịch N3, đảo nhẹ. Tủa protein xuất hiện và có màu trắng đục.
- Ly tâm 12000 vòng/ phút trong 15 phút ở 4°C. Hút dịch trong chuyển sang cột QIAprep.
- Ly tâm 12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C nhằm loại bỏ các thành phần là các enzyme nuclease hay các cacbonhydrat cao phân tử.
- Rửa cột QIAprep bằng 500 µl đệm PB, ly tâm 12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C và loại bỏ phần dịch chảy xuống ống thu nhận.
- Tiếp tục rửa các cột QIAprep bằng 750 µl đệm PE, ly tâm 12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C và loại bỏ phần dịch chảy xuống ống thu nhận.
- Các ống này được ly tâm thêm trong 1 phút, 13000 vòng/ phút, 4°C để loại bỏ hoàn toàn đệm rửa ra khỏi cột QIAprep.
- Đặt cột QIAprep sang ống thu mẫu 1,5 ml, lấy 50 µl đệm EB và đưa vào tâm cột, để yên 1 phút. Sau đó, ly tâm 13000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C, để thôi DNA plasmid ra khỏi cột. Loại bỏ cột và cất giữ mẫu ở -20°C.

2.2.6.3. Kiểm tra hiệu quả tách dòng bằng phản ứng PCR

Để kiểm tra sự có mặt của các đoạn gen cần tách dòng trong các plasmid tái tổ hợp chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với từng cặp mồi *A1A2* và *A3C2*. Thành phần và chu trình nhiệt độ phản ứng PCR như sau:

Thành phần phản ứng PCR:

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất 2×	6.9
10× buffer	1.0
dNTP (2,5 mM)	1.0
Mồi xuôi - F (10 pM)	0.5
Mồi ngược - R (10 pM)	0.5
Taq polymerase (5 u/μl)	0.1
Khuẩn lạc <i>E.coli</i> trắng	
Tổng	10.0

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR:

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 - 34	95 °C - 50 giây	55 °C - 50 giây	72 °C - 2 phút
35			72 °C - 10 phút
Bảo quản ở 10 °C			

Sản phẩm PCR cũng được điện di kiểm tra trên gel agarose cùng với mẫu PCR đối chứng dương và thang marker chuẩn. Từ đó, chúng tôi xác định được những plasmid mang đoạn gen cần tách dòng. Những plasmid này sẽ được kiểm tra tiếp bằng phương pháp cắt với enzyme giới hạn.

2.2.6.4. Kiểm tra hiệu quả tách dòng bằng enzyme cắt giới hạn

Những plasmid tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng phản ứng PCR cho kết quả dương tính tiếp tục được kiểm tra bằng enzym giới hạn. Các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp này được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, có bổ sung Ampicilin. Sau đó, DNA của những plasmid tái tổ hợp được tách chiết theo quy trình mô tả ở mục 2.2.5.2 và được xử lý với các enzym giới hạn.

Thành phần phản ứng cắt plasmid mang đoạn *A1A2* với enzym *SphI* và *SalI* như sau:

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất 2×	5,0
Đệm Tango 10×	1,0
Enzym <i>SphI</i> (10 U/ μl)	1,0
Enzym <i>SalI</i> (10 U/ μl)	1,0
DNA plasmid - A1A2	2,0
Tổng	10,0

Thành phần phản ứng cắt plasmid mang đoạn *A3C2* với enzym *BamHI* và *SalI* như sau:

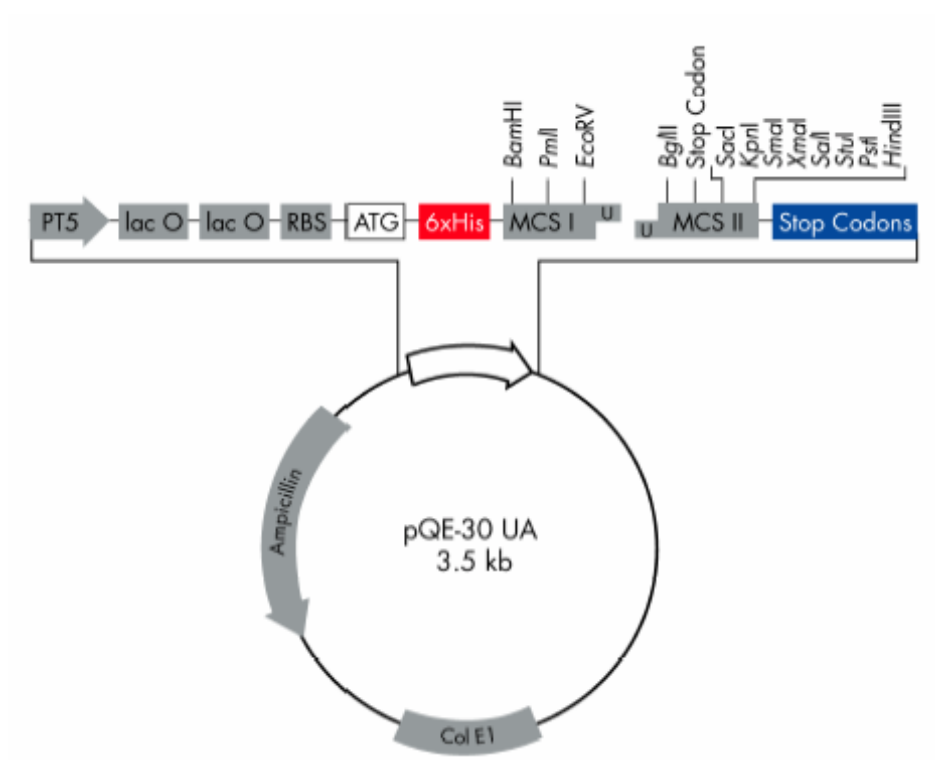
Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất 2×	5,0
Đệm Tango 10×	1,0
Enzym <i>BamHI</i> (10 U/ μl)	1,0
Enzym <i>SalI</i> (10 U/ μl)	1,0
DNA plasmid - A3C2	2,0
Tổng	10,0

Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 5 giờ, sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.2.7. Thiết kế vector biểu hiện yếu tố VIII

2.2.7.1. Đưa đoạn gen A1A2 và A3C2 vào vector biểu hiện

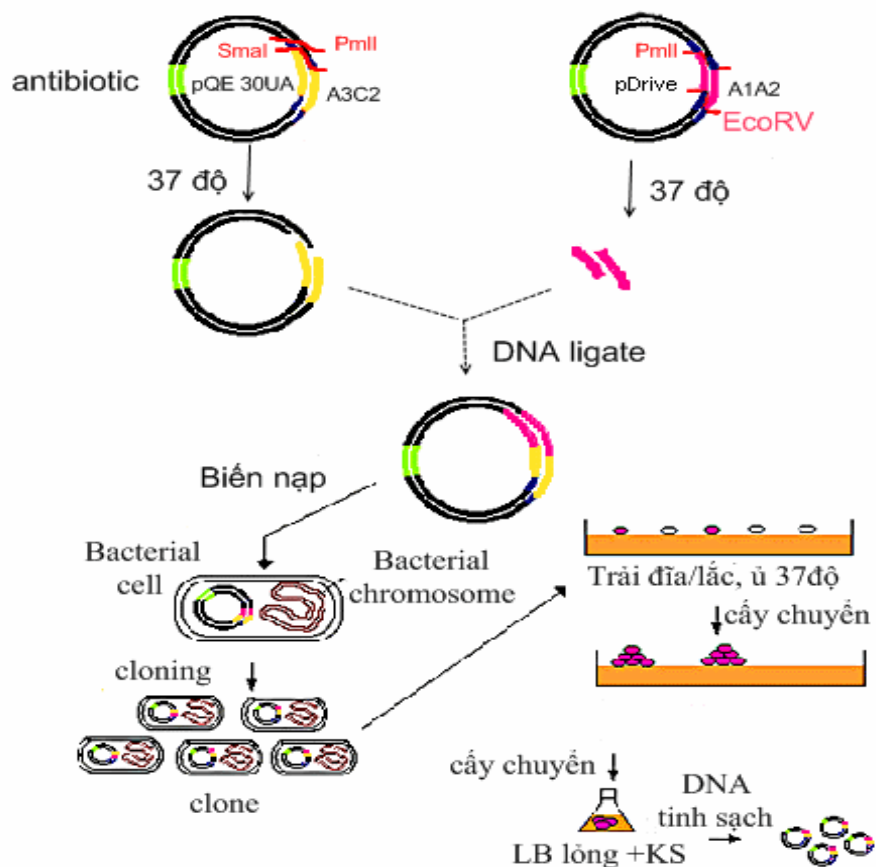
Chúng tôi sử dụng vector biểu hiện pQE-30UA có kích thước 3,5 kb và đặc điểm như sau (hình 2.2).



Hình 2.2. Bản đồ vector biểu hiện pQE-30UA

a) Tạo vector tái tổ hợp

Vector biểu hiện pQE-30UA ở dạng thẳng, mang nucleotid U ở đầu 3' sẵn sàng liên kết với nucleotid A ở đầu 3' của sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *A1A2* và *A3C2* dưới tác dụng của enzym T4-DNA ligase, ở điều kiện 16°C trong 16 giờ (qua đêm).



Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện mang gen A1A2

Thành phần phản ứng gắn đoạn gen *A1A2* và *A3C2* vào vector pQE-30UA như sau:

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất 2×	2,0
Ligation Master Mix 2x	5,0
DNA pQE-30UA vector (50 ng/μl)	1,0
Sản phẩm PCR	2,0
Tổng	10,0

Sau đó, các vector tái tổ hợp mang đoạn gen *A1A2* và *A3C2* được biến nạp vào tế bào *E.coli* khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt theo quy trình như mục 2.2.6.1.

b) Kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* trong vector biểu hiện pQE-30UA bằng phương pháp PCR

Tiến hành theo quy trình mục 2.2.6.3.

c) Kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* trong vector biểu hiện pQE-30UA bằng phương pháp cắt enzym giới hạn

Những khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp cho kết quả PCR dương tính được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, tách chiết DNA theo quy trình mục 2.2.6.2. Sau đó, DNA plasmid được cắt với các enzym giới hạn với thành phần phản ứng như sau:

- Thành phần phản ứng cắt plasmid mang đoạn *A1A2* với enzym *PmlI* và *EcoRV*:

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cắt 2×	5,0
Đệm Tango 10×	1,0
Enzym <i>PmlI</i> (10 U/μl)	1,0
Enzym <i>EcoRV</i> (10 U/μl)	1,0
DNA plasmid-A1A2	2,0
Tổng	10,0

- Thành phần phản ứng cắt plasmid mang đoạn *A3C2* với enzyme *SmaI* và *SalI*:

Thành phần	Thể tích (μ l)
Nước cất 2×	5,0
Đệm Tango 10×	1,0
Enzym <i>Sma</i> I (10 U/ μ l)	1,0
Enzym <i>Sal</i> I (10 U/ μ l)	1,0
DNA plasmid-A3C2	2,0
Tổng	10,0

Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 5 giờ. Sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% cùng với thang marker chuẩn.

2.2.7.2. Đưa đoạn gen *A1A2* vào vector biểu hiện đã mang đoạn gen *A3C2*

a) Xử lý vector biểu hiện mang đoạn gen *A1A2* (pQE-30UA-*A1A2*) bằng enzym *Pml*I, *EcoRV* và đoạn gen *A3C2* (pQE-30UA-*A3C2*) bằng enzym *Pml*I và *Sma*I.

Thành phần và điều kiện phản ứng cắt enzym được thực hiện như sau: Đoạn gen *A1A2* với 2 đầu dính được tạo thành bởi enzym *Pml*I (đầu cắt sole) và *EcoRV* (đầu cắt bằng); vector biểu hiện pQE-30UA mang đoạn *A3C2* với 2 đầu dính được tạo thành bởi enzym *Pml*I và *Sma*I (đầu cắt bằng). Thành phần phản ứng cắt plasmid pQE-30UA-*A1A2* với enzym *Pml*I và *EcoRV*:

Thành phần	Thể tích (μ l)
Nước cất 2×	11,0
Đệm Tango 10×	3,0
Enzyme <i>Pml</i> I (10 U/ μ l)	3,0
Enzyme <i>EcoRV</i> (10 U/ μ l)	3,0
pQE-30UA- <i>A1A2</i>	10,0
Tổng	30,0

- Thành phần phản ứng cắt plasmid pQE-30UA-A3C2 với enzym *PmlI* và *SmaI*:

Thành phần	Thể tích (μ l)
Nước cất 2×	11,0
Đệm Tango 10×	3,0
Enzym <i>PmlI</i> (10 U/ μ l)	3,0
Enzym <i>SmaI</i> (10 U/ μ l)	3,0
pQE-30UA-A3C2	10,0
Tổng	30,0

- Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C qua đêm.

b) Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 1% cùng với thang marker chuẩn

c) Tinh sạch DNA từ gel agarose sử dụng Kit QIAquick Gel Extraction

- Sau khi xác định đoạn DNA cần tách trên bản gel điện di, cắt mảnh gel chứa đoạn này cho vào ống 1,5 ml và cân xác định trọng lượng.

- Cho vào ống đệm QG theo tỷ lệ 3:1 (thể tích đệm trên trọng lượng gel chứa mẫu) và ủ ở 50°C trong 10 phút cho mảnh gel bị hòa tan hoàn toàn.

- Thêm 1 thể tích isopropanol vào nếu đoạn DNA có độ dài trên 4 kb.

- Để thu DNA, toàn bộ hỗn hợp trên được cho vào cột QIA, cột này đã được đặt trong ống thu nhận và ly tâm 12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C. Loại bỏ phần dịch chảy xuống ống thu nhận

- Tiếp tục thêm 0,5 mL đệm QG vào cột QIA và ly tâm 12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C để loại bỏ hoàn toàn các cặn của gel điện di.

- Rửa cột QIA bằng 0,75 mL đệm PE, ly tâm 12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C. Loại bỏ phần dịch và tiếp tục ly tâm 12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C.

- Các cột QIA được đặt vào các ống thu mẫu 1,5 ml. Để thu mẫu DNA, 25 μ l nước cất vô trùng được cho vào phần tâm cột và để yên 1 phút. Sau đó, ly tâm

12000 vòng/ phút, 1 phút, 4°C, để thôi DNA ra khỏi cột. Loại bỏ cột và cất giữ mẫu ở -20°C.

- Sản phẩm thôi gel sau khi tinh sạch được điện di kiểm tra lại trên gel agarose 0,8% trước khi tiến hành phản ứng lai.

d) Đưa đoạn gen *PmlI*-A1A2-*EcoRV* vào vector biểu hiện pQE-30UA-A3C2 đã mở vòng bằng enzym *PmlI* và *SmaI*

Đoạn gen *PmlI*-A1A2-*EcoRV* được nối vào vector biểu hiện pQE-30UA-A3C2 đã mở vòng bằng enzym *PmlI* và *SmaI* nhờ T4-DNA ligase ở điều kiện 16°C qua đêm.

Thành phần phản ứng gắn đoạn gen *PmlI*-A1A2-*EcoRV* vào vector biểu hiện pQE-30UA-A3C2 như sau:

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất 2×	4,0
Ligation Master Mix 2x	10,0
pQE-30UA-A3C2	2,0
<i>PmlI</i> -A1A2- <i>EcoRV</i>	4,0
Tổng	20,0

Hỗn hợp phản ứng lai được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E.coli* bằng phương pháp sốc nhiệt.

đ) Kiểm tra sự có mặt của đoạn gen A1A2A3C2 trong vector biểu hiện pQE-30UA bằng phương pháp PCR

- Chọn một số khuẩn lạc mọc riêng biệt, nuôi cấy trong 3 ml môi trường LB lỏng có ampicillin (100 μg/ ml) và kanamycin (25 μg/ ml), ở điều kiện 37°C, qua đêm.

- Ly tâm thu tế bào và tách chiết DNA plasmid theo quy trình mục 2.2.6.2
- Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi A1A2-F và A3C2-R. Đoạn gen *A1A2A3C2* được nhân có kích thước khoảng 5100 bp.

Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất 2×	4,8
10×buffer	1,0
dNTP (2,5 mM)	1,0
Mồi A1A2 - F (10 pM)	1,0
Mồi A3C2 - R (10 pM)	1,0
<i>Taq</i> polymerase (5 u/μl)	0,2
DNA plasmid A1C2 (1:10)	1,0
Tổng	10,0

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 10 phút		
2 - 34	95°C - 50 giây	58°C - 50 giây	68°C - 3 phút
35			68°C - 10 phút
Bảo quản ở 10°C			

e) Kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *A1A2A3C2* trong vector biểu hiện pQE-30UA bằng phương pháp cắt enzym giới hạn.

- Thành phần phản ứng cắt plasmid pQE-30UA-*A1A2A3C2* với enzym *PmlI* và *SalI*:

Thành phần	Thể tích (μ l)
Nước cất 2×	5,5
Đệm Tango 10×	1,5
Enzym <i>PmlI</i> (10 U/ μ l)	2,0
Enzym <i>SalI</i> (10 U/ μ l)	2,0
DNA plasmid pQE-30UA- <i>A1A2A3C2</i>	4,0
Tổng	15,0

2.2.8. Biểu hiện protein yếu tố VIII

Biểu hiện protein yếu tố VIII

- Khuẩn lạc mang đoạn *A1A2A3C2* đã được kiểm tra bằng 2 phương pháp PCR và enzym cắt giới hạn được cấy chuyển sang 3 ml môi trường LB lỏng có ampicillin (100 μ g/ ml) và kanamycin (25 μ g/ ml), nuôi lắc 200 vòng / phút, ở điều kiện 37°C, qua đêm.

- Chuyển 500 μ l tế bào sang 50 ml môi trường LB lỏng có ampicillin (100 μ g/ ml) và kanamycin (25 μ g/ ml), nuôi lắc 200 vòng / phút, ở điều kiện 37°C, cho đến khi OD₆₀₀ khoảng 0,5 - 0,6 (khoảng 5 giờ).

- Thu 2 ml tế bào cho vào ống eppendorf (giai đoạn T0).
- Thêm vào bình nuôi cấy 50 μ l IPTG 1M.
- Thu 2 ml tế bào các giai đoạn T1, T2, T3 cách nhau 1 giờ.
- Ly tâm 12000 vòng/ phút/ 4°C, trong 1 phút, thu cặn tế bào.
- Hòa tan tế bào trong 400 μ l đệm B (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-Cl; 8 M Urea; pH 8,0). Phá tế bào bằng vortex.

- Ly tâm 12000 vòng/ phút/ 4°C, trong 30 phút, thu dịch protein tế bào.

- Cân bằng cột Ni-NTA bằng 600 μ l đệm B. Ly tâm 2000 vòng/ phút/ 4°C, trong 2 phút.
- Chuyển hết mẫu protein sang cột Ni-NTA đã cân bằng. Ly tâm 2000 vòng/ phút/ 4°C, trong 2 phút.
- Rửa cột Ni-NTA 2 lần với 600 μ l đệm C (100 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM Tris-Cl; 8 M Urea; pH 6,3). Ly tâm 2000 vòng/ phút/ 4°C, trong 2 phút.
- Thôi protein 2 lần với 200 μ l đệm E (100 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM Tris-Cl; 8 M Urea; pH 4,5). Ly tâm 2000 vòng/ phút/ 4°C, trong 2 phút.

2.2.8.1. Đánh giá mức độ biểu hiện yếu tố VIII bằng Western blot

a) Chuẩn bị mẫu protein và điện di trên gel polyacrylamid

- Trộn 2.5 μ l 5 $\times$ đệm biến tính mẫu và 10 μ l mẫu protein. Biến tính mẫu ở 95°C trong 5 phút.
- Tiến hành điện di biến tính các mẫu protein trên gel polyacrylamid 12% (SDS-PAGE), cùng với marker chuẩn, ở điều kiện 120V, trong 2 giờ.
- Nhuộm bản gel polyacrylamid trong coomassie blue trong 1 giờ.
- Tẩy bản gel trong dung dịch tẩy gel (450 ml methanol, 100 ml acid acetic, nước cất đủ 1 L) cho đến khi nhìn thấy rõ các băng protein.

b) Quá trình chuyển màng và western blot được thực hiện như sau:

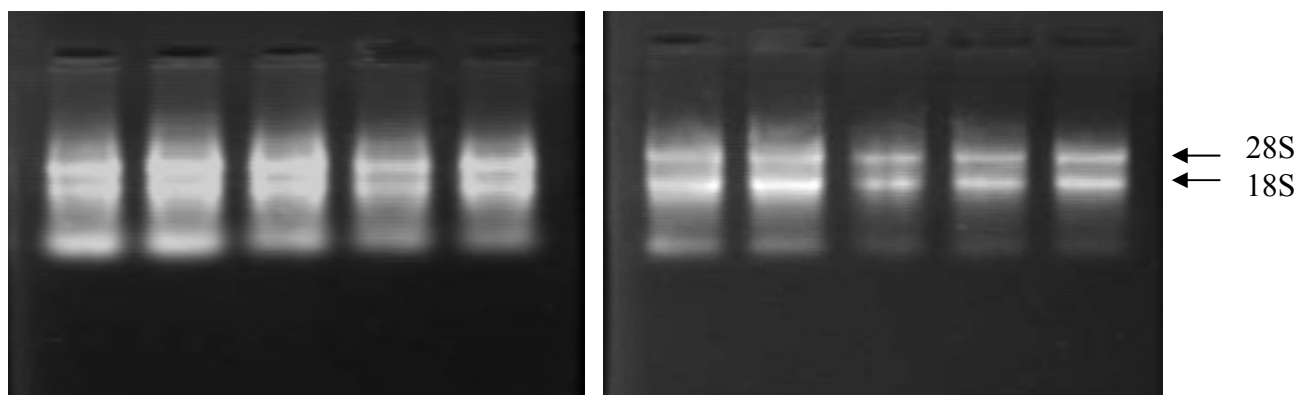
- Mẫu protein được điện di biến tính trên gel polyacrylamid 12% (SDS-PAGE) đồng thời, vị trí mẫu là như nhau.
- Bản gel sau điện di được hoạt hóa trong đệm chuyển màng 15 phút (glycine 2,9 g, tris 5,8 g, SDS 0,37 g, methanol 200 ml, nước cất vừa đủ 1 L) để chuyển màng.
- Màng PVDF được cắt bằng diện tích gel và hoạt hóa trong methanol 30 giây.

- Sau khi ngâm gel trong đệm chuyển đủ thời gian, sắp xếp gel, màng và giấy đệm Whatman 3 MM vào hệ thống chuyển màng theo đúng vị trí 2 cực của nguồn điện, nhúng hệ thống trong bể đệm của máy.
- Quá trình chuyển màng được tiến hành trong điều kiện lạnh, 6 mA trên một cm^2 màng, thời gian chuyển màng là 120 phút.
- Kết thúc giai đoạn chuyển protein từ gel sang màng, màng PVDF được lấy ra và nhuộm với đỏ Ponceau S 10 phút, mục đích là kiểm tra chất lượng chuyển protein sang màng.
- Rửa màng trong đệm TBS-T 10 phút, 3 lần (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% v/v).
- Tiếp đó thay đệm ngâm màng bằng đệm blocking TBS-T-BSA (TBS-T có BSA 5%) trong 30 phút.
- Nhỏ kháng thể bậc một kháng protein yếu tố VIII vào đệm phủ cho tới nồng độ cuối cùng khoảng 3 $\mu\text{g/ml}$ (tương ứng với độ pha loãng là 1:1000), thời gian gắn kháng thể cho qua đêm ở 4°C. Rửa màng trong đệm TBS-T 3 lần, mỗi lần 10 phút.
- Pha loãng kháng thể bậc 2 (kháng IgG thỏ gắn alkali photphatase) trong đệm blocking, TBS-T-BSA, 1:10.000 lần (nồng độ cuối cùng khoảng 0,5 - 5 $\mu\text{g/ml}$) và cho ngâm màng trong thời gian 120 phút ở nhiệt độ phòng. Lặp lại bước rửa màng bằng TBS-T 3 lần, mỗi lần 10 phút.
- Bước cuối cùng là cho phát triển màu trực tiếp với dung dịch cơ chất BCIP/NBT, băng protein yếu tố VIII được gắn cộng hợp 2 kháng thể sẽ có màu xanh tím sẫm trên nền trắng của màng PVDF nhờ phản ứng giữa enzym và cơ chất.
- Kết quả được ghi lại bằng máy chụp ảnh chuyên dụng.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ

3.1. Tách chiết RNA tổng số từ mô gan người

Tách chiết RNA là bước đầu tiên trong quy trình nghiên cứu để chuẩn bị nguyên liệu cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp tách chiết RNA khác nhau tùy theo đối tượng và điều kiện nghiên cứu đã được cải tạo và ứng dụng rất hiệu quả. RNA tổng số từ mô gan được tách theo phương pháp sử dụng trizol như đã mô tả ở phần phương pháp. Sau quá trình tách chiết, chúng tôi tiến hành xác định chất lượng, nồng độ và độ sạch của RNA bằng cách đo phổ hấp thụ tử ngoại ở hai bước sóng 260 nm, 280 nm và điện di trên gel agarose 1%. Mẫu RNA thu được có độ tinh sạch khá cao, dao động từ 1,7 - 1,8 (hình 3.1) và nồng độ khoảng 3500 - 4000 ng/ μ l.



Hình 3.1: Hình ảnh điện di RNA tổng số trên gel agarose 1%

Kết quả điện di RNA trên gel agarose cho thấy RNA tách được đạt yêu cầu, không đứt gãy, gồm 2 băng rõ nét là rRNA 28S và 18S.

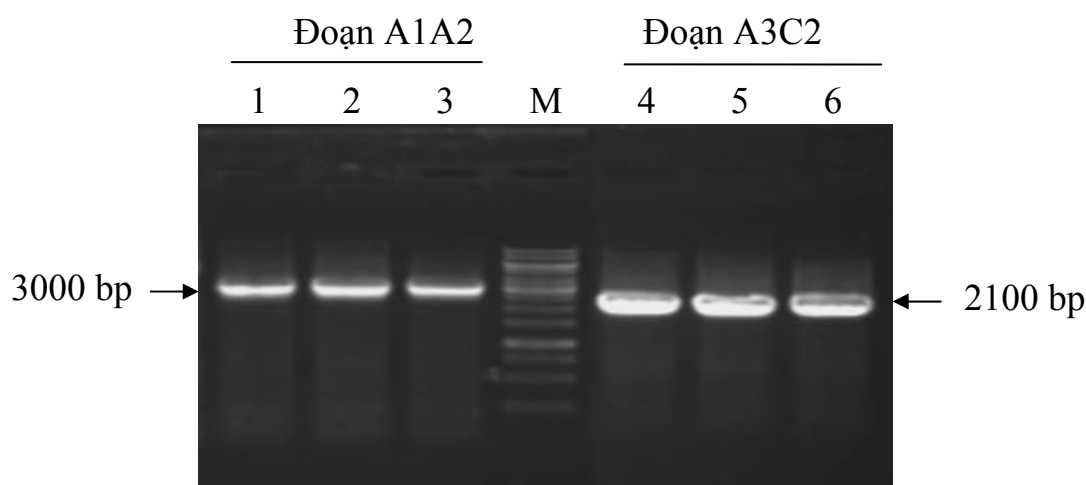
3.2. Tổng hợp cDNA

Mẫu RNA có chất lượng tốt được sử dụng cho phản ứng tổng hợp cDNA theo quy trình được mô tả ở mục 2.2.4. Độ tinh sạch và nồng độ cDNA được xác định

bằng phương pháp quang phổ kế. Mẫu cDNA thu được có độ tinh sạch từ 1,7 - 1,8 và có nồng độ khoảng từ 1400 - 1600 ng/ μ l.

3.3. Khuếch đại 2 đoạn gen A1A2 và A2C3 mã hoá yếu tố VIII

Yếu tố đông máu VIII (Factor VIII) là một chuỗi polypeptid đơn có cấu trúc gồm các vùng A1-A2-B-A3-C1-C2. Trong đó, chuỗi nặng gồm các vùng A1-A2-B và chuỗi nhẹ gồm các vùng A3-C1-C2. Để khuếch đại 2 đoạn gen *A1A2* mã hoá vùng A1-A2 và đoạn gen *A3C2* mã hoá vùng A3-C1-C2 của yếu tố VIII chúng tôi thực hiện phản ứng PCR sử dụng 2 cặp mồi đặc hiệu. Đoạn gen *A1A2* có kích thước 3000 bp và đoạn *A3C2* có kích thước 2100 bp. Với điều kiện thành phần phản ứng và chu trình nhiệt mà chúng tôi đã tối ưu được (phần phương pháp) sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, chỉ gồm 1 băng đặc hiệu và có kích thước đúng như tính toán (Hình 3.2)



Hình 3.2: Sản phẩm khuếch đại 2 đoạn gen. A1A2 (giếng 1-3) và A3C2 (giếng 4-6) mã hoá yếu tố VIII, M: Marker.

3.4. Tách dòng 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII

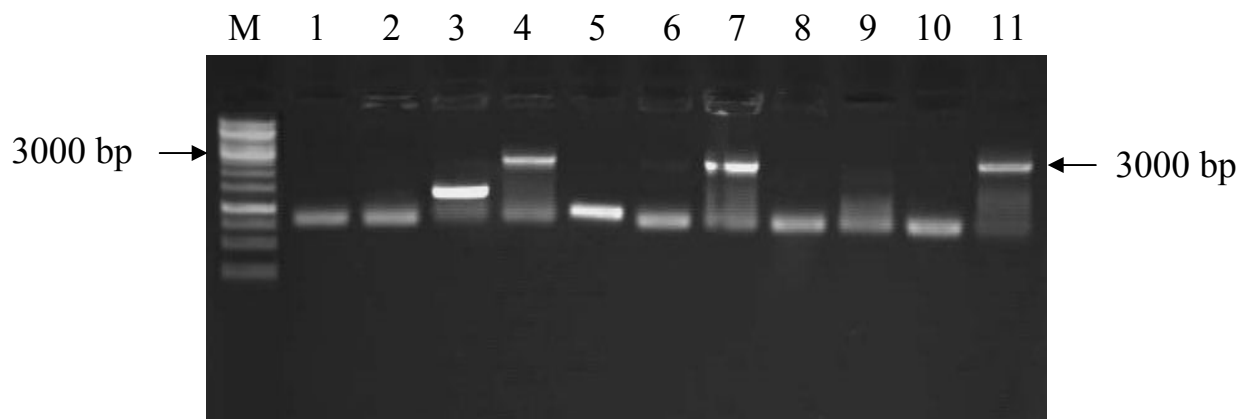
Sản phẩm PCR của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* được lai vào vector tách dòng nhờ tác dụng của enzym T4-DNA ligase. Sau đó vector mang đoạn gen cần tách dòng được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt.

Dựa vào đặc tính của vector pDrive là vector dạng thẳng mang đuôi U ở đầu 5', mang gen kháng ampicilin và gen lacZ α mã hoá cho tiểu phần α của enzym β -galactosidase, vector pDrive được chọn làm vector tách dòng gen. Vector pDrive giúp chọn lọc dòng vi khuẩn mong muốn nhờ việc lựa chọn khả năng sống trên môi trường có kháng ampicilin và khả năng chuyển màu cơ chất X-gal. Khi gen lacZ α hoạt động, enzym β -galactosidase được tạo ra trong môi trường sẽ chuyển hoá cơ chất X-gal, với chất cảm ứng IPTG thành màu xanh. Khi đoạn gen cần tách dòng được gắn vào vector sẽ làm hỏng gen lacZ α , enzym β -galactosidase không được tạo ra, cơ chất X-gal không bị chuyển hoá. Kết quả là những dòng vi khuẩn nào có màu trắng sẽ là những dòng mang gen ngoại lai. Chúng sẽ được xử lý tiếp để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen cần tách dòng.

3.4.1. Kiểm tra hiệu quả tách dòng bằng phản ứng PCR

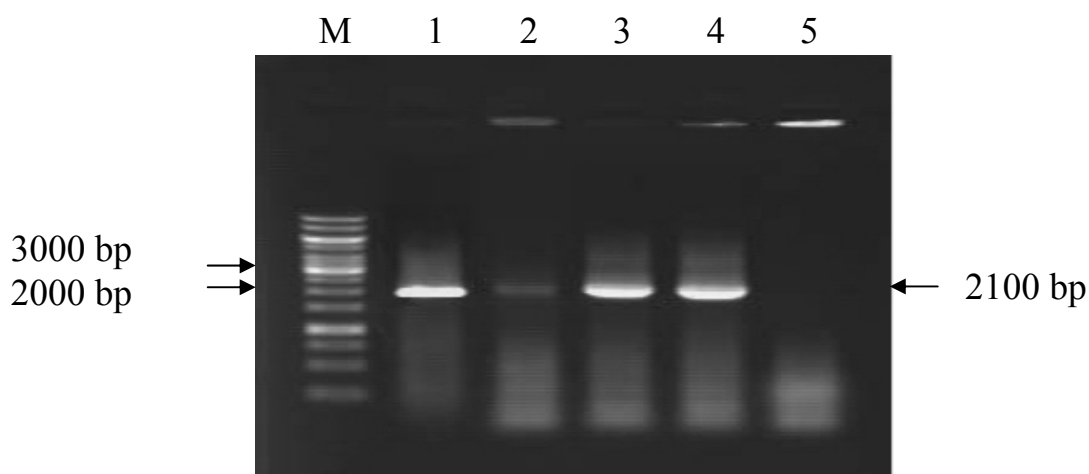
Chúng tôi thực hiện phản ứng PCR cho từng cặp mồi A1A2 và A3C2, sử dụng trực tiếp những tế bào *E.coli* trong khuẩn lạc trắng làm khuôn cho phản ứng PCR với các thành phần khác và điều kiện phản ứng giống như mô tả ở phần phương pháp. Kết quả phản ứng PCR sau khi điện di trên gel agarose được thể hiện ở hình 3.3 và hình 3.4.

Ở hình 3.3, giếng số 4 và 7 có sản phẩm PCR khoảng 3 kb cùng kích thước với mẫu chứng dương (giếng 11) nên có khả năng những plasmid này mang đoạn gen A1A2. Các giếng số 1,2,3,5,6,8,9,10 không có sản phẩm PCR cùng kích thước với chứng dương nên những plasmid này không mang đoạn gen A1A2.



Hình 3.3: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A1A2 mã hoá yếu tố VIII. M: Marker 1 kb; 1-3, 5, 6, 8-10: PCR từ plasmid không mang đoạn *A1A2*; 4, 7: PCR từ plasmid mang đoạn *A1A2*; 11: Chứng dương.

Tương tự, ở hình 3.4, các giếng số 2-4 là các plasmid có khả năng mang đoạn gen *A3C2* vì đều có sản phẩm PCR khoảng 2,1 kb (cùng kích thước với chứng dương giếng số 1). Còn plasmid ở giếng số 5 không mang đoạn gen *A3C2*.

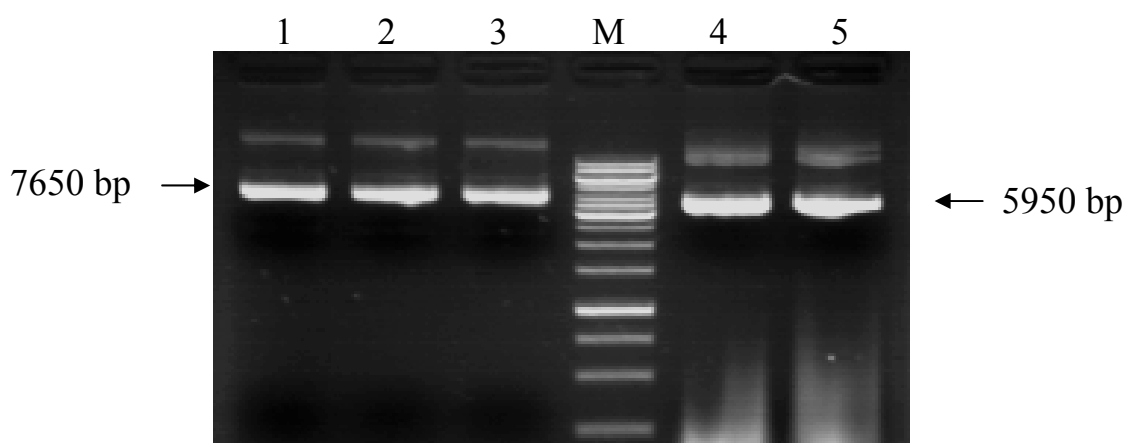


Hình 3.4: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A3C2 mã hoá yếu tố VIII. M: Marker; 1: PCR đối chứng dương; 2-4: PCR từ plasmid mang đoạn *A3C2*; 5: PCR từ plasmid không mang đoạn *A3C2*.

Những plasmid cho kết quả PCR dương tính, chỉ gồm một băng đặc hiệu, có kích thước đúng với vị trí của mẫu PCR chứng dương sẽ tiếp tục được chuyển sang môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicilin. Sau đó, được tách chiết DNA plasmid và xử lý enzym cắt giới hạn để kiểm tra lại sự có mặt của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* trong plasmid.

3.4.2. Kiểm tra hiệu quả tách dòng bằng enzym cắt giới hạn

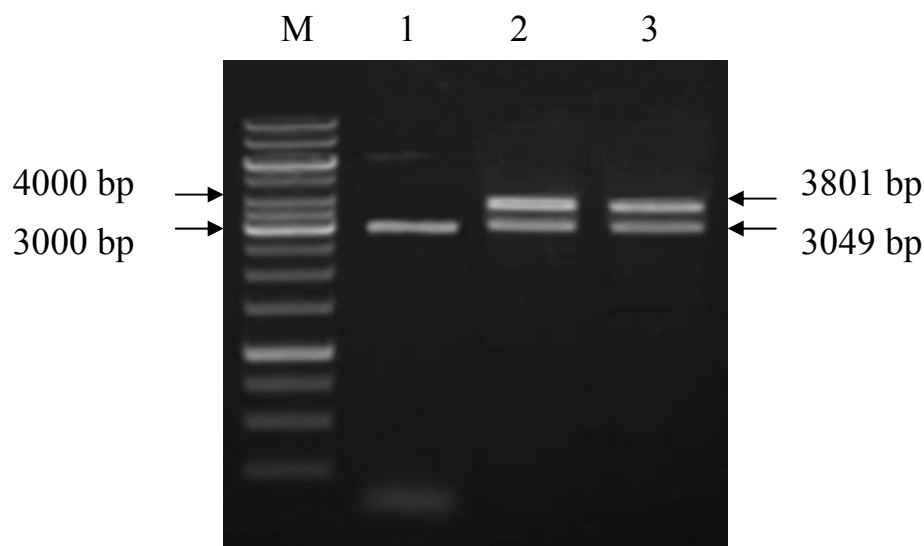
Chúng tôi tiến hành tách chiết DNA plasmid từ những khuẩn lạc mang đoạn gen *A1A2* và *A3C2*. Kết quả điện di được thể hiện ở hình 3.5.



Hình 3.5: DNA plasmid tách chiết từ những khuẩn lạc mang đoạn gen *A1A2* và *A3C2*. M: Marker 1kb; 1-3: plasmid mang đoạn *A1A2*; 4-5: plasmid mang đoạn *A3C2*.

DNA của những plasmid tái tổ hợp của đoạn gen *A1A2* được xử lý với enzym *SphI* và *SalI* để sàng lọc những plasmid mang đúng đoạn gen *A1A2*. Điểm cắt của enzym *SphI* nằm ở vị trí 278 trên vector pDrive. Và điểm cắt của enzym *SalI* nằm ở vị trí 327 trên vector pDrive. Sản phẩm cắt plasmid sau đó được phân tách trên gel

agarose sẽ gồm 1 băng DNA có kích thước 3801 bp (gần tương ứng với kích thước của vector là 3850 bp) và 1 băng DNA có kích thước 3049 bp (gần tương ứng với kích thước của đoạn gen *A1A2* là 3000 bp).

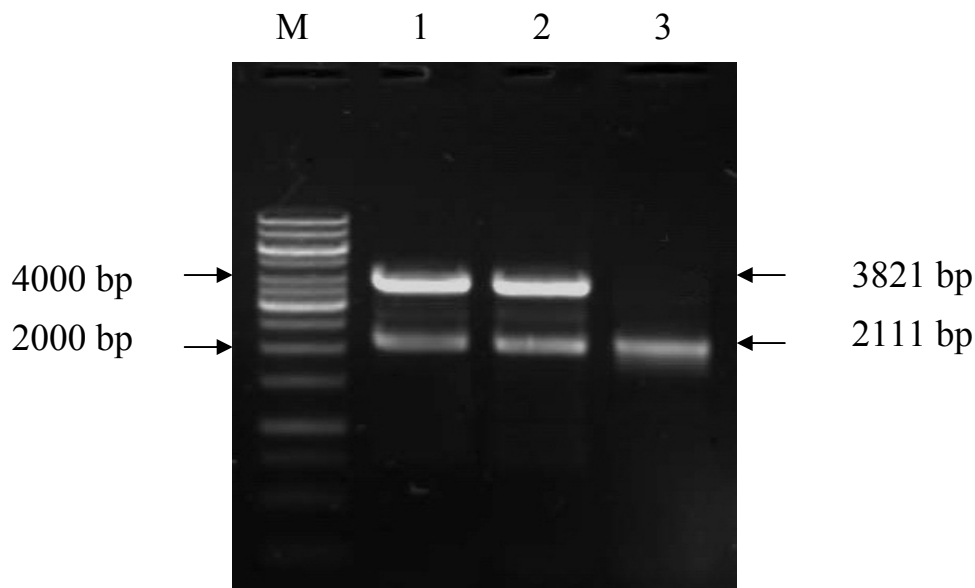


Hình 3.6: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A1A2 với enzym *SphI* và *SalI*. M: Marker 1 kb; 1: Sản phẩm PCR-A1A2; 2-3: Sản phẩm cắt plasmid.

Kết quả điện di thể hiện ở hình 3.6 cho thấy, đoạn gen *A1A2* đã được tách dòng thành công.

Tương tự, DNA plasmid tái tổ hợp của đoạn gen *A3C2* cũng được xử lý với 2 enzym *BamHI* và *SalI*. Điểm cắt của enzym *BamHI* nằm ở vị trí 299 trên vector pDrive. Còn enzym *SalI* có 2 điểm cắt: một ở vị trí 327 trên vector pDrive và một điểm được thiết kế trên trình tự môi ngược của đoạn gen *A3C2* (mục 2.2.5). Sản phẩm cắt enzym sau khi điện di trên agarose sẽ cho 1 băng DNA có kích thước 3821 bp (gần tương ứng với kích thước của vector là 3850 bp), 1 băng DNA có kích

thước 2111 bp (gần tương ứng với kích thước của đoạn gen *A3C2* là 2100 bp) và 1 băng có kích thước 18 bp không quan sát được trên gel agarose (Hình 3.7).



Hình 3.7: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A3C2 với enzym BamHI và SalI. M: Marker 1 kb; 1-2: Sản phẩm cắt plasmid; 3: Sản phẩm PCR-A3C2.

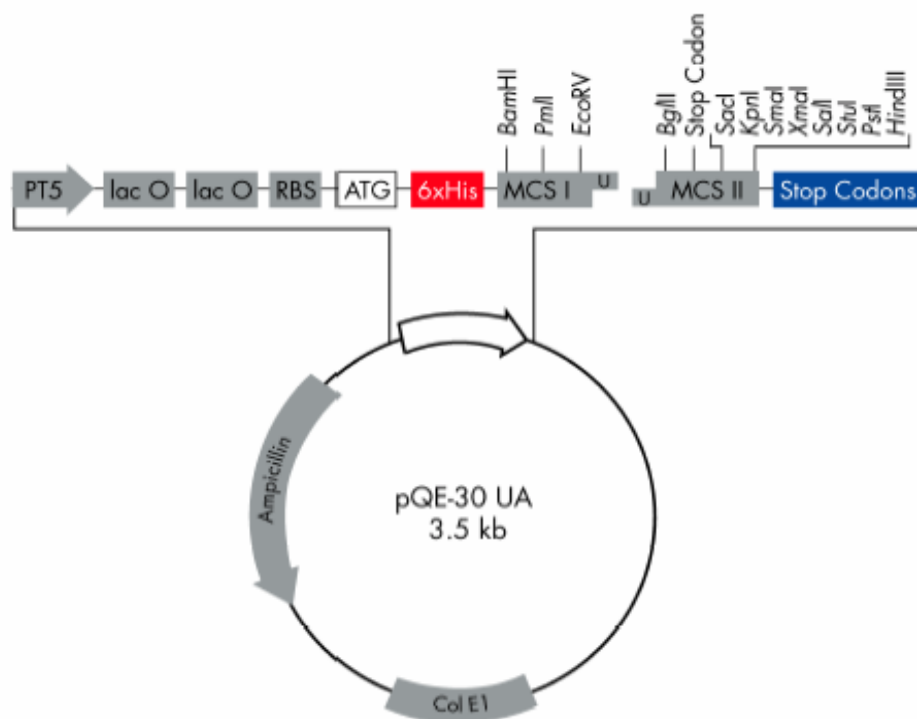
Như vậy, qua kết quả kiểm tra sự có mặt của 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* trong vector tách dòng pDriver bằng cả 2 phương pháp PCR và cắt enzym giới hạn cho thấy, chúng tôi đã tách dòng thành công 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* mã hoá yếu tố VIII.

3.5. Đưa 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII vào vector biểu hiện

3.5.1. Đưa đoạn gen A1A2 và A3C2 vào vector biểu hiện

Positions of elements in bases

Vector size (bp)	3504
Start of numbering at <i>Xho</i> I (CTCGAG)	1-6
T5 promoter/lac operator element	7-87
T5 transcription start	61
6xHis tag coding sequence	127-144
Multiple cloning site I	145-173
Cloning site for PCR product	174-175
Multiple cloning site II	176-235
Lambda t_0 transcriptional termination region	251-345
<i>rnnB</i> T1 transcriptional termination region	1107-1205
ColE1 origin of replication	1681
β -lactamase coding sequence	3299-2439



Hình 3.8: Cấu trúc và vị trí các vùng chức năng của vector biểu hiện pQE-30UA

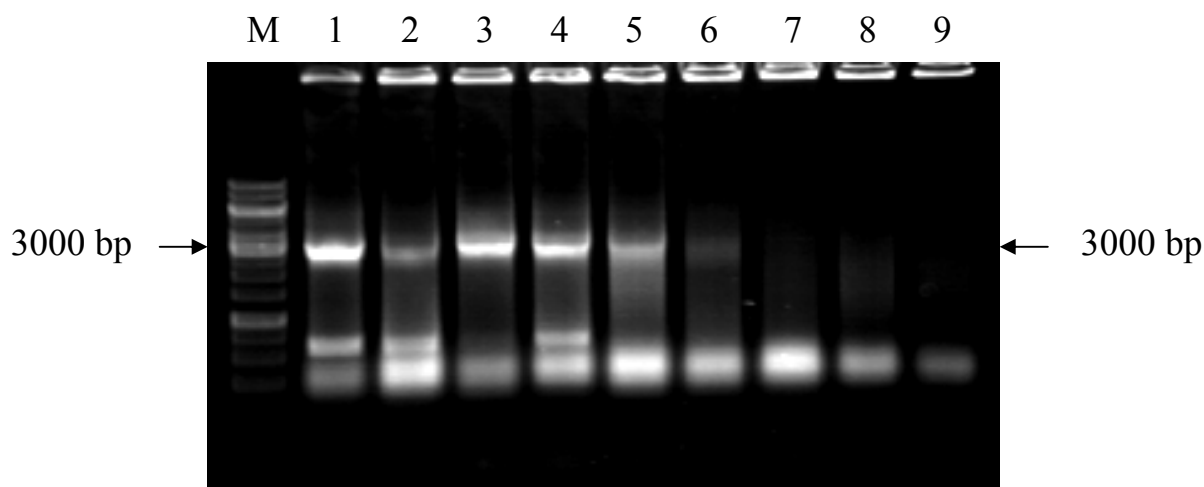
Vector biểu hiện pQE-30UA (3504 bp) mang trình tự khởi động phiên mã (promoter) PT5 được cảm ứng bằng IPTG, peptid tín hiệu của protein lac O, MCS

(Multiple cloning site) của vector mang vị trí nhận biết của enzym *Pml*I, *Eco*RV, *Sma*I và *Sal*I phục vụ cho việc tách dòng, cho phép gen cấu trúc nối chính xác với các trình tự chức năng của vector bao gồm peptid tín hiệu, mã khởi đầu, mã kết thúc, trình tự mã hoá đuôi 6xHis (N-terminal 6xHis tag coding sequence). N-terminal 6xHis tag là một polypeptid gắn vào đầu N của protein biểu hiện, được dùng để tinh chế protein.

Hai đoạn gen *A1A2* và *A3C2* được đưa vào vector pQE-30UA theo quy trình mục 2.2.7.1.a. Sau đó, chúng tôi tiến hành kiểm tra sự có mặt của 2 đoạn gen này trong vector biểu hiện.

a) Kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* trong vector biểu hiện bằng phương pháp PCR

Tiến hành theo quy trình mục 2.2.6.3.

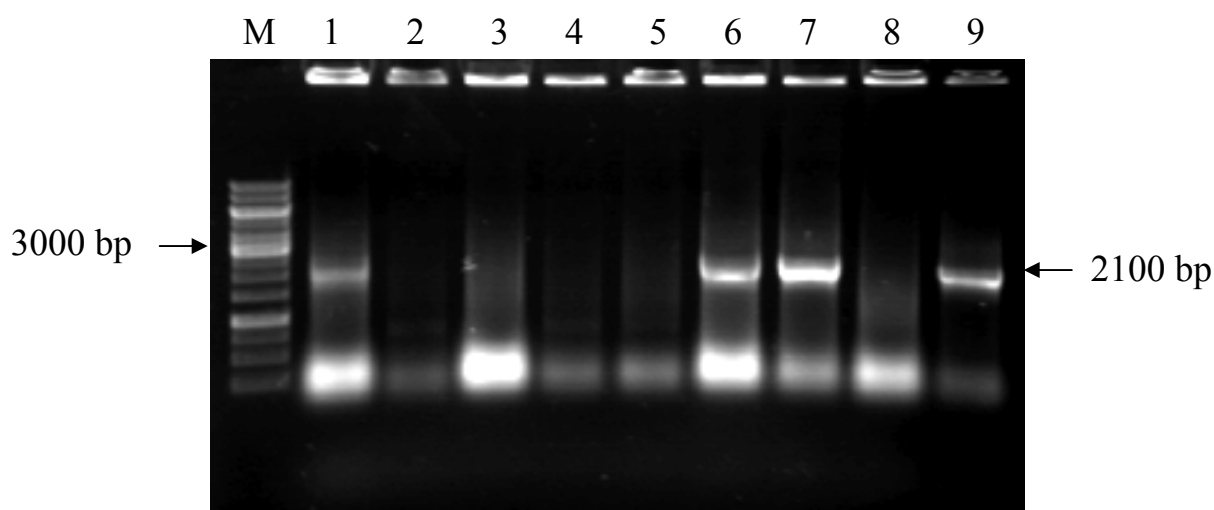


Hình 3.9: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen *A1A2* mã hoá yếu tố VIII. M: Marker 1 kb; 1: PCR đối chứng dương; 2 - 5: PCR từ plasmid mang đoạn *A1A2*; 6 - 9: PCR từ plasmid không mang đoạn *A1A2*

Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen *A1A2* (hình 3.9) cho thấy, sản phẩm PCR có mặt ở giếng số 2, 3, 4 và 5 có kích thước khoảng 3 kb cùng với kích thước của mẫu đối chứng. Như vậy, các plasmid này có thể đã mang đoạn gen

A1A2. Còn plasmid ở giếng số 6, 7, 8 và 9 không mang đoạn gen *A1A2* vì do sản phẩm PCR đã không được khuếch đại.

Tương tự, đối với đoạn gen *A3C2*, những plasmid ở giếng số 2 và 4 cũng có khả năng mang đoạn gen *A3C2*, còn plasmid 3 và 5 không mang đoạn gen *A3C2*. (Hình 3.10).

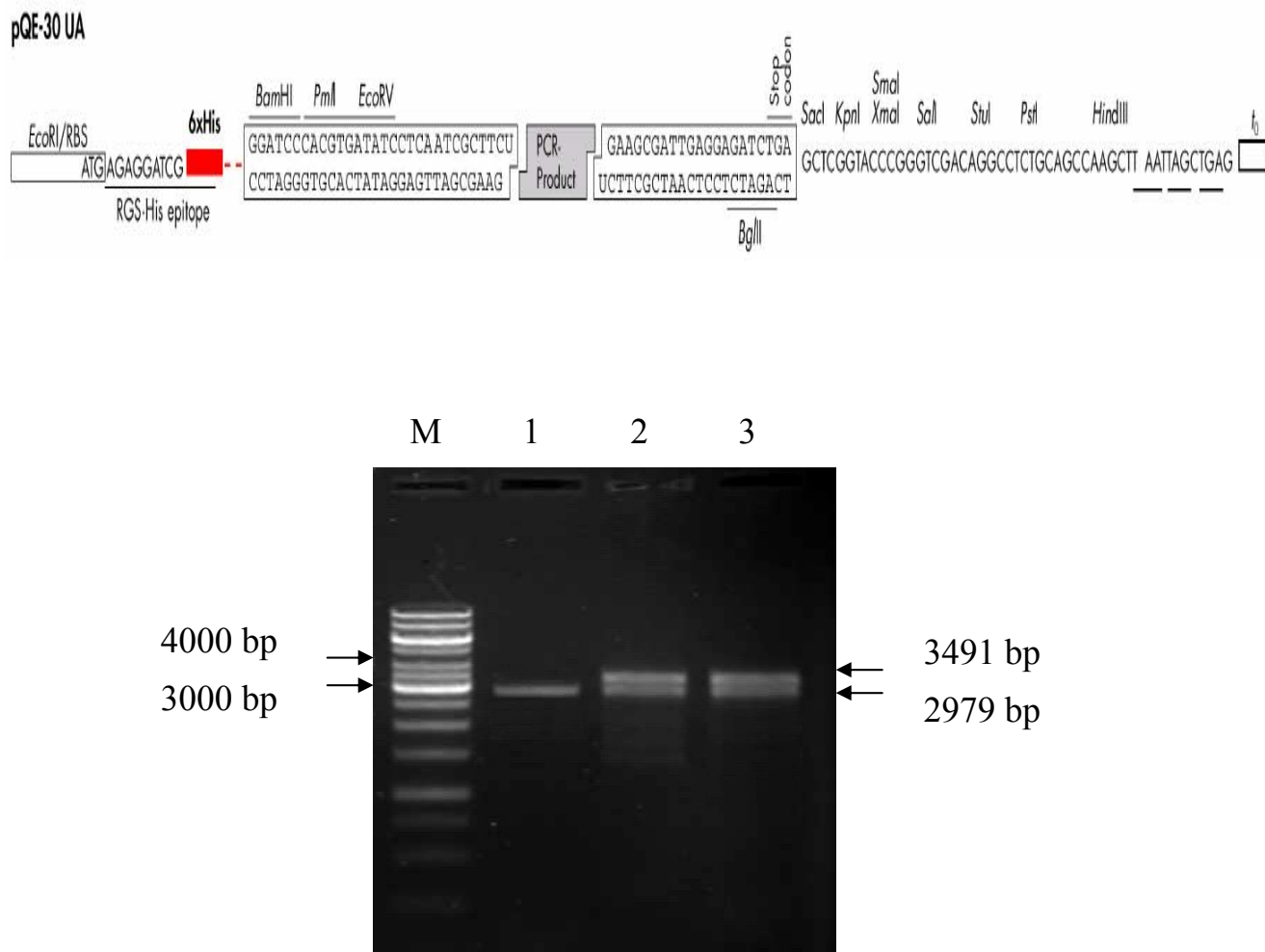


Hình 3.10: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen *A3C2* mã hoá yếu tố VIII. M: Marker; 1: PCR đối chứng dương; 6, 7, 9: PCR từ plasmid mang đoạn *A3C2*; 2, 4, 5, 8: PCR từ plasmid không mang đoạn *A3C2*.

Các plasmid có khả năng mang đoạn gen *A1A2* và *A3C2* tiếp tục được kiểm tra bằng enzym giới hạn.

b) Kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* trong vector biểu hiện bằng phương pháp cắt enzym giới hạn

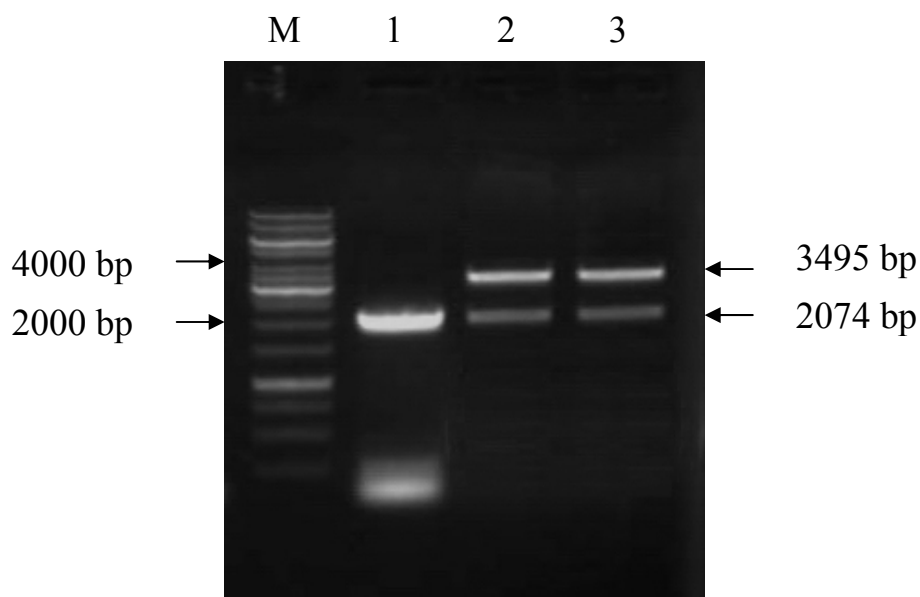
Vị trí các enzym cắt thuộc vùng MCS I và MCS II của vector pQE-30UA như sau:



Hình 3.11: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A1A2 với enzym *Pml*I và *Eco*RV. M: Marker 1 kb; 1: Sản phẩm PCR-A1A2; 2-3: Sản phẩm cắt plasmid.

Đoạn *A1A2*: DNA plasmid được cắt với enzym *Pml*I và *Sal*I. Enzyme *Pml*I có hai điểm cắt: một điểm tại vị trí 153 thuộc vùng MCS I của vector pQE-30UA và một điểm trên trình tự môi xuôi của đoạn gen *A1A2*. Enzyme *Eco*RV cũng có hai điểm cắt: một điểm tại vị trí 158 thuộc vùng MCS I của vector pQE-30UA và một điểm trên trình tự môi ngược của đoạn gen *A1A2*. Sản phẩm cắt gồm 4 đoạn có kích

thước 3495 bp (gần tương ứng với kích thước của vector là 3504 bp), 2979 bp (gần tương ứng với kích thước của đoạn gen *A1A2* là 3000 bp), và 2 đoạn có kích thước 25 bp và 5 bp không quan sát được trên bản gel điện di. (hình 3.11)



Hình 3.12: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A3C2 với enzym *SmaI* và *SalI*. M: Marker 1 kb; 1: Sản phẩm PCR-*A3C2*; 2-3: Sản phẩm cắt plasmid.

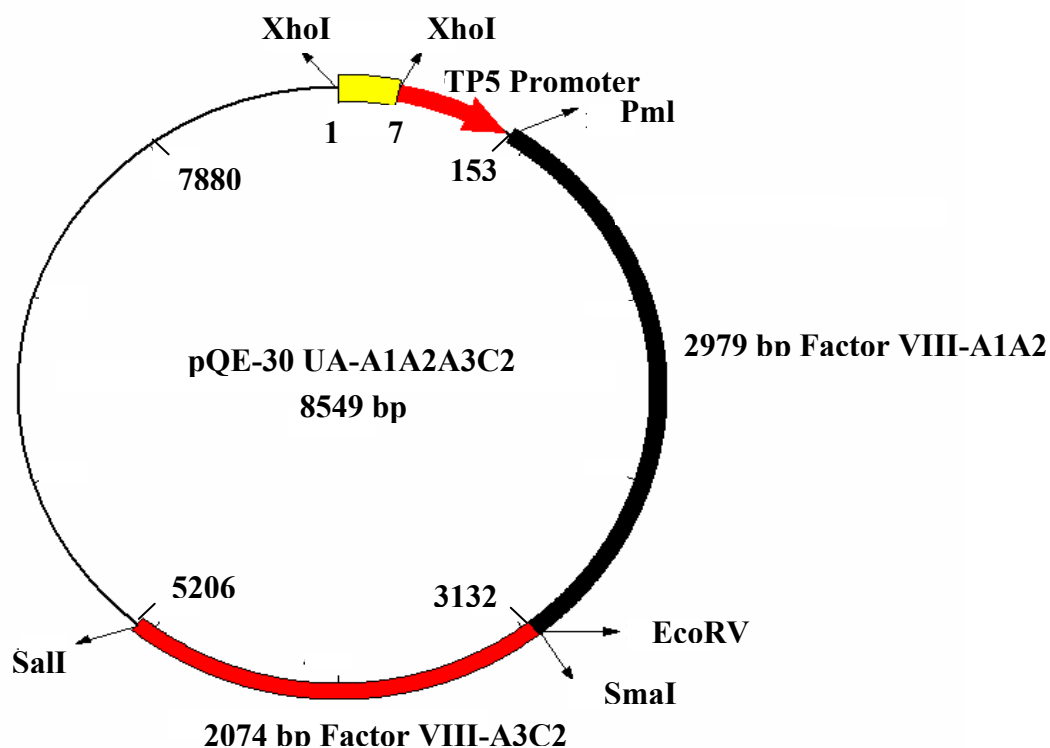
Đoạn *A3C2*: DNA plasmid được cắt với enzym *SmaI* và *SalI*. Enzym *SmaI* có hai điểm cắt: một điểm tại vị trí 186 thuộc vùng MCS II của vector pQE-30UA và một điểm trên trình tự mỗi xuôi của đoạn gen *A3C2*. Enzym *SalI* cũng có hai điểm cắt: một điểm tại vị trí 189 thuộc vùng MCS II của vector pQE-30UA và một điểm trên trình tự mỗi ngược của đoạn gen *A3C2*. Sản phẩm cắt gồm 3 đoạn có kích thước 3499 bp (gần tương ứng với kích thước của vector là 3504 bp), 2074 bp (gần tương

ứng với kích thước của đoạn gen *A3C2* là 2100 bp) và 1 đoạn 31 bp không quan sát được trên gel agarose (hình 3.12).

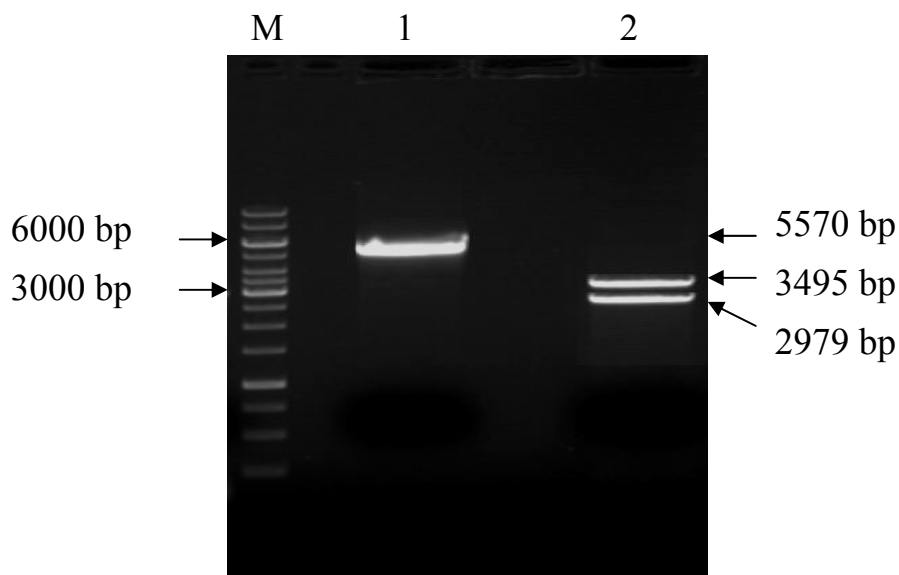
Như vậy, chúng tôi đã đưa được 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* vào vector biểu hiện pQE-30UA.

3.5.2. Đưa đoạn gen *A1A2* vào vector biểu hiện đã mang đoạn gen *A3C2* (pQE-30UA-*A3C2*)

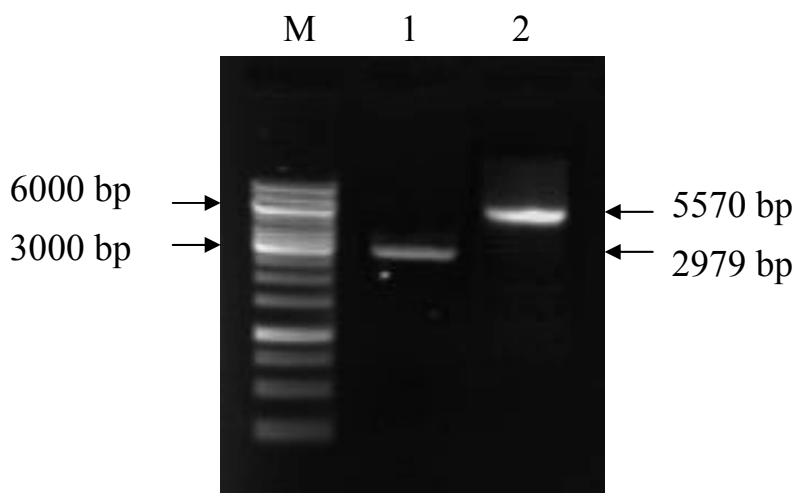
Dưới đây là mô hình vector biểu hiện yếu tố VIII (pQE-30UA-*A1A2A3C2*) chúng tôi sẽ thiết kế:



c) Xử lý vector biểu hiện mang đoạn gen *A1A2* bằng enzym *Pml*I, *EcoRV* và *A3C2* bằng enzym *Pml*I và *Sma*I.



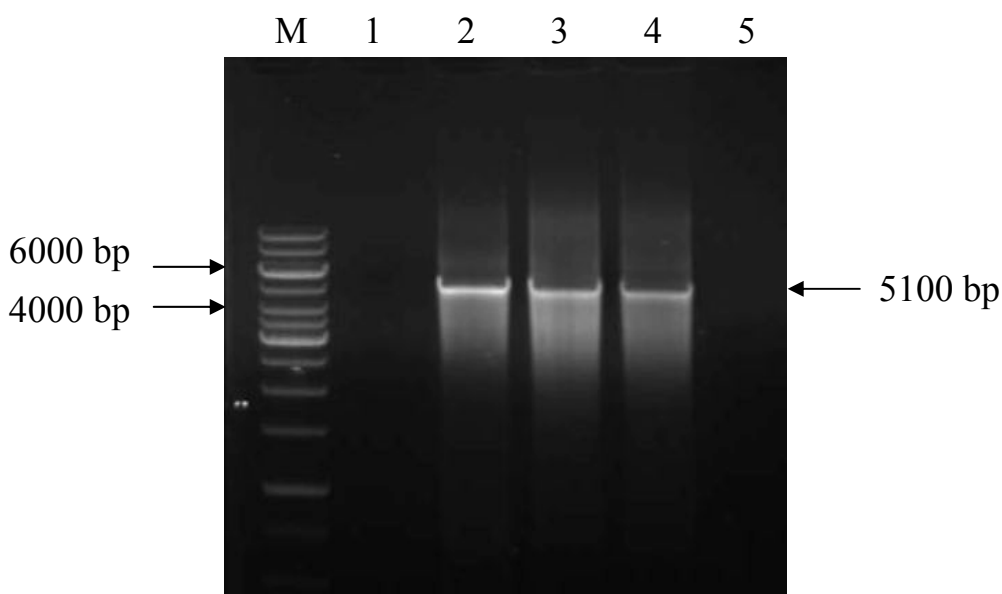
Hình 3.13. Sản phẩm cắt trước khi tinh sạch. 1: p.QE-30UA-A3C2 bằng enzym *Pml*I và *Sma*I; 2: p.QE-30UA-A1A2 bằng enzym *Pml*I và *Eco*RV. M: Marker 1 kb.



Hình 3.14. Sản phẩm cắt sau khi tinh sạch từ gel agarose. 1: p.QE-30UA-A1A2 bằng enzym *Pml*I và *Eco*RV; 2: p.QE-30UA-A3C2 bằng enzym *Pml*I và *Sma*I. M: Marker 1 kb

Để tạo vector biểu hiện yếu tố VIII, vector pQE-30UA-A1A2 được cắt bằng 2 enzym *Pml*I và *Eco*RV. Sau phản ứng cắt thu được đoạn gen *Pml*I-A1A2-*Eco*RV có kích thước 2979 bp, sẽ được tinh sạch bằng kit QIAquickTM Gel Extraction. Đoạn

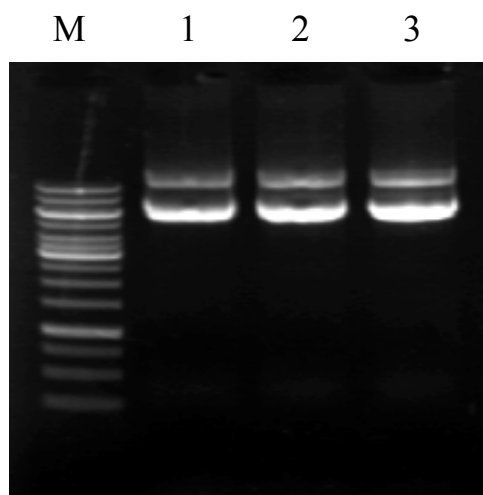
PmlI-A1A2-*EcoRV* sẽ được đưa vào vector biểu hiện pQE-30UA-A3C2 đã mở vòng. Để tạo đầu dính bổ sung với đoạn gen *PmlI*-A1A2-*EcoRV*, vector biểu hiện pQE-30UA-A3C2 cũng được cắt mở vòng bằng 2 enzym *PmlI* và *SmaI*, có kích thước khoảng 5570 bp. Hình ảnh trước và sau khi tinh sạch từ gel agarose của đoạn gen *PmlI*-A1A2-*EcoRV*, vector pQE-30UA-A3C2 đã mở vòng được thể hiện ở hình 3.13 và hình 3.14. Toàn bộ sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E.coli* biểu hiện SG13009 (pREP4).



Hình 3.15. Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A1A2A3C2. M: Marker 1 kb; 1,5: Sản phẩm PCR từ plasmid không mang đoạn gen *A1A2A3C2*; 2-4: Sản phẩm PCR từ plasmid mang đoạn gen *A1A2A3C2*.

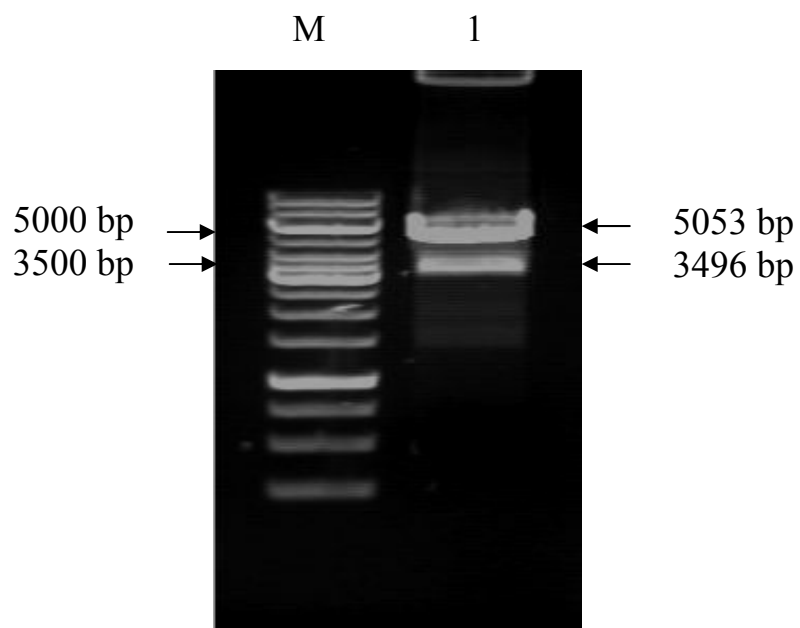
Các thể biến nạp được sơ chọn được kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi A1A2-F, A3C2-R và phương pháp cắt enzym giới hạn. Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen *A1A2A3C2* từ khuẩn lạc cho sản phẩm có kích thước khoảng 5100 bp (Hình 3.15).

Những khuẩn lạc đã được chọn lọc bằng phương pháp PCR cho kết quả dương tính, sẽ tiếp tục được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng và tách chiết DNA. Hình ảnh điện di DNA plasmid được thể hiện ở hình 3.16.



Hình 3.16. DNA plasmid tách chiết từ những khuẩn lạc mang đoạn gen A1A2A3C2. M: Marker 1 kb; 1-3: DNA plasmid mang đoạn gen *A1A2A3C2*

Những plasmid mang đoạn gen sẽ được kiểm tra bằng phương pháp enzym cắt giới hạn. DNA plasmid tách chiết từ thể biến nạp sau khi được xử lý bằng 2 enzym *Pml*I và *Sal*I cho 3 băng: một băng có kích thước khoảng 3496 bp, tương đương với kích thước vector pQE-30UA cắt mở vòng, một băng có kích thước khoảng 5053 bp, tương đương với đoạn gen *A1A2A3C2* và một băng có kích thước 31 bp không nhìn thấy được trên gel agarose (Hình 3.17). Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế plasmid biểu hiện yếu tố VIII.



Hình 3.17. Sản phẩm cắt p.QE-30UA-A1A2A3C2 bằng enzym PmlI và Sall. M: Marker; 1: Sản phẩm cắt p.QE-30UA-A1A2A3C2 bằng enzym *PmlI* và *Sall*.

Các điểm đột biến điểm có thể phát sinh trong quá trình thiết kế vector do vậy chúng tôi tiến hành kiểm tra trình tự những plasmid mang gen mã hóa yếu tố VIII (đã được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt enzym giới hạn). So sánh trình tự đọc được với trình tự GeneBank. Chỉ những plasmid không mang bất cứ một đột biến điểm nào mới được lựa chọn để biểu hiện protein yếu tố VIII.

1	GCTAGCATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGGGATTCTGCTTT	60
1	GCTAGCATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGGGATTCTGCTTT	60
61	AGTGGCACCAGAAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTGATGGGACTATATGCAAAAGT	120
61	AGTGGCACCAGAAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTGATGGGACTATATGCAAAAGT	120
121	GATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTTTCTCTAGAGTGC AAAAATCTTTTCCA	180
121	GATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTTTCTCTAGAGTGC AAAAATCTTTTCCA	180
181	TTCAACACCTCAGTCTGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACGGTTACCTTTTC	240
181	TTCAACACCTCAGTCTGTGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACGGTTACCTTTTC	240
241	AACATCGCTAAGCCAAGGCCACCTGGATGGGTCTGTAGGTCTTACCATCCAGGCTGAG	300
241	AACATCGCTAAGCCAAGGCCACCTGGATGGGTCTGTAGGTCTTACCATCCAGGCTGAG	300
301	GTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCAT	360
301	GTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCAT	360
361	GCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGT	420
361	GCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGT	420
421	CAAAAGGAGAAAGAAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTCTGGCAG	480
421	CAAAAGGAGAAAGAAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTCTGGCAG	480
481	GTCTGTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTT	540
481	GTCTGTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTT	540

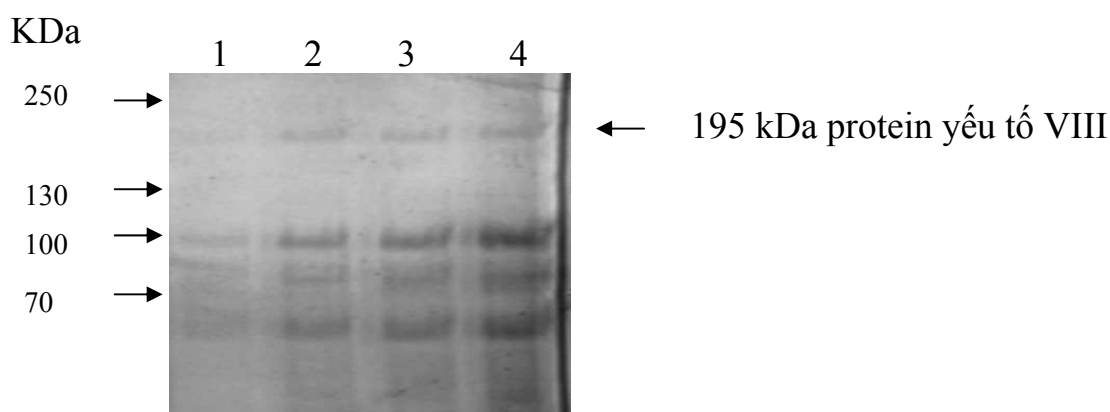
Hình 3.18. Hình minh họa một phần kết quả giải trình tự vector mã hóa yếu tố VIII.

3.6. Biểu hiện protein yếu tố VIII

3.6.1. Biểu hiện protein yếu tố VIII

Chúng tôi sử dụng vector biểu hiện pQE-30UA cùng với chủng tế bào biểu hiện SG13009 có nguồn gốc từ chủng *E.coli* K12.

Quá trình biểu hiện được điều khiển nhờ promoter T5 ở nhiệt độ 37°C. Sau khi cho chất cảm ứng IPTG để kích thích T5 promoter của vector sản xuất protein yếu tố VIII, chúng tôi tiến hành lấy mẫu ở các thời điểm khác nhau để phân tích mức độ biểu hiện protein yếu tố VIII trên tế bào *E. coli*. Trong nghiên cứu của chúng tôi protein có kích thước mong đợi khoảng 195 kDa.

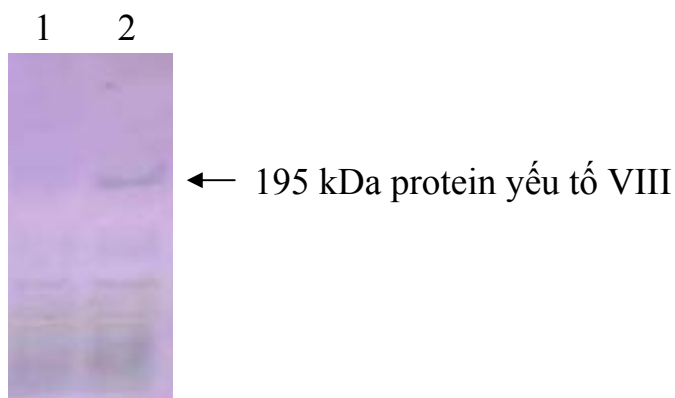


Hình 3.19: Điện di protein tổng số trên gel polyacrylamid 10%. 1: trước khi cho chất cảm ứng IPTG; 2: 1 giờ sau khi cho chất cảm ứng IPTG; 3: 2 giờ sau khi cho chất cảm ứng IPTG và số 4: 3 giờ sau khi cho chất cảm ứng IPTG

Phân tích quá trình biểu hiện yếu tố VIII trên tế bào *E. coli* chúng tôi tiến hành phân tích protein tổng số tách chiết tại thời điểm trước và sau khi cho chất cảm ứng IPTG bằng SDS-PAGE. Hình 3.19 chúng tôi thấy tại thời điểm 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ sau khi cho chất cảm ứng IPTG xuất hiện 1 băng protein kích thước khoảng 195 kDa đúng với kích thước protein đoạn *A1A2A3C2* của yếu tố VIII mà chúng tôi mong đợi, trong khi tại giếng số 1 (trước khi cho chất cảm ứng IPTG) không xuất hiện vạch protein 195 kDa. Tuy nhiên, ở tất cả các giếng đều có một số băng nhỏ xuất hiện ở phía dưới của băng 195 kDa. Do vậy để xác định xem đây có phải là protein mong muốn hay không, chúng tôi tiến hành làm kỹ thuật Western blot với kháng thể đặc hiệu kháng lại yếu tố VIII để đánh giá khả năng biểu hiện protein yếu tố VIII trên tế bào biểu hiện *E. coli*.

3.6.2. Đánh giá biểu hiện yếu tố VIII bằng kỹ thuật Western blot

Khi phân tích mức độ biểu hiện yếu tố VIII của vector p.QE-30UA-*A1A2A3C2* trên tế bào vi khuẩn *E. coli* bằng western blot, chúng tôi thấy tại giếng số 2 xuất hiện một băng đúng với kích thước mong đợi (195 kDa) có phản ứng với kháng thể đặc hiệu chống lại yếu tố VIII (hình 3.20), trong khi ở giếng số 1 (tế bào *E. coli* không mang vector biểu hiện p.QE-30UA-*A1A2A3C2*) không có. Điều này chứng tỏ rằng dưới sự điều khiển của promoter T5 chúng tôi đã biểu hiện được protein đoạn *A1A2A3C2* của yếu tố VIII trên tế bào *E. coli*.



Hình 3.20. Hình ảnh Western blot protein yếu tố VIII. 1: Tế bào *E. coli* không mang vector biểu hiện p.QE-30UA-*A1A2A3C2*; 2: Tế bào *E. coli* mang vector biểu hiện p.QE-30UA-*A1A2A3C2*.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. TÁCH CHIẾT RNA TỔNG SỐ VÀ TỔNG HỢP cDNA

Mọi nghiên cứu và ứng dụng sinh học phân tử đều bắt đầu bằng việc thu nhận một lượng acid nucleic đủ lớn và đủ tinh sạch để có thể tiến hành các thí nghiệm kế tiếp. Các phân tử RNA không bền, dễ bị phân huỷ bởi các enzym ribonuclease (Rnase). Hơn nữa, các Rnase có mặt ở khắp nơi, có hoạt tính rất cao và rất bền vững với các tác nhân thường dùng để loại bỏ enzym (việc xử lý nhiệt ở 90°C trong 1 giờ không làm mất hoạt tính Rnase). Vì các lý do đó, việc tách chiết RNA đòi hỏi nhiều biện pháp thận trọng để tránh mọi tạp nhiễm bởi các Rnase từ môi trường: thao tác trong điều kiện vô trùng, mọi dụng cụ, hoá chất đều được khử trùng bằng nhiệt hay hóa chất, tránh mọi tiếp xúc với dụng cụ bằng tay trần.

Khoảng 90 - 99% tổng số RNA trong tế bào là rRNA (80 - 85%), tRNA (15 - 20%). Các RNA này có kích thước và trình tự xác định, có thể được tách riêng dễ dàng bằng các kỹ thuật như điện di, ly tâm... Còn mRNA chỉ chiếm khoảng 1 - 5% tổng số RNA tế bào, lại có kích thước và trình tự vô cùng đa dạng.

Chúng tôi đã thu được các mẫu RNA có nồng độ khác nhau nhưng vẫn đảm bảo cho phản ứng tổng hợp cDNA. Đồng thời, chất lượng RNA được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose cũng cho thấy, RNA tách chiết không bị đứt gãy nhiều. Như vậy, với phương pháp tách chiết RNA mà chúng tôi sử dụng đã thu được sản phẩm RNA có chất lượng tốt, đảm bảo cho các thí nghiệm tiếp theo.

Sản phẩm cDNA sau khi tổng hợp cũng tiếp tục được xác định nồng độ, đánh giá độ tinh sạch như RNA, và cũng cho kết quả tốt.

4.2. KHUẾCH ĐẠI VÀ TÁCH DÒNG HAI ĐOẠN GEN A1A2 VÀ A3C2

Yếu tố đông máu VIII là một chuỗi polypeptid đơn có cấu trúc gồm các domain A1-A2-B-A3-C1-C2. Trong đó, chuỗi nặng gồm các vùng A1-A2-B và chuỗi nhẹ gồm các vùng A3-C1-C2. Đoạn gen *A1A2* có kích thước 3000 bp và đoạn *A3C2* có kích thước 2100 bp.

Một số nghiên cứu cho thấy rằng, vùng B không cần cho chức năng của yếu tố VIII và sau quá trình dịch mã, vùng B bị cắt khỏi chuỗi nặng của yếu tố VIII sẽ tạo thành phân tử yếu tố VIII có chức năng, mà không ảnh hưởng đến hoạt tính hay tính kháng nguyên của protein yếu tố VIII, và yếu tố VIII cũng được biểu hiện hiệu quả hơn so với yếu tố VIII thể hoang dại (Debra D. Pittman et al, 1993). Vì vậy, chúng tôi chỉ khuếch đại và tách dòng 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* nhằm thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa yếu tố VIII không mang vùng B [29, 33-35].

Với những điều kiện thí nghiệm và phương pháp nghiên cứu đã tối ưu, chúng tôi đã tách chiết được RNA tổng số, tổng hợp cDNA có số lượng và chất lượng tốt. Những sản phẩm trên là tiền đề cho các thí nghiệm tiếp theo. Chúng tôi khuếch đại thành công hai đoạn gen *A1A2* và *A3C2* sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR của đoạn gen *A1A2* chỉ gồm một băng 3000 bp và *A3C2* chỉ gồm một băng 2100 bp đặc hiệu (hình 3.2) đã chứng tỏ rằng chất lượng sản phẩm PCR đảm bảo tiêu chuẩn cho phản ứng tách dòng tiếp theo. Như vậy, điều kiện phản ứng RT-PCR (như đã mô tả trong phần phương pháp) để nhân đoạn gen *A1A2* và *A3C2* là hoàn toàn thích hợp.

Sản phẩm khuếch đại 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* được đưa vào vector tách dòng. Điều này có ý nghĩa hết sức quan trọng, quyết định định hướng nghiên cứu tiếp theo của đề tài là: *i*) Đưa các vùng gen chức năng này vào vector biểu hiện trên hệ vi khuẩn *E.coli* để tổng hợp ra yếu tố VIII tái tổ hợp; và *ii*) Đưa các vùng gen chức năng vào hệ vector biểu hiện trên tế bào động vật phục vụ cho nghiên cứu ứng dụng liệu pháp điều trị gen.

4.3. THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN YẾU TỐ VIII

Trong nghiên cứu này sau khi tiến hành tách dòng được hai đoạn gen *A1A2* và *A3C2* của yếu tố VIII, chúng tôi đã thành công trong việc đưa cả hai đoạn gen này vào vector biểu hiện p.QE-30UA. Hai đoạn gen *A1A2A3C2* của yếu tố VIII nằm sau promoter điều khiển T5 của plasmid pQE-30UA. Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra

bằng kỹ thuật PCR, cắt enzyme giới hạn và đọc trình tự để đảm bảo chắc chắn hai đoạn gen này đã được biến nạp vào vector biểu hiện và không có bất kỳ một điểm đột biến nào có thể phát sinh trong quá trình thiết kế vector (hình 3.16, 3.17 và hình 3.18). Các plasmid được lựa chọn để biểu hiện protein của yếu tố VIII phải đảm bảo các điều kiện là đoạn gen *A1A2A3C2* phải nằm sau promoter T5 và vẫn còn vị trí cắt Arg 372, Arg 740 và vị trí Arg 1689 để đảm bảo rằng trong tương lai khi sử dụng protein tái tổ hợp này để điều trị cho bệnh nhân hemophilia thì vào máu chúng sẽ được hoạt hóa nhờ quá trình phân giải bởi thrombin hoặc yếu tố Xa, khi đó protein tái tổ hợp này sẽ cắt thành 3 đoạn A1, A2 và A3C1C2. Khi vùng A2 sẽ tương tác với phức hợp A1/A3-C1-C2 lúc đó yếu tố VIII thực sự được hoạt hóa và tham gia vào quá trình đông máu. Việc thiết kế thành công vector biểu hiện mang đoạn gen *A1A2A3C2* có một ý nghĩa đặc biệt quan trọng vì đây là hai đoạn gen tham gia vào quá trình đông máu của yếu tố VIII. Vector biểu hiện này sẽ được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli*, tế bào động vật nhằm tạo ra protein yếu tố VIII hoặc được sử dụng như liệu pháp gen để điều trị cho bệnh nhân bị mắc bệnh hemophilia A trong tương lai [28, 34]. Tuy nhiên đây là nghiên cứu bước đầu và do thời gian cũng như kinh phí có hạn nên chúng tôi chỉ đánh giá khả năng biểu hiện protein của yếu tố VIII của vector trên vi khuẩn *E. coli*.

4.4. ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN PROTEIN YẾU TỐ VIII BẰNG WESTERN BLOT

Để kiểm tra khả năng biểu hiện protein *A1A2A3C2* của yếu tố VIII trên tế bào *E. coli*, chúng tôi tiến hành biến nạp vector biểu hiện này vào tế bào vi khuẩn *E. coli* SG13009 và nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có chứa kháng sinh sàng lọc ampicilline và chất cảm ứng IPTG. Trong môi trường nuôi cấy này chỉ có vector mang yếu tố VIII chứa gen kháng kháng sinh ampicilline mới tồn tại và phát triển, điều đó giúp chúng tôi thu được protein với độ thuần khiết cao. Protein tổng số được

tiến hành phân tích bằng SDS-PAGE và trên western blot cho thấy protein tái tổ hợp đoạn *A1A2A3C2* của yếu tố VIII đã được biểu hiện thành công trên tế bào biểu hiện *E. coli*. Dưới sự điều khiển của promoter T5, protein tái tổ hợp *A1A2A3C2* có kích thước khoảng 195 kDa đã phản ứng với kháng thể đặc hiệu kháng lại yếu tố VIII (hình 3.20). Có thể khẳng định rằng, chúng tôi là nhóm nghiên cứu đầu tiên đã nghiên cứu và biểu hiện thành công yếu tố VIII tái tổ hợp trên tế bào vi khuẩn *E. coli* tại Việt Nam. Trên thế giới, đã có rất nhiều tác giả sử dụng các vector khác nhau như vector của adenovirus hay retrovirus biểu hiện thành công yếu tố VIII trên mô hình tế bào động vật [20, 25] và đặc biệt nghiên cứu của tác giả Balagué và cộng sự, tác giả đã sử dụng vector miniAdFVIII của adeno virus có gắn 12,5 kDa của promoter albumin người để điều khiển quá trình tổng hợp yếu tố VIII. Khi sử dụng vector này làm liệu pháp điều trị gen (gene therapy) trên chuột knockout (chuột VIII^{-/-}) cho thấy, vector miniAdFVIII có khả năng tổng hợp được yếu tố VIII của người mà không sinh ra kháng thể chống lại chúng, sau khi được điều trị bằng vector này những con chuột bị bệnh hemophilia A có khả năng cầm máu trong vòng 30 phút sau khi cắt mạch máu ở tai, trong khi đó ở nhóm chứng các con chuột mắc bệnh hemophilia A không được điều trị bằng liệu pháp này không cầm được máu và chết sau đó [22-24].

Hemophilia là một bệnh máu thường gặp trong cộng đồng và là một vấn đề xã hội đáng quan tâm. Tuy các biểu hiện lâm sàng của bệnh đã được nghiên cứu khá đầy đủ, nhưng khó khăn lớn nhất vẫn là vấn đề điều trị và phòng ngừa chảy máu [17, 19]. Với điều kiện trang thiết bị và kỹ thuật ở Việt Nam hiện nay thì việc biểu hiện thành công yếu tố VIII trên tế bào *E. coli* trong nghiên cứu này đã đánh dấu một bước quan trọng trong công tác nghiên cứu và điều trị cho bệnh nhân bị mắc bệnh chảy máu do thiếu hụt yếu tố VIII. Để đánh giá một cách toàn diện chức năng của protein được tổng hợp từ vector biểu hiện này trong nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sẽ:

- Tiến hành tối ưu hóa các điều kiện và môi trường nuôi cấy để sản xuất yếu tố VIII với hiệu suất cao nhất trong tế bào vi khuẩn *E. coli*.
- Tiến hành tách chiết và tinh sạch với độ tinh khiết cao nhất, nghiên cứu sử dụng cho các thử nghiệm trên mô hình động vật.
- Kiểm tra khả năng biểu hiện yếu tố VIII của vector này trên tế bào động vật.
- Nghiên cứu sử dụng vector này như là liệu pháp điều gen để điều trị cho bệnh hemophila trước tiên là trên mô hình động vật.

Nhờ những thành tựu của công nghệ gen, việc tạo ra được yếu tố VIII tái tổ hợp áp dụng trong điều trị và nhất là liệu pháp điều trị gen đã mở ra một hướng điều trị mới có hiệu quả cao với giá thành hạ và đặc biệt là loại bỏ được các nguy cơ tiềm ẩn nhiễm virus gây bệnh từ các chế phẩm từ máu cho bệnh nhân [22-26]. Chúng tôi mong rằng nghiên cứu này sẽ được phát triển ở các giai đoạn tiếp theo để tạo ra sản phẩm protein yếu tố VIII tái tổ hợp hoàn chỉnh với độ tinh khiết cao như đã trình bày ở trên. Đây là một nghiên cứu mang tính thực tiễn, đặc biệt có giá trị khoa học và mang lại hiệu quả cao trong điều kiện kinh tế xã hội ở nước ta hiện nay. Thành công của nghiên cứu này và những nghiên cứu tiếp theo sẽ đóng góp không nhỏ vào chiến lược chăm sóc sức khỏe toàn dân đã được Đảng và Nhà nước đề ra, đang được Bộ Y tế triển khai thực hiện ngày một hiệu quả hơn.

CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được cho phép chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã khuếch đại thành công gen mã hóa yếu tố VIII người bị xóa vùng gen B.
2. Đã tách dòng thành công 2 vùng gen A1A2 (3 kb) và A3C2 (2,1 kb) vào vector tách dòng pDrive Cloning Vector.
3. Đã thiết kế thành công vector biểu hiện pQE 30 UA mang 2 vùng gen A1A2 và A3C2.
4. Đã thiết kế thành công vector biểu hiện pQE 30 UA mang cả 2 vùng gen A1A2 và A3C2.
5. Đã biểu hiện thành công protein yếu tố VIII trên *E.coli* SG13009[pREP4].

HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

1. Tối ưu hóa điều kiện biểu hiện, tinh chế và thử hoạt tính của protein yếu tố VIII tái tổ hợp *in vivo*; Tiến hành thử nghiệm lâm sàng.
2. Thiết kế hệ vector virus mang gen mã hóa yếu tố VIII dùng cho liệu pháp điều trị gen; Thử nghiệm trên mô hình động vật VIII-/-.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Doãn Huy Chung. Chiết tách và lưu giữ tua lạnh yếu tố VIII từ huyết tương người để điều trị bệnh nhân Hemophilia A tại Viện nhi khoa. *Luận án tiến sĩ y học*, Trường Đại học Y Hà nội, (1999).
2. Vũ Thị Minh Châu. Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân Hemophilia A gặp ở Viện Huyết học - Truyền máu. *Luận văn tốt nghiệp bác sĩ chuyên khoa cấp II*, Trường Đại học Y Hà nội, (2001).
3. Trương Thị Kim Dung. Điều chế và sử dụng kết tua lạnh giàu yếu tố VIII. *Y học Việt nam* **3**, 25-29, (2001).
4. Phạm Tuấn Dương và cs. Đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất điều chế tua lạnh yếu tố VIII. *Y học Việt nam* **12**, 21-28, (2001).
5. Nguyễn Minh Hiệp và cs. Đặc điểm lâm sàng bệnh Hemophilia ở trẻ em tại Viện Nhi khoa. *Công trình NCKH của nghiên cứu sinh*, Nhà xuất bản Y học, 214-219, (1998).
6. Nguyễn Thị Mai. Đánh giá hiệu quả sử dụng tua lạnh yếu tố VIII sản xuất tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương trong điều trị và dự phòng chảy máu ở bệnh nhân Hemophilia A. *Luận văn tốt nghiệp BS nội trú bệnh viện khoá XXIII*, Trường ĐH Y HN, (2002).
7. Cung Thị Tý và cs. Tình hình bệnh Hemophilia ở một số địa phương miền bắc Việt nam. *Đề tài nghiên cứu cấp bộ đã nghiệm thu năm*, (1997).
8. Nguyễn Thị Vân. Nghiên cứu đặc điểm tổn thương khớp và cơ trên bệnh nhân Hemophilia A. *Luận văn thạc sĩ y học*, Trường Đại học Y Hà nội, (1999).

B. TÀI LIỆU TIẾNG ANH

9. Anerwald G et al. The role of plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor concentrates in the treatment of hemophilia A patients. *J.Hematol* **88**, 21-25, (2003).
10. Balagué C, Zhou. Dai. J, Alemany. R, al. Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* **95**, 820-828, (2000).
11. Christopher B et al. Identification of porcine coagulation factor VIII domains responsible for high level expression via enhanced secretion. *J.Biol.Chem* **279**, 6546-6552, (2004).
12. Daniel G et al. Gene therapy for hemophilia. *N.Engl.J.Med* **344**, 1782-1783, (2001).
13. David A et al. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N.Engl.J.Med* **344**, 1735-1742, (2001).
14. Debra D. Pittman, Edward M. Alderman, Kathleen N. Tomkinson, Jack H. Wang, Alan R. Giles & Randal J. Kaufman. Biochemical, Immunological and In Vivo Functional Characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* **81**, 2925-2935, (1993).
15. Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol* **105**, 2665-2669, (1987).
16. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312**, 326-330, (1984).
17. Hedner U et al. Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the pathophysiology and treatment of hemophilia. *Hematology* **18**, 241-265, (2000).

18. Harold R. Roberts, Maureane Hoffman. "Hemophilia and related conditions – inherited deficiencies of prothrombin (factor II), factor V, and factor VII to XII", *Williams Hematology*, 5th edit, 1413-1439, (1995).
19. Kaufman, R. J. & Antonarakis, S. E. in *Hematology: Basic Principles and Practice*, eds. Hoffman, R., Benz, E. J., Jr., Shattil, S. J., Furie, B., Cohen, H. J., Silberstein, L. E. & McGlave, P. (Churchill Livingstone, New York), 3rd Ed, 1850–1868, (2000).
20. Kaufman, R. J, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* **263**, 6352, (1988).
21. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J. "A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene". *Genomics* **7**, 1–11, (1990).
22. Mannucci PM. Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology* **78**, 1-9, (2002).
23. Mannucci PM et al. The hemophilias: from royal genes to gene therapy. *N.Engl.J.Med* **344**, 1773-1779, (2001).
24. Marinee K. L. Chuah, Desire Collen, Thierry VandenDriessche (2001). Gene therapy for hemophilia. *J Gene Med* **3**, 13-20, (2001).
25. Marinee K et al. Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* **101**, 1734-1743, (2003).
26. Meulien P, Faure T, Mischler F, Harrer H, Ulrich P, Bouderbala B, Dott K, Sainte Marie M, Mazurier C, Cazenave JP, Courtney M, Pavirani A. A new recombinant procoagulant protein derived from the cDNA encoding human factor VIII. *Protein Eng* **2**, 301-305, (1998).

27. Mai NT, Tri NA, Nu NT, Hoa PQ, Thanh HT “Epidemiology and clinical characteristics of Hemophilia population in national institute of hematology and blood transfusion”, *Vox Sanguinis* **93**, 91-102, (2007).
28. Park F, Ohashi K, Kay MA. Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood* **96**, 1173-1176, (2000).
29. Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ. Biochemical, immuno-nological and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* **81**, 2925-2935, (1993).
30. Randal J. KaufmanS, Louise C. Wasley, and AndreJw. D S Processing, and Secretion of Recombinant Human Factor VIII Expressed in Mammalian Cells. *J. Biol.Chem* **263**, 6352-6362, (1988).
31. Saka R et al. Total correction of hemophilia A mice with canine VIII using AAV8 serotype. *Blood* **103**, 1253-1260, (2004).
32. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker J, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **326**, 312-342, (1984).
33. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman, R. J. A large region (= 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 5939-5944, (1986).
34. V. Picanco-Castro, E.M.S. Russo-Carbolante, A.M. Fontes, A.C. Fernandes & D.T. Covas. An enhancer/promoter combination strengthens the expression of blood-coagulation factor VIII in non-viral expression vectors. *Genetics and Molecular Research* **7** (2), 314-325, (2008).
35. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O’Brien DPO, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RW, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ: Structure of human factor VIII. *Nature* **321**, 312-337, (1984).

36. Xu L et al. Absence of a desmopressin response after therapeutic expression of factor VIII in hemophilia A dogs with liver-directed neonatal gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **102**, 6080-6085, (2005).

PHỤ LỤC

Bài báo số 1: Nguyễn Thu Thúy, Trần Văn Khánh, Phạm Đăng Khoa và Tạ Thành Văn. Nghiên cứu tách dòng gen mã hóa yếu tố đông máu VIII người. *Tạp chí nghiên cứu y học* **58** (5), 7-12, (2008).

NGHIÊN CỨU TÁCH DÒNG GEN MÃ HÓA YẾU TỐ ĐÔNG MÁU VIII NGƯỜI

Nguyễn Thu Thúy¹, Trần Văn Khánh¹, Phạm Đăng Khoa² và Tạ Thành Văn^{1,3}

¹, Labo Trung tâm Y sinh học; ², Bộ môn Miễn dịch-Sinh lý bệnh;

³, Bộ môn Hóa-Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội

Hemophilia A là bệnh chảy máu di truyền do sự thiếu hụt yếu tố đông máu VIII. Mục tiêu: Tách dòng thành công 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hóa yếu tố VIII. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đoạn gen A1A2 và A3C2 được khuếch đại bằng PCR từ cDNA gan người sử dụng các cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được đưa vào vector tách dòng pQE-30UA. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *E.coli* DH5α. Kiểm tra sự có mặt của 2 đoạn gen trong vector tách dòng bằng phương pháp PCR và cắt enzym giới hạn. **Kết quả:** Đã khuếch đại và đưa thành công 2 đoạn gen mã hóa yếu tố VIII vào vector tách dòng. **Kết luận:** Sử dụng vector pQE-30UA đã tách dòng thành công 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hóa yếu tố VIII.

Từ khóa: Hemophilia A, yếu tố đông máu VIII,.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hemophilia A là bệnh máu khó đông do sự thiếu hụt (về lượng hoặc về chất) yếu tố đông máu VIII. Gen mã hoá cho yếu tố này nằm tại vùng q28, trên cánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X và khi đột biến sẽ gây ra bệnh di truyền lặn liên kết với nhiễm sắc thể X. Gen mã hóa yếu tố VIII là một trong những gen lớn nhất cơ thể, có kích thước 186 kb. Gồm 25 intron và vùng gen mã hóa dài 9 kb với 26 exon (Levinson, B et al., 1990).

Hemophilia có thể xuất hiện ở thể nhẹ, trung bình hay nặng tương đương mức yếu tố VIII trong huyết tương lần lượt là 6-30%, 1-5% và dưới 1%. Thể Hemophilia nhẹ thường chỉ chảy máu sau chấn thương hoặc sau phẫu thuật, còn thể nặng có thể chảy máu

tự phát hoặc sau những sang chấn nhẹ, nhất là ở khớp và cơ, trung bình mỗi năm chảy máu 20-30 lần, nhưng cũng có thể nhiều hơn. Tỷ lệ bệnh là 1/10.000 trẻ mới sinh.

Ở Việt Nam, tỉ lệ người mắc Hemophilia trong cộng đồng khá cao 2/34830 người (tương đương 25 - 60 người trên 1 triệu dân), nhu cầu yếu tố VIII dùng trong điều trị và dự phòng rất lớn. Do đó, việc nghiên cứu sản xuất yếu tố VIII tái tổ hợp là việc làm hết sức cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao trong lâm sàng huyết học, giải quyết trực tiếp một vấn đề bức thiết đang đặt ra cho y học nước ta. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: **“Tách dòng gen mã hóa yếu tố đông máu VIII người”** nhằm mục tiêu:

- 1) Khuếch đại vùng gen chức năng mã hóa yếu tố VIII;
- 2) Tách và biến nạp các vùng gen chức năng của yếu tố VIII vào vector tách dòng.

Đây là bước để chuẩn bị nguyên liệu cho việc thiết kế vector biểu hiện yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp trên cả hệ vi khuẩn *E. Coli* và tế bào động vật phục vụ cho việc tổng hợp yếu tố VIII tái tổ hợp và liệu pháp điều trị gen.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu: Mô gan của người do bệnh viện K cung cấp. Chủng *Escherichia coli* DH5 α (bảo quản ở -70°C) và vector tách dòng p.QE 30-UA và các loại hóa chất cần thiết khác được mua từ QIAGEN, Hoa Kỳ.

2. Phương pháp

- Tách chiết RNA tổng số từ mô gan người bằng dung dịch Trizol của hãng Invitrogen theo quy trình hướng dẫn của hãng.
- Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số bằng phương pháp MMLV-RT.
- Khuếch đại đoạn gen *A1A2* và *A3C2* mã hóa yếu tố VIII từ cDNA sử dụng 2 cặp mồi đặc hiệu: *A1A2* mang trình tự cắt của enzym *PmlI* và *EcoRV*, *A3C2* mang trình tự cắt của enzym *SmaI* và *SalI*.

Thành phần phản ứng PCR gồm: 1X đệm PCR; 2,5 mM dNTP; 10 pM mồi xuôi và ngược; 1 μ l *Taq* polymerase và 3000 ng cDNA.

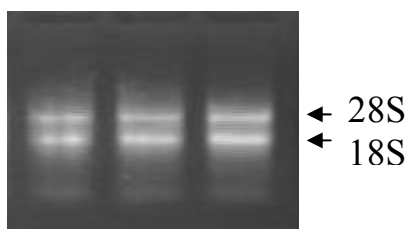
Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 95°C - 10 phút; 35 chu kỳ [95°C - 50 giây, 55°C - 50 giây, 72°C - 2 phút]; 72°C - 10 phút; bảo quản mẫu ở 10°C.

- Tách dòng 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2*: Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick PCR purification, sẽ được gắn vào vector biểu hiện pQE 30-UA bằng enzym T4-DNA ligase ở điều kiện 16°C qua đêm. Sau đó, hỗn hợp sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E.coli* chủng DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt. Dòng plasmid tái tổ hợp được chọn lọc và chuyển sang nuôi cấy trong môi trường LB lỏng. Sự có mặt của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt enzym giới hạn.

III. KẾT QUẢ

1. Tách RNA tổng số và tổng hợp cDNA

Tách chiết RNA là bước đầu tiên trong quy trình nghiên cứu để chuẩn bị nguyên liệu cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp tách chiết RNA khác nhau tùy theo đối tượng và điều kiện nghiên cứu đã được cải tạo và ứng dụng rất hiệu quả. RNA tổng số từ mô gan được tách theo phương pháp sử dụng trizol. Sau quá trình tách chiết, chúng tôi tiến hành xác định chất lượng, nồng độ và độ sạch của RNA bằng cách đo phổ hấp thụ tử ngoại ở hai bước sóng 260 nm, 280 nm và điện di trên gel agarose 1%. Mẫu RNA thu được có độ tinh sạch khá cao, dao động từ 1,7 - 1,8 và nồng độ khoảng 3500 - 4000 ng/μl. Kết quả điện di RNA trên gel agarose (hình 1) cho thấy, RNA tách được đạt yêu cầu, không đứt gãy, gồm 2 băng rõ nét là rRNA 28S và 18S.



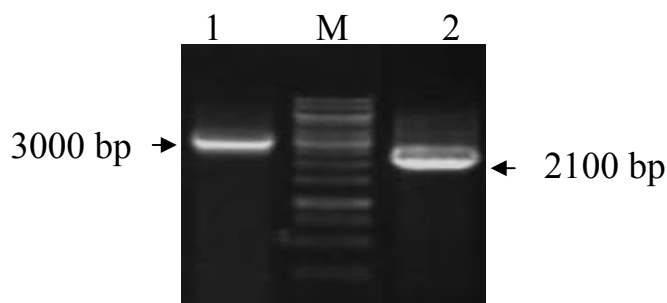
Hình 1: Kết quả điện di RNA tổng số được tách chiết từ mô gan người

Mẫu RNA có chất lượng tốt được sử dụng cho phản ứng tổng hợp cDNA. Độ tinh sạch và nồng độ cDNA cũng được xác định bằng phương pháp quang phổ kế. Mẫu cDNA thu được có độ tinh sạch từ 1,7 - 1,8 và nồng độ khoảng 1400 - 1600 ng/μl.

2. Khuếch đại 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2*

Để khuếch đại 2 đoạn gen *A1A2* mã hoá vùng A1-A2 và đoạn gen *A3C2* mã hoá vùng A3-C1-C2 của yếu tố VIII chúng tôi thực hiện phản ứng PCR sử dụng 2 cặp mồi đặc

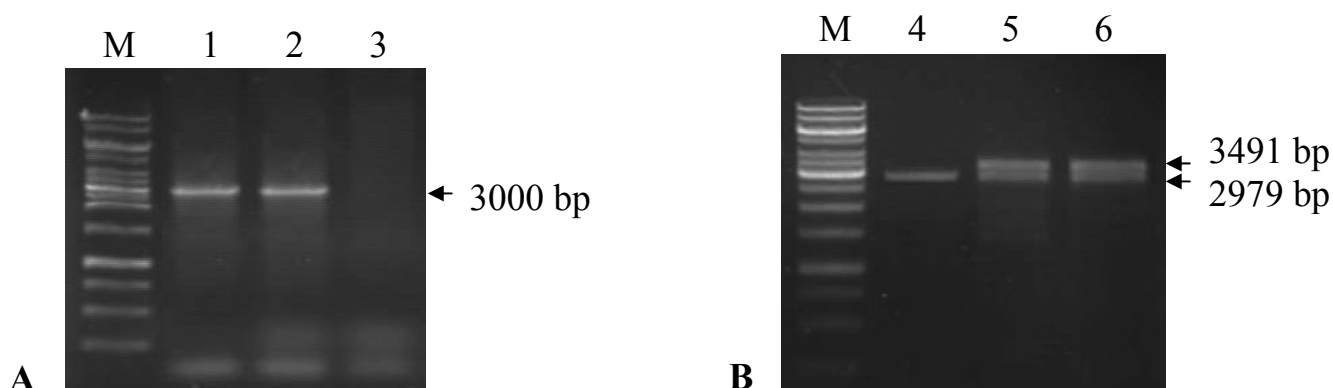
hiệu. Đoạn gen *A1A2* có kích thước 3000 bp và đoạn *A3C2* có kích thước 2100 bp. Với điều kiện thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được mô tả ở phần phương pháp, sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, chỉ gồm 1 băng đặc hiệu và có kích thước đúng như đã tính toán (hình 2).



Hình 2: Sản phẩm khuếch đại 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* mã hoá yếu tố VIII. 1: Sản phẩm khuếch đại đoạn *A1A2*; M: Marker 1 kb; 2: Sản phẩm khuếch đại đoạn *A3C2*

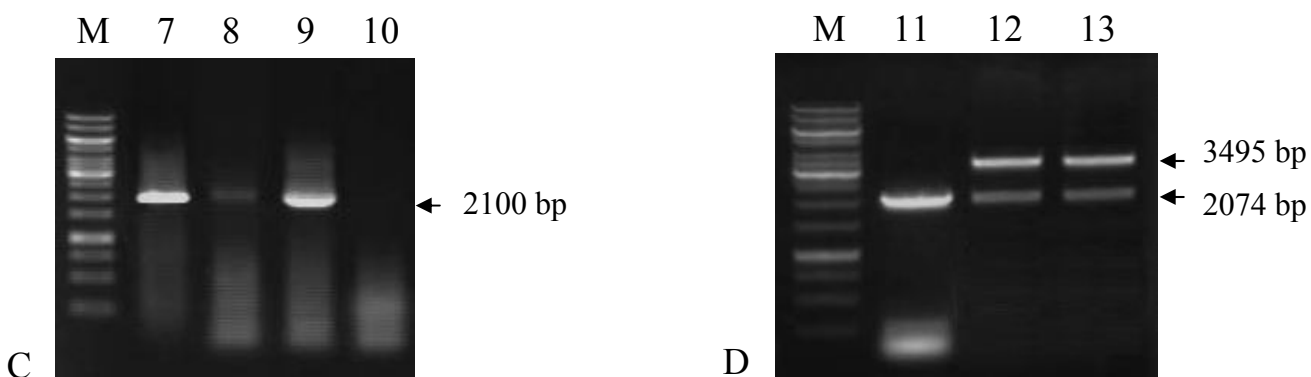
3. Tách dòng 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* mã hoá yếu tố VIII

Chúng tôi thực hiện phản ứng PCR cho từng cặp mồi *A1A2* và *A3C2*, sử dụng trực tiếp những tế bào *E.coli* trong khuẩn lạc trắng làm khuôn cho phản ứng PCR. Kết quả phản ứng PCR sau khi điện di trên gel agarose được thể hiện ở hình 3A và hình 4C.



Hình 3. A: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen *A1A2*; B: Sản phẩm cắt plasmid mang đoạn *A1A2* với enzym *PmlI* và *EcoRV*; M: Marker 1 kb; 1: PCR đối chứng dương; 2: PCR từ plasmid mang đoạn *A1A2*; 3: PCR từ plasmid không mang đoạn *A1A2*; 4: Sản phẩm PCR-*A1A2*; 5-6: Sản phẩm cắt plasmid với enzym *PmlI* và *EcoRV*

Ở hình 3A, giếng số 2 có sản phẩm PCR khoảng 3 kb như đối chứng nên có khả năng những plasmid này mang đoạn gen *A1A2*. Giếng số 3 không có sản phẩm PCR như đối chứng nên plasmid này không mang đoạn gen *A1A2*. DNA của plasmid ở giếng số 2 được tách chiết và cắt với enzym *PmlI* và *EcoRV*. Enzym *PmlI* có một điểm cắt tại vị trí 153 thuộc vùng MCS I của vector và một điểm cắt trên trình tự mỗi xuôi của đoạn gen *A1A2*. Enzym *SalI* cũng có một điểm cắt tại vị trí 189 thuộc vùng MCS II của vector và một điểm cắt trên trình tự mỗi ngược của đoạn gen *A3C2*. Sản phẩm cắt gồm 4 đoạn có kích thước 3495 bp (gần tương ứng với kích thước của vector là 3504 bp), 2979 bp (gần tương ứng với kích thước của đoạn gen *A1A2* là 3000 bp), và 2 đoạn có kích thước 25 bp và 5 bp không quan sát được trên bản gel điện di (hình 3B - giếng số 5, 6).



Hình 4. C: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen *A3C2*; D: Sản phẩm cắt plasmid mang đoạn *A3C2* với enzym *SmaI* và *SalI*. M: Marker 1kb; 7: PCR đối chứng dương; 8-9: PCR từ plasmid mang đoạn *A3C2*; 10: PCR từ plasmid không mang đoạn *A3C2*; 11: Sản phẩm PCR-*A3C2*; 12-13: Sản phẩm cắt plasmid với enzym *SmaI* và *SalI*

Tương tự, ở hình 4C, các giếng số 8, 9 là các plasmid có khả năng mang đoạn gen *A3C2* vì đều có sản phẩm PCR khoảng 2,1 kb. Còn plasmid ở giếng số 10 không mang đoạn gen *A3C2*. DNA plasmid được cắt với enzym *SmaI* và *SalI*. Enzym *SmaI* có một điểm cắt tại vị trí 186 thuộc vùng MCS II của vector và một điểm trên trình tự mỗi xuôi của đoạn gen *A3C2*. Enzym *SalI* cũng có một điểm cắt tại vị trí 189 thuộc vùng MCS II của vector và một điểm trên trình tự mỗi ngược của đoạn gen *A3C2*. Sản phẩm cắt gồm 3 đoạn có kích thước 3499 bp (gần tương ứng với kích thước của vector là 3504 bp), 2074 bp

(gần tương ứng với kích thước của đoạn gen *A3C2* là 2100 bp) và 1 đoạn 31 bp không quan sát được trên gel agarose, (hình 4D - giếng số 12, 13).

Như vậy, chúng tôi đã tách dòng thành công 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* mã hóa yếu tố VIII bằng vector pQE-30UA.

IV. BÀN LUẬN

Hemophilia là một bệnh máu thường gặp trong cộng đồng và là một vấn đề xã hội đáng quan tâm. Bệnh tuy đã được nói đến từ lâu, các biểu hiện lâm sàng của bệnh đã được nghiên cứu khá đầy đủ, nhưng khó khăn lớn nhất vẫn là vấn đề điều trị và phòng chảy máu. Vì vậy, việc có được yếu tố VIII từ nhiều nguồn khác nhau dùng trong điều trị chảy máu và điều trị dự phòng cho bệnh nhân Hemophilia là rất cần thiết trong bối cảnh hiện nay ở nước ta. Chế phẩm dùng để điều trị thay thế yếu tố VIII là huyết tương tươi đông lạnh. Tủa lạnh yếu tố VIII được tách ra sau khi phá đông chậm, yếu tố VIII cô đặc được sản xuất từ huyết tương sau đó cô đặc và bất hoạt virus. Nhờ những thành tựu của công nghệ gen, ngày nay việc tạo ra được yếu tố VIII tái tổ hợp và nhất là liệu pháp điều trị gen đã mở ra một hướng điều trị mới đầy hứa hẹn đối với người bệnh Hemophilia.

Yếu tố đông máu VIII là một chuỗi polypeptid đơn có cấu trúc gồm các domain A1-A2-B-A3-C1-C2. Trong đó, chuỗi nặng gồm các domain A1-A2-B và chuỗi nhẹ gồm các domain A3-C1-C2. Đoạn gen *A1A2* có kích thước 3000 bp và đoạn *A3C2* có kích thước 2100 bp.

Một số nghiên cứu cho thấy rằng, domain B không cần cho chức năng của FVIII và sau quá trình dịch mã, domain B bị cắt khỏi chuỗi nặng của FVIII sẽ tạo thành phân tử FVIII có chức năng, mà không ảnh hưởng đến hoạt tính hay tính kháng nguyên của protein FVIII. và FVIII cũng được biểu hiện hiệu quả hơn so với FVIII thể hoang dại (Debra D. Pittman et al, 1993). Vì vậy, chúng tôi chỉ khuếch đại và tách dòng 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* nhằm thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa yếu tố VIII không mang domain B. Với những điều kiện thí nghiệm và phương pháp nghiên cứu đã tối ưu, chúng tôi đã tách chiết được RNA tổng số, tổng hợp cDNA có số lượng và chất lượng tốt. Những sản phẩm trên là tiền đề cho các thí nghiệm tiếp theo. Chúng tôi đã khuếch đại thành công 2 đoạn gen *A1A2* và *A3C2* và đưa chúng vào vector biến nạp. Điều này có ý nghĩa hết sức

quan trọng, quyết định định hướng nghiên cứu tiếp theo của đề tài là: *i)* Đưa các vùng gen chức năng này vào vector biểu hiện trên hệ vi khuẩn E.Coli để tổng hợp ra yếu tố VIII tái tổ hợp; và *ii)* Đưa các vùng gen chức năng vào hệ vector biểu hiện trên tế bào động vật phục vụ cho nghiên cứu ứng dụng liệu pháp điều trị gen.

V. KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu trên cho phép chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Đã khuếch đại thành công vùng gen chức năng mã hóa yếu tố VIII A1A2 và A3C2.
- Đã tách và biến nạp thành công các vùng gen chức năng của yếu tố VIII vào vector tách dòng.

Kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo là nghiên cứu tổng hợp yếu tố VIII tái tổ hợp và ứng dụng liệu pháp điều trị gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Vũ Thị Minh Châu** (2001). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân Hemophilia A gặp ở Viện Huyết học - Truyền máu. *Luận văn tốt nghiệp bác sĩ chuyên khoa cấp II*, Trường Đại học Y Hà nội.
- 3. Nguyễn Thị Mai** (2002). Đánh giá hiệu quả sử dụng tủa lạnh yếu tố VIII sản xuất tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương trong điều trị và dự phòng chảy máu ở bệnh nhân Hemophilia A. *Luận văn tốt nghiệp BS nội trú bệnh viện khoá XXIII*, Trường ĐH Y Hà Nội.
- 4. Daniel G et al.** (2001). Gene therapy for Hemophilia. *N.Engl.J.Med* **344**, 1782-1783.
- 5. Debra D. Pittman, Edward M. Alderman, Kathleen N. Tomkinson, Jack H. Wang, Alan R. Giles & Randal J. Kaufman** (1993). Biochemical, Immunological and In Vivo Functional Characterization of B-domain-deleted factor VIII. *J. Blood*, Vol 81, No 11, 2925-2935.
- 6. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J** (1990). "A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene". *Genomics* **7** (1): 1–11.
- 7. Marinee K et al.** (2003). Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of Hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* **101**, 1734-1743.

Summary

CLONING OF THE GENE ENCODING HUMAN RECOMBINANT BLOOD- COAGULATION FACTOR VIII

Hemophilia A is genetic bleeding disorders that result from a deficiency in factor VIII.

Objective: Clone successfully *A1A2* and *A3C2* gene fragments encoding factor VIII.

Method: Amplify *A1A2* and *A3C2* gene fragments by PCR from human cDNA. PCR products were ligated into cloning vector pQE-30UA. Recombinant plasmids were transformed into *E.coli* DH5 α host strain. Inserted *A1A2* and *A3C2* gene fragments were checked by PCR and restriction enzymes. **Result:** Successfully amplifying functional gene fragments encoding factor VIII using specific primers. **Conclusion:** Obtaining pQE-30UA vector carrying *A1A2* and *A3C2* fragments encoding factor VIII.

Key words: Hemophilia A, blood-coagulation factor VIII and expression vector.

Bài báo số 2: Thiết kế vector mang gen mã hóa yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp. *Tạp chí nghiên cứu Y học* (đang gửi đăng)

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN YẾU TỐ ĐÔNG MÁU VIII TÁI TỔ HỢP NGƯỜI
Lưu Vũ Dũng¹, Nguyễn Thu Thúy¹, Trần Văn Khánh¹ Trần Huy Hoàng² và Tạ Thành Văn¹

¹, Trường Đại học Y Hà Nội; ², Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

*Việc điều trị dự phòng thành công bệnh hemophilia A bằng yếu tố VIII tái tổ hợp và liệu pháp gen trên mô hình động vật đã mở ra một hướng nghiên cứu đầy hứa hẹn cho việc điều trị căn bệnh này. **Mục tiêu:** Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng hai vector đã tách dòng yếu tố VIII p.QE30-UA-A1A2 và p.QE30-UA-A3C2 nhằm thiết kế vector biểu hiện mang đoạn A1A2A3C2 dưới sự điều khiển của promoter T5. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đoạn gen A1C2 được cắt từ vector p.QE30-UA-A1A2 bằng enzyme PmlI, EcoRV sau đó được biến nạp vào vector pQE-30UA-A3C2 đã được mở vòng. Kỹ thuật PCR, cắt enzym giới hạn và đọc trình tự gen được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen này trong vector biểu hiện. **Kết quả:** chúng tôi đã thiết kế thành công vector biểu hiện p.QE30-UA-A1A2A3C2 mang đoạn gen A1A2A3C2 của yếu tố VIII.*

Từ khóa: Hemophilia A, yếu tố đông máu VIII và vector biểu hiện

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hemophilia A là bệnh rối loạn đông máu có căn nguyên di truyền do thiếu hụt hoặc bất thường chức năng của yếu tố đông máu VIII. Đây là bệnh di truyền lặn liên quan đến sự đột biến gen mã hóa yếu tố VIII nằm tại vùng q28 trên cánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X [4]. Theo ước tính của tổ chức hemophilia thế giới, hiện nay có khoảng 250.000 bệnh nhân mắc bệnh hemophilia trong đó bệnh hemophilia A hơn chiếm tới 85%. Việc chẩn đoán chính xác và điều trị sớm căn bệnh này có một ý nghĩa rất quan trọng nhằm hạn chế tối đa tình trạng chảy máu cũng như giảm thiểu khả năng trở thành tàn tật. Phương pháp điều trị bệnh hemophili A hiện nay chủ yếu dựa vào việc truyền máu toàn phần, và các chế phẩm từ máu như huyết tương, huyết tương tươi đông lạnh, tủa lạnh hoặc cô đặc yếu tố VIII đã có hiệu quả nhất định trong việc cải thiện chức năng đông máu cho bệnh nhân. Tuy

nhiên, các sản phẩm này có nhiều nhược điểm như: giá thành đắt, nguồn cung hạn hẹp, thời gian bán hủy ngắn và đặc biệt khi sử dụng các sản phẩm này bệnh nhân có nguy cơ tiềm ẩn mắc các bệnh lây nhiễm qua đường truyền máu như HIV, HBV, HCV. Để khắc phục những nhược điểm đó các nhà khoa học đã thành công trong việc áp dụng công nghệ gen hiện đại để tạo ra yếu tố VIII tái tổ hợp ứng dụng trong điều trị với ưu điểm là có hàm lượng cao, bảo quản dễ, hiệu quả rõ rệt và không chứa các yếu tố nguy cơ gây các bệnh truyền nhiễm theo đường máu. Thêm vào đó, việc điều trị thành công bệnh hemophilia trên mô hình động vật bằng liệu pháp gen đã đem lại những triển vọng đầy hứa hẹn trong việc điều trị tận gốc căn nguyên gây bệnh đối với các bệnh nhân hemophilia [3].

Ở Việt Nam, theo thống kê của Viện Huyết học và Truyền máu TW có khoảng hơn 5.000 bệnh nhân hemophilia nhưng chỉ mới phát hiện và điều trị được khoảng 20% các trường hợp [1]. Việc áp dụng các phương pháp điều trị thông dụng hiện nay cũng không tránh khỏi những hạn chế như đã đề cập ở trên, đặc biệt là đối với các bệnh nhân Việt Nam vì giá thành của các chế phẩm đó thường quá đắt so với khả năng chi trả của hầu hết bệnh nhân. Vì vậy việc sản xuất ra một sản phẩm an toàn, hiệu quả trong điều trị đồng thời phù hợp với điều kiện thực tế Việt Nam sẽ mang một ý nghĩa thiết thực trong việc mở rộng phạm vi điều trị, nâng cao thể trạng và giảm thiểu những hậu quả do bệnh tật mang lại đối với bệnh nhân. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu “**Lựa chọn và thiết kế vector mang gen mã hoá yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp**” nhằm mục tiêu: 1) Tạo ra vector tái tổ hợp chứa các đoạn gen chức năng quan trọng của yếu tố VIII; 2) Biến nạp và biểu hiện thành công các đoạn gen đó trong tế bào vi khuẩn.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu:

- Vector p.QE30-UA-A1A2: Mang gen mã hóa đoạn gen *A1A2* và Vector p.QE30-UA-A3C2: Mang gen mã hóa đoạn gen *A3C2* của yếu tố VIII [2].
- Các loại hóa chất cần thiết khác được mua từ hãng QIAGEN, Hoa Kỳ

2. Phương pháp

2.1. Tách chiết DNA plasmid: Plasmid p.QE30-UA-A1A2 và p.QE30-UA-A3C2 được tách chiết theo quy trình chuẩn sử dụng KIT QIAgenTM miniprep

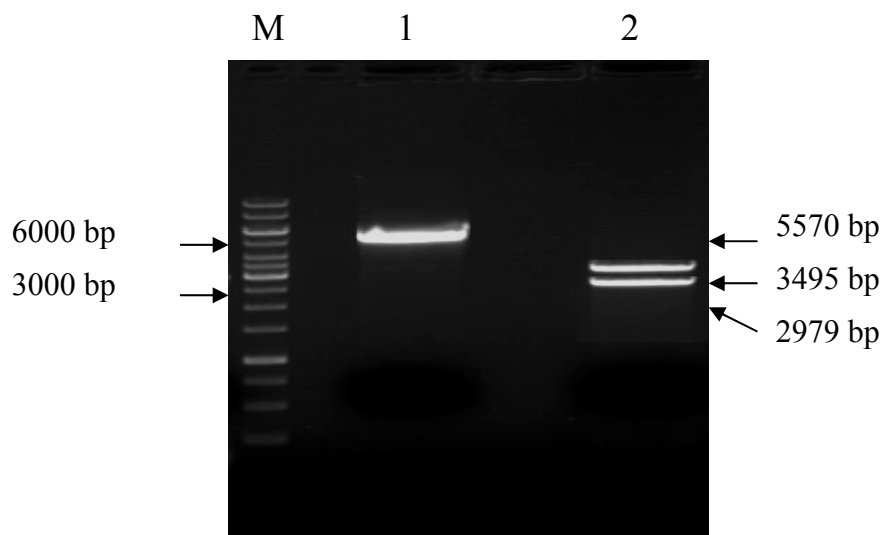
2.2. Đưa đoạn gen A1A2 vào vector p.QE30-UA-A3C2:

- Dùng enzyme *PmlI*, *EcoRV* để cắt đoạn gen *A1A2* từ plasmid pQE-30UA-*A1A2* và mở vòng vector p.QE30-UA-A3C2
- Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 1% cùng với thang marker chuẩn
- Tinh sạch DNA từ gel agarose sử dụng Kit QIAquick Gel Extraction
 - Đưa đoạn gen *PmlI*-*A1A2*-*EcoRV* vào vector biểu hiện pQE-30UA-*A3C2* đã mở vòng bằng enzyme *PmlI* và *EcoRV* nhờ T4-DNA ligase ở điều kiện 16°C qua đêm.
 - Hỗn hợp phản ứng lai được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E.coli* bằng phương pháp sốc nhiệt.
- Sự có mặt của đoạn gen *A1A2* và *A3C2* được kiểm tra bằng phương pháp PCR (sử dụng 2 cặp mồi *A1A2*-F: 5' - TGT AGC CAC GTG ATG CAA ATA G - 3' và *A3C2*-R: 5' - CAG TGG GTC GAC GTC AGT AGA GGT - 3'), cắt enzym giới hạn. Các đoạn gen sẽ được phân tích tự động bằng máy đọc trình tự gen ABI 310 (310; Applied Biosystem) và được so sánh với các trình tự chuẩn của ngân hàng gen.

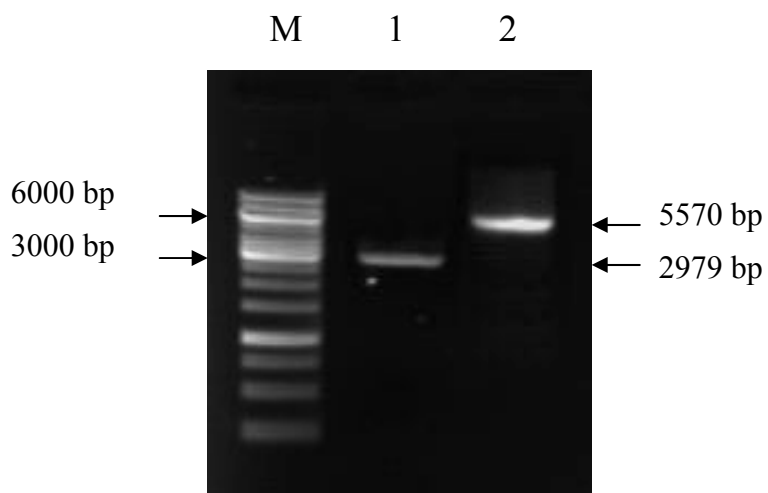
III. KẾT QUẢ

3.1. Cắt đoạn gen *A1A2* từ plasmid pQE-30UA-*A1A2* bằng enzym *PmlI*, *EcoRV*

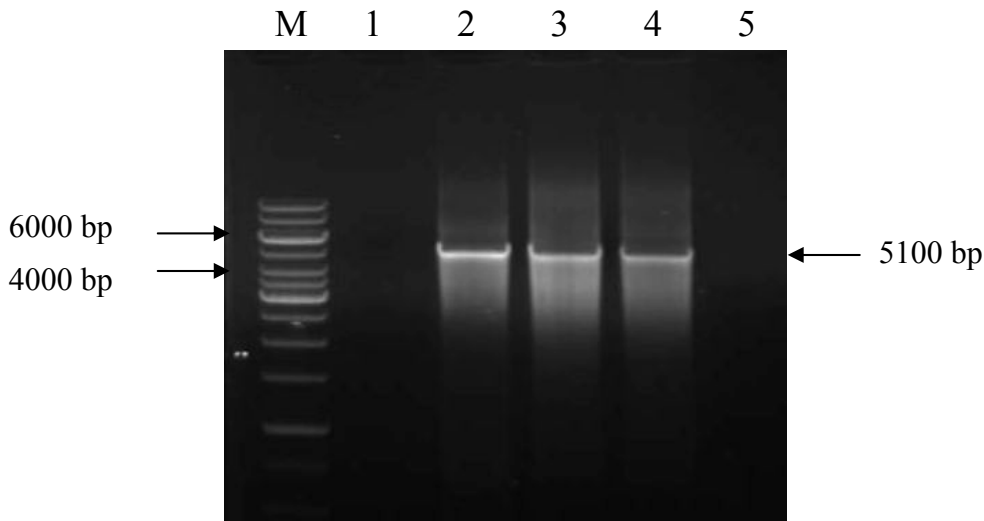
Để tạo vector biểu hiện yếu tố VIII, vector pQE-30UA-*A1A2* được cắt bằng 2 enzym *PmlI* và *EcoRV*. Sau phản ứng cắt thu được đoạn gen *PmlI*-*A1A2*-*EcoRV* có kích thước 2979 bp, sẽ được tinh sạch bằng kit QIAquickTM Gel Extraction. Đoạn *PmlI*-*A1A2*-*EcoRV* sẽ được đưa vào vector biểu hiện pQE-30UA-*A3C2* đã mở vòng. Để tạo đầu dính bổ sung với đoạn gen *PmlI*-*A1A2*-*EcoRV*, vector biểu hiện pQE-30UA-*A3C2* cũng được cắt mở vòng bằng 2 enzym *PmlI* và *EcoRV*, có kích thước khoảng 5570 bp. Hình ảnh trước và sau khi tinh sạch từ gel agarose của đoạn gen *PmlI*-*A1A2*-*EcoRV*, vector pQE-30UA-*A3C2* đã mở vòng được thể hiện ở hình 1 và hình 2. Toàn bộ sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E.coli* biểu hiện SG13009 (pREP4).



Hình 1. Sản phẩm cắt trước khi tinh sạch: 1: *p.QE-30UA-A3C2*; 2: *p.QE-30UA-A1A2* bằng enzym *PmlI* và *EcoRV*. M: Marker 1 kb.



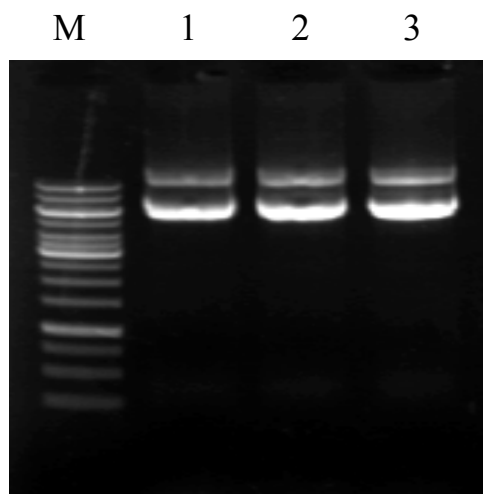
Hình 2. Sản phẩm cắt sau khi tinh sạch từ gel agarose: 1đoạn *A1A2*; 2: *p.QE-30UA-A3C2*. M: Marker 1 kb.



Hình 3. Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A1A2A3C2. M: marker 1 kb; 1,5: sản phẩm PCR từ plasmid không mang đoạn gen A1A2A3C2; 2-4: sản phẩm PCR từ plasmid mang đoạn gen A1A2A3C2.

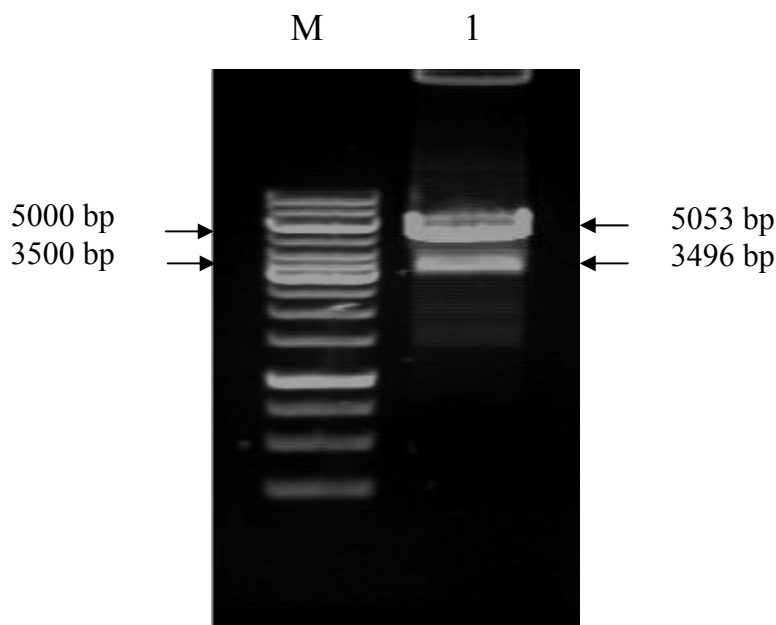
3.2. Biến nạp vector biểu hiện vào chủng *E. coli* biểu hiện

Các thể biến nạp được sơ chọn được kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi A1A2-F, A3C2-R và phương pháp cắt enzym giới hạn. Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen *A1A2A3C2* từ khuẩn lạc cho sản phẩm có kích thước khoảng 5100 bp (Hình 3).



Hình 4. DNA plasmid tách chiết từ những khuẩn lạc mang đoạn gen A1A2A3C2. M: Marker 1 kb; 1-3: DNA plasmid mang đoạn gen A1A2A3C2.

Những khuẩn lạc đã được chọn lọc bằng phương pháp PCR cho kết quả dương tính, sẽ tiếp tục được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng và tách chiết DNA. Hình ảnh điện di DNA plasmid được thể hiện ở hình 4.



Hình 5. Sản phẩm cắt *p.QE-30UA-A1A2A3C2* bằng enzym *PmlI* và *SalI*. M: Marker; 1: Sản phẩm cắt *p.QE-30UA-A1A2A3C2* bằng enzym *PmlI* và *SalI*.

Những plasmid mang đoạn gen sẽ được kiểm tra bằng phương pháp enzym cắt giới hạn. DNA plasmid tách chiết từ thể biến nạp sau khi được xử lý bằng 2 enzym *PmlI* và *SalI* cho 3 băng: một băng có kích thước khoảng 3496 bp, tương đương với kích thước vector pQE-30UA cắt mở vòng và một băng có kích thước khoảng 5053 bp, tương đương với đoạn gen *A1A2A3C2*. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế plasmid biểu hiện yếu tố VIII.

Các đột biến điểm có thể phát sinh trong quá trình thiết kế vector do vậy chúng tôi tiến hành kiểm tra trình tự những plasmid mang gen mã hóa yếu tố VIII (đã được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt enzym giới hạn). So sánh trình tự đọc được với trình tự GeneBank. Chỉ những plasmid không mang bất cứ một đột biến điểm nào mới được lựa chọn để biểu hiện protein yếu tố VIII.

1	GCTAGCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCATTCTGCTTT	60
1	GCTAGCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCATTCTGCTTT	60
61	AGTGCCACCAAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAAGTGCATGGGACTATATGCAAAGT	120
61	AGTGCCACCAAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAAGTGCATGGGACTATATGCAAAGT	120
121	GATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCA	180
121	GATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCA	180
181	TTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACGGTTACCTTTTC	240
181	TTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACGGTTACCTTTTC	240
241	AACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGAG	300
241	AACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGAG	300
301	TTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAAATGGCTTCCCATCCTGTGAGTCTTCAT	360
301	TTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAAATGGCTTCCCATCCTGTGAGTCTTCAT	360
361	GCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCACT	420
361	GCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCACT	420
421	CAAAAGGAGAAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTCTGGCAG	480
421	CAAAAGGAGAAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTCTGGCAG	480
481	GTCTTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTT	540
481	GTCTTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTT	540

Hình 6. Hình minh họa một phần kết quả giải trình tự vector mã hóa yếu tố VIII.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thành công trong việc đưa cả hai đoạn gen này vào vector biểu hiện p.QE-30UA. Hai đoạn gen *A1A2A3C2* của yếu tố VIII nằm sau promoter Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thành công trong việc đưa cả hai đoạn gen này vào vector biểu hiện p.QE-30UA. Hai đoạn gen *A1A2A3C2* của yếu tố VIII nằm sau promoter điều hòa T5 của plasmid pQE-30UA. T5 của plasmid pQE-30UA. Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra bằng kỹ thuật PCR, cắt enzyme giới hạn và đọc trình tự để đảm bảo chắc chắn hai đoạn gen này đã được biến nạp vào vector biểu hiện và không có bất kỳ một điểm đột biến nào có thể phát sinh trong quá trình thiết kế vector. Các plasmid được lựa chọn để biểu hiện protein của yếu tố VIII phải đảm bảo các điều kiện là đoạn gen *A1A2A3C2* phải nằm sau promoter T5 và vẫn còn vị trí cắt Arg 372, Arg 740 và vị trí Arg 1689 để đảm bảo rằng trong tương lai khi sử dụng protein tái tổ hợp này để điều trị cho bệnh nhân hemophilia thì khi vào máu chúng sẽ được hoạt hóa nhờ quá trình phân giải bởi thrombin hoặc yếu tố Xa, khi đó protein tái tổ hợp này sẽ cắt thành 3 đoạn A1, A2 và

A3C1C2. Khi vùng A2 sẽ tương tác với phức hợp A1/A3-C1-C2 lúc đó yếu tố VIII thực sự được hoạt hoá và tham gia vào quá trình đông máu. Trên thế giới, đã có rất nhiều tác giả sử dụng các vector khác nhau như vector của adenovirus hay retrovirus biểu hiện thành công yếu tố VIII trên mô hình tế bào động vật [5;6;7] và đặc biệt nghiên cứu của tác giả Balagué và cộng sự, tác giả đã sử dụng vector miniAdFVIII của adeno virus có gắn 12,5 kDa của promoter albumin người để điều khiển quá trình tổng hợp yếu tố VIII. Khi sử dụng vector này làm liệu pháp điều trị gen (gene therapy) trên chuột knockout (chuột VIII^{-/-}) cho thấy, vector miniAdFVIII có khả năng tổng hợp được yếu tố VIII của người mà không sinh ra kháng thể chống lại chúng, sau khi được điều trị bằng vector này những con chuột bị bệnh hemophilia A có khả năng cầm máu trong vòng 30 phút sau khi cắt mạch máu ở tai, trong khi đó ở nhóm chứng các con chuột mắc bệnh hemophilia A không được điều trị bằng liệu pháp này không cầm được máu và chết sau đó (Balagué C et al, 2003). Việc thiết kế thành công vector biểu hiện mang đoạn gen *A1A2A3C2* có một ý nghĩa đặc biệt quan trọng vì đây là hai đoạn gen tham gia vào quá trình đông máu của yếu tố VIII. Vector biểu hiện này sẽ được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli*, tế bào động vật nhằm tạo ra protein yếu tố VIII hoặc được sử dụng như liệu pháp gen để điều trị cho bệnh nhân bị mắc bệnh hemophilia A trong tương lai.

V. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được ở trên cho phép chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã thiết kế thành công vector biểu hiện p.QE-30UA-*A1A2A3C2* mang đoạn gen biểu hiện *A1A2A3C2* của yếu tố VIII.

2. Biến nạp thành công vector mang gen đích vào chủng vi khuẩn *E.coli*.

Đây là một kết quả mang tính thực tiễn, đặc biệt có giá trị khoa học và mang lại hiệu quả cao trong điều kiện kinh tế xã hội ở nước ta hiện nay. Kết quả của nghiên cứu sẽ làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu hóa điều kiện biểu hiện và tinh chế để thu được yếu tố VIII tái tổ hợp có độ tinh khiết cao ứng dụng trong điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cung Thị Tý và cs. Tình hình bệnh Hemophilia ở một số địa phương Miền bắc Việt nam. *Đề tài nghiên cứu cấp bộ đã nghiệm thu*, (1997).

2. **Nguyễn Thu Thúy, Trần Văn Khánh, Phạm Đăng Khoa và Tạ Thành Văn.** Nghiên cứu tách dòng gen mã hóa yếu tố đông máu VIII người. *Tạp chí nghiên cứu y học* **58** (5), 7-12, (2008).
3. **Balagué C, Zhou. Dai. J, Alemany. R, et al.** Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* **95**, 820-828, (2000).
4. **Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J.** "A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene". *Genomics* **7** (1), 1–11 (1990).
5. **Park F, Ohashi K, Kay MA.** Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood* **96**, 1173-1176, (2000).
6. **Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ.** Biochemical, immunological and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* **81**, 2925-2935, (1993).
7. **Randal J. KaufmanS, Louise C. Wasley, and AndreJw. D S.** Processing, and Secretion of Recombinant Human Factor VIII Expressed in Mammalian Cells. *J. Biol.Chem* **263**, 13, 6352-6362 (1998).

Summary

THE DESIGN OF EXPRESSION VECTOR CARRYING HUMAN FACTOR VIII GENE

The successful prophylactic treatments of hemophilia A by recombinant factor VIII as well as gene therapy in animal model are promising for treatment of this disease. **Objective:** In this research, we used two vectors *p.QE30-UA-A1A2* and *p.QE30-UA-A3C2* in order to design the expression vector which carrying *A1A2A3C2* gene of human factor VIII under the transcription control of T5 promoter. **Method:** The *A1A2* fragment from *p.QE30-UA-A1A2* plasmid was cut by *PmII*, *EcoRV* and inserted into *p.QE30-UA-A3C2* plasmid. **Result:** PCR, restriction enzyme and sequencing analysis were used to evaluate the cloning of *A1A2A3C2* gene fragment of human factor VIII to expression vector

p.QE30-UA-A1A2A3C2. **Conclusion:** Successfully inserted *A1A2A3C2* gene fragment of human factor VIII to *p.QE30-UA* plasmid under the transcription control of T5 promoter.

Key words: Hemophilia A, blood-coagulation factor VIII and expression vector.

Đang hoàn thiện thêm 01 bài báo: Biểu hiện protein yếu tố VIII trên hệ *E.coli* (Dự kiến đăng trên tạp chí *Y học Việt Nam*)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. BỆNH HEMOPHILIA.....	3
1.1.1. Lịch sử phát triển của bệnh.....	3
1.1.2. Tình hình mắc bệnh	5
1.1.3. Sinh lý bệnh học	6
1.1.4. Triệu chứng và mức độ nặng của bệnh.....	7
1.1.4.1. Những người có khả năng mắc bệnh hemophilia.....	7
1.1.4.2. Triệu chứng.....	8
1.1.4.3. Xét nghiệm	9
1.1.4.4. Phân loại thể bệnh hemophilia theo mức độ hoạt tính yếu tố VIII.....	9
1.1. 5. Điều trị thay thế yếu tố VIII	10
1.1.6. Các tác dụng không mong muốn khi phải sử dụng phương pháp truyền máu 11	
1.1.6.1. Do bất đồng miễn dịch.....	11
1.1.6.2. Lây nhiễm các bệnh nhiễm trùng qua đường máu	11
Bảng 1. Tình hình nhiễm các virus do truyền máu của BN hemophilia tại Việt Nam. ..	12
1.2. GEN MÃ HÓA YẾU TỐ VIII.....	13
Hình 1. Vị trí của gen tổng hợp yếu tố VIII	13
1.3. PROTEIN YẾU TỐ VIII	13
Hình 2: Yếu tố VIII được tạo ra từ một chuỗi polypeptid có cấu trúc vùng,	14
Hình 3. Cấu trúc phân tử của yếu tố VIII	14
CHƯƠNG 2: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	17
2.1. NGUYÊN LIỆU, HOÁ CHẤT VÀ THIẾT BỊ	17
2.1.1. Nguyên liệu.....	17
2.1.2. Thiết bị.....	17

2.1.3. Hoá chất	17
2.2. PHƯƠNG PHÁP	18
2.2.1. Tách chiết RNA tổng số từ mô gan người.....	19
2.2.2. Xác định nồng độ, độ sạch RNA, cDNA bằng phương pháp quang phổ kế...	20
2.2.3. Phương pháp điện di acid nucleic.....	21
2.2.4. Tổng hợp cDNA sử dụng phương pháp MMLV-RT	22
2.2.5. Khuếch đại 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII.....	22
2.2.6. Tách dòng 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII	24
2.2.6.1. Tách dòng gen.....	24
Hình 2.1. Bản đồ vector tách dòng - pDrive cloning vector.....	24
2.2.7. Thiết kế vector biểu hiện yếu tố VIII.....	30
2.2.7.1. Đưa đoạn gen A1A2 và A3C2 vào vector biểu hiện	30
Hình 2.2. Bản đồ vector biểu hiện pQE-30UA	31
2.2.7.2. Đưa đoạn gen A1A2 vào vector biểu hiện đã mang đoạn gen A3C2	34
2.2.8. Biểu hiện protein yếu tố VIII.....	38
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ.....	41
3.1. Tách chiết RNA tổng số từ mô gan người.....	41
Hình 3.1: Hình ảnh điện di RNA tổng số trên gel agarose.....	41
3.2. Tổng hợp cDNA.....	41
3.3. Khuếch đại 2 đoạn gen A1A2 và A2C3 mã hoá yếu tố VIII.....	42
Hình 3.2: Sản phẩm khuếch đại 2 đoạn gen. A1A2	42
3.4. Tách dòng 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII	42
3.4.1. Kiểm tra hiệu quả tách dòng bằng phản ứng PCR.....	43
Hình 3.4: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A3C2 mã hoá yếu tố VIII.	44
3.4.2. Kiểm tra hiệu quả tách dòng bằng enzym cắt giới hạn	45
Hình 3.5: DNA plasmid mang đoạn gen A1A2 và A3C2	45
Hình 3.6: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A1A2	46

Hình 3.7: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A3C2	47
3.5. Đưa 2 đoạn gen A1A2 và A3C2 mã hoá yếu tố VIII vào vector biểu hiện.....	47
3.5.1. Đưa đoạn gen A1A2 và A3C2 vào vector biểu hiện	47
Hình 3.8: Cấu trúc và vị trí các vùng chức năng của vector biểu hiện pQE-30UA ..	48
Hình 3.9: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A1A2 mã hoá yếu tố VIII.....	49
Hình 3.10: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A3C2 mã hoá yếu tố VIII.	50
Hình 3.11: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A1A2	51
Hình 3.12: Sản phẩm cắt enzym giới hạn của plasmid mang đoạn A3C2	52
3.5.2. Đưa đoạn gen A1A2 vào vector biểu hiện đã mang đoạn gen A3C2	53
Hình 3.13. Sản phẩm cắt trước khi tinh sạch.....	54
Hình 3.14. Sản phẩm cắt sau khi tinh sạch từ gel agarose.	54
Hình 3.15. Sản phẩm khuếch đại đoạn gen A1A2A3C2.....	55
Hình 3.16. DNA plasmid mang đoạn gen A1A2A3C2.....	56
Hình 3.17. Sản phẩm cắt p.QE-30UA-A1A2A3C2.....	57
Hình 3.18. Hình minh họa quả giải trình tự kết quả vector mã hóa yếu tố VIII.	58
3.6. Biểu hiện protein yếu tố VIII.....	58
3.6.1. Biểu hiện protein yếu tố VIII.....	58
Hình 3.19: Điện di protein tổng số trên gel polyacrylamid	59
3.6.2. Đánh giá biểu hiện yếu tố VIII bằng kỹ thuật Western blot	60
Hình 3.20. Hình ảnh Western blot protein yếu tố VIII.....	60
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	61
4.1. TÁCH CHIẾT RNA TỔNG SỐ VÀ TỔNG HỢP cDNA	61
4.2. KHUẾCH ĐẠI VÀ TÁCH DÒNG HAI ĐOẠN GEN A1A2 VÀ A3C2.....	61
4.3. THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN YẾU TỐ VIII.....	62
4.4. ĐÁNH GIÁ BIỂU HIỆN PROTEIN YẾU TỐ VIII BẰNG WESTERN BLOT	63
CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN	66
HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO.....	66

TÀI LIỆU THAM KHẢO	67
TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT.....	67
PHỤ LỤC.....	72

BỘ Y TẾ**THUYẾT MINH ĐỀ TÀI
NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ
PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ****I. Thông tin chung về đề tài**

1. Tên đề tài Nghiên cứu đột biến tại những vùng gen S và gen lõi/tiền lõi của virus viêm gan B.	2. Mã số
3. Thời gian thực hiện: 24 tháng (Từ tháng 7/2009 đến tháng 6/2011)	4. Cấp quản lý NN ☐ Bộ ☒ CS ☐
5. Kinh phí Tổng số: 550 triệu đồng Trong đó, từ Ngân sách SNKH: 550 triệu đồng	
6. Thuộc chương trình: Đề tài cấp Bộ Y tế 2009	
7. Chủ nhiệm đề tài và đồng chủ nhiệm đề tài Họ và tên của chủ nhiệm đề tài: NGUYỄN THỊ HÀ Học hàm/học vị: Phó giáo sư, Tiến sĩ Chức danh khoa học: Phó Giáo sư, Giảng viên cao cấp Điện thoại: (CQ): 04-8523798/245 (NR): 04-37545058 Mobile : 0986461323 Địa chỉ cơ quan: Labo Trung Tâm Y sinh học, Trường Đại học Y Hà Nội Địa chỉ: Số 1, Tôn Thất Tùng, Hà Nội Địa chỉ nhà riêng : Phòng 1405, Nhà A3, Làng quốc tế Thăng Long, Hà Nội Đồng chủ nhiệm đề tài : TẠ THÀNH VĂN Học hàm/ học vị: Phó Giáo sư, Tiến sĩ Y học Chức danh khoa học: Phó Giáo sư, Giảng viên chính Điện thoại: (CQ): 04-8523798/245 Fax: 04-5743641 Mobile: 0912 272922 E-mail: tathanhvan@yahoo.com hoặc tathanhvan@hotmail.com Địa chỉ cơ quan: Bộ môn Hóa-Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội, số 1, Tôn Thất Tùng Địa chỉ nhà riêng: Nhà số 6/2, Ngõ 651, phố Minh Khai, Hà Nội	

8 Cơ quan chủ trì đề tài

Tên tổ chức KH&CN: **Trường Đại học Y Hà Nội, Bộ Y tế**

Điện thoại: 04-8523798

Fax: 04-8525115

Webpage: www.hmu.edu.vn

Địa chỉ: Số 1, Tôn Thất Tùng, Đống Đa, Hà Nội

II. Nội dung KH&CN của đề tài

9 *Mục tiêu của đề tài*

1. Mục tiêu chung

Xác định đặc điểm, tần xuất các đột biến trên vùng gen tiền lõi (precore)/lõi (core-promoter) và gen S trên một số nhóm đối tượng nhiễm virus viêm gan B.

2. Mục tiêu cụ thể

- Xác định tần xuất và đặc tính các đột biến trên các vùng gen tiền lõi (precore)/lõi (core-promoter) và gen S của virus viêm gan B trên nhóm đối tượng là người lành và bệnh nhân mang virus viêm gan
- Xác định trình tự chuỗi axit amin trên quyết định “a” trên kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B và các vị trí đột biến thoát ở các đối tượng đã và chưa tiêm vacxin viêm gan B

10 *Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước*

- Tình trạng đề tài ☒ Mới ☐ Kế tiếp đề tài đã kết thúc giai đoạn trước

- *Tổng quan tình hình nghiên cứu thuộc lĩnh vực của đề tài (Thể hiện sự hiểu biết cần thiết của tổ chức, cá nhân đăng ký chủ trì đề tài về lĩnh vực nghiên cứu - nắm được những công trình nghiên cứu đã có liên quan đến đề tài, những kết quả nghiên cứu mới nhất trong lĩnh vực nghiên cứu đề tài, nêu rõ quan điểm của tác giả về tính bức xúc của đề tài,...)*

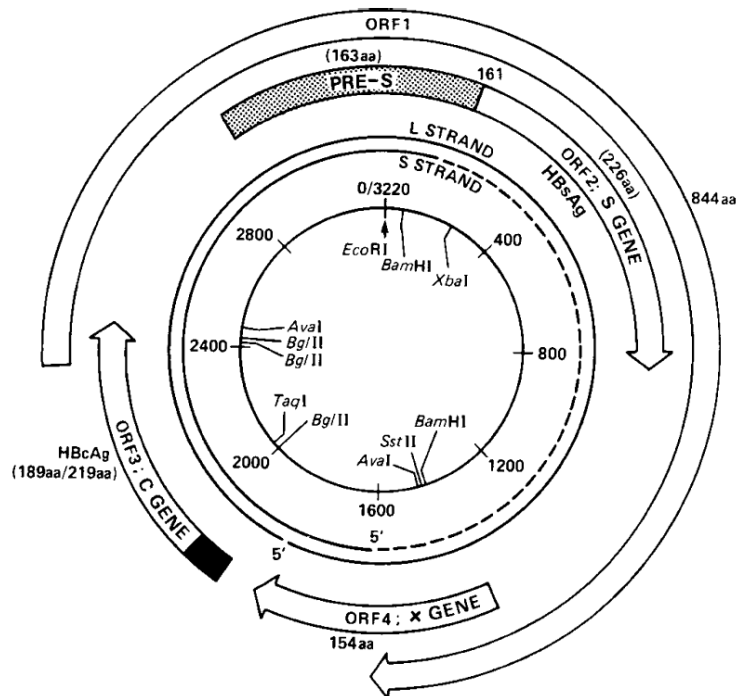
Ngoài nước

Mối liên quan trực tiếp về bệnh học giữa viêm mạn tính và ung thư đã được các nhà y học hiện đại chứng minh một cách rõ ràng trong các nghiên cứu công bố gần đây trên nhiều tạp chí khoa học uy tín (7). Một trong số đó là cơ chế bệnh sinh ung thư tế bào gan nguyên phát (UTTBGNP) trên các bệnh nhân viêm gan mạn mà nguyên nhân chủ yếu là do nhiễm virus gây viêm gan (HBV, HCV...) (2, 39). Theo các nghiên cứu được công bố gần đây khoảng 53 % số ca UTTBGNP có mối tương quan chặt chẽ với

HBV (28). Tỷ lệ phát sinh phát triển ung thư gia tăng gấp 25-37 lần trên các bệnh nhân dương tính với kháng nguyên bề mặt HBsAg và thực tế là 70-90 % UTTBGNP trên bệnh nhân viêm gan B phát triển trên nền gan xơ (40). Mặt khác, bệnh sinh ung thư gan phát triển qua nhiều giai đoạn với những biến đổi ở mức độ phân tử xảy ra trong quá trình biệt hóa, tái cấu trúc và thực bào (3). Hơn nữa đột biến gen tích lũy trong quá trình này sẽ hoạt hóa các gen sinh ung thư và bất hoạt các gen kháng ung thư trên tế bào gan (25) (26) (37). Rõ ràng rằng HBV nguyên nhân hàng đầu của gây nên các thương tổn và bệnh lý về gan. Theo ước tính trên thế giới có khoảng hai tỷ người đã nhiễm HBV, trong đó có trên 400 triệu người đang mang HBV mạn tính (10) (23). Tỷ lệ người mang HBV mạn tính thay đổi theo khu vực địa lý, dao động từ 10-20% dân số ở Trung Quốc, các nước vùng Đông Nam Á, quần đảo Tây Thái Bình Dương và khu vực Sup-Sahara của Châu Phi đến dưới 1% ở khu vực Bắc Âu và Bắc Mỹ (27). Khoảng 15-40% các trường hợp viêm gan B mạn tính phát triển thành xơ gan, suy gan hoặc UTTBGNP(27) (8). Theo báo cáo của viện nghiên cứu ung thư Mỹ, năm 2007 có hơn 700 nghìn ca ung thư gan mới trong đó tập trung chủ yếu ở các nước đang phát triển và khoảng 680 nghìn ca tử vong (16). Ở Việt Nam tỷ lệ nhiễm HBV đứng ở hàng cao nhất thế giới, tỷ lệ HbsAg (+) ở người lớn khỏe mạnh từ 10-20%, thậm chí có nơi lên đến 26% (12). Như vậy ước tính có khoảng 10 triệu người đang mang HBV mạn ở nước ta và nguy cơ phát sinh các bệnh lý về gan như xơ gan, suy gan và UTTBGNP là rất cao. Cho đến nay phương pháp phòng chống nhiễm HBV được áp dụng rộng rãi nhất là sử dụng vacxin HBV kháng kháng nguyên bề mặt virus (HBsAg) (17) (24), tuy nhiên hiệu quả bảo vệ của vacxin phụ thuộc vào nhiều yếu tố như mức độ áp dụng rộng rãi và đồng bộ trong quần thể dân cư, hiệu lực của vacxin và đặc biệt là sự kháng miễn dịch gây nên bởi các đột biến trên gen “S”, trong đó chủ yếu là chuỗi trình tự trên quyết định “a”, quy định HbsAG của HBV (17) (1).

Giới thiệu về virus HBV

Virus viêm gan B (HBV) thuộc dòng họ *Hepanaviridae*, là nguyên nhân gây viêm gan mạn, xơ gan và UTTBGNP (38). Bộ gen (genome) của HBV có cấu trúc chuỗi DNA kép dạng vòng với một mạch đơn không liên tiếp và khép kín chứa khoảng 3200 cặp đôi base (base pair). Bộ gen này chứa bốn đoạn DNA đọc mở chồng nhau (overlapping open-reading frames, ORFs) mã hóa cho bốn loại protein khác nhau: protein vỏ (pre-S/S), lõi (precore/core), sao chép (polymerase, P) và protein X (HBx). Đoạn pre-S/S mã hóa các glycoprotein bề mặt bao gồm: glycoprotein dạng lớn (L), giữa (M) và nhỏ (S). Ba glycoprotein bề mặt này tạo nên cấu trúc kháng nguyên vỏ HBsAg của HBV (14, 15). Đoạn precore/core phiên mã thành chuỗi precore polypeptid và được biến đổi thành protein dạng hòa tan, HbeAg, nucleocapsid protein và kháng nguyên lõi của HBV. Protein polymerase hoạt động như một enzym tái bản và sao chép ngược (reverse transcriptase). Protein X là một tác nhân quan trọng hoạt hóa quá trình phát sinh, phát triển UTTBGNP (2, 34) (19).

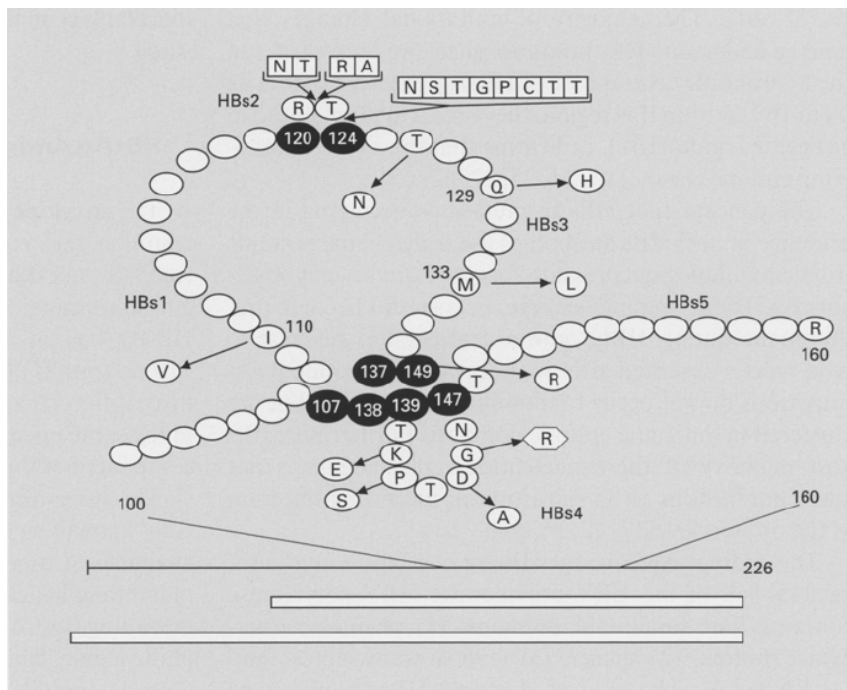


Hình 1. Cấu trúc phân tử của HBV

Vai trò của đột biến gen tiền lõi (precore)/ lõi (core) và gen S.

Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng viêm gan B mạn tính là nguyên nhân hàng đầu gây ra các thương tổn và bệnh lý về gan. Đây là một quá trình diễn ra qua nhiều giai đoạn dưới tác dụng phối hợp của nhiều yếu tố liên quan chặt chẽ với nhau (6). Sau khi xâm nhập vào tế bào gan DNA của virus tiếp hợp với nhiễm sắc thể người bệnh làm thay đổi hoạt động các gen ở gần vị trí tiếp hợp (29) (31). Mặc dù sự tiếp hợp HBV-DNA của virus với nhiễm sắc thể không đóng vai trò quan trọng cho sự nhân lên của virus, nhưng nó cho phép HBV-DNA tồn tại mạn tính trong tế bào gan. Nghiên cứu ứng dụng tiến bộ trong kỹ thuật PCR đã khẳng định sự tiếp hợp gen virus xảy ra trong hầu hết các trường hợp vào giai đoạn sớm của quá trình nhiễm virus và chỉ xảy ra trong quá trình tăng sinh của tế bào. Hậu quả của tiếp hợp này là các protein được phiên mã từ các gen đột biến của HBV tương tác với các protein nội bào làm gia tăng đột biến gen và thay đổi các kênh dẫn truyền tín hiệu tế bào dẫn đến rối loạn sự phát triển bình thường của tế bào gan. Đột biến trên vùng gen tiền lõi (precore)/ lõi (core-promoter) của HBV chủ yếu là dạng đột biến kép T1762A1764, đột biến này thường đi kèm với sự giảm mức độ biểu hiện của HBeAg (20, 21, 36). Đây là đột biến được tìm thấy trên DNA của HBV tách chiết từ huyết thanh và từ khối u trên các bệnh nhân ung thư gan nguyên phát và viêm gan mạn, nhưng ít gặp ở những người lành mang virus và những bệnh nhân có đáp ứng miễn dịch. Do HBeAg có khả năng ức chế sự nhân lên của HBV nên khi mức độ biểu hiện của HBeAg trong tế bào gan giảm xuống sẽ làm gia tăng quá trình tái bản của HBV (20). Đây cũng là nguyên nhân chính gây nên tình trạng viêm gan mạn, giảm

đáp ứng miễn dịch dịch thể và tế bào đồng thời gây tổn thương tế bào gan cũng như gia tăng sự phát sinh phát triển ung thư tế bào gan. Một dạng đột biến khác thường đi cùng với dạng đột biến trên là T1653 và hay gặp ở bệnh nhân ung thư gan nguyên phát. Đột biến này làm thay đổi α -box, là nơi bám của protein C/EBP (enhancer binding protein) và các yếu tố tương hỗ với đoạn trình tự đặc hiệu, gia tăng ái lực của C/EBP và do đó tăng cường hoạt động của vùng gen lõi (core-promoter) tăng khả năng sao chép gen HBV (20, 35). Dạng đột biến thứ ba là đột biến trên các chuỗi trình tự 1753-1757 và 1742-1747. Các dạng đột biến này làm thay đổi cấu trúc vùng promoter, thuận lợi cho enzyme sao chép ngược (reverse-transcriptase) hoạt động và tăng cường tái bản HBV DNA (35). Ngoài ra các dạng đột biến ít gặp hơn gồm có: A/T1764A/G1766 và T1766A1768 (13), vai trò của các đột biến này chưa rõ ràng cần làm sáng tỏ bởi các nghiên cứu bổ sung. Đột biến xóa đoạn và thêm đoạn cũng xảy ra trên vùng gen tiền lõi/ lõi của HBV. Có ít nhất 20 loại đột biến xóa một đoạn trình tự nucleotide đã được mô tả trên các bệnh nhân có biểu hiện tổn thương tế bào gan nặng như xơ gan và ung thư tế bào gan (18, 22). Đây là dạng đột biến thường xảy ra trong giai đoạn muộn của bệnh và thường có các triệu chứng lâm sàng điển hình (20).



Hình 2. Cấu trúc phân tử của chuỗi axit amin trên quyết định “a” trên kháng nguyên bề mặt của HBV. Hai vòng acid amin chính tại vùng ưa nước được xác định bởi các cầu nối disulfide. Vị trí các đột biến được thể hiện bằng các chữ số trong vòng tròn. Đột biến thoát chủ yếu ở vòng acid amin thứ 2 trên chuỗi trình tự quyết định “a”, từ vị trí acid amin 139-147 hoặc 149.

Ở khía cạnh khác, đột biến trên gen S của HBV, bao gồm chuỗi trình tự quyết định “a”, thường xảy ra trên các nucleotide trong bộ ba mã hóa tại một số vị trí điển hình làm thay đổi trình tự acid amin bao gồm: I/T126A, Q129H, T131I, M133L, K141E, T143L, D144H/A, G145R, và thêm ba amino acid giữa hai acid amin ở vị trí 123 và 124, trong đó quan trọng nhất là đột biến G145A (6, 33) (4) (32). Các đột biến này làm thay đổi cấu trúc gen nhưng không ngăn cản sự tổng hợp và tiết HbsAg (6). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng đột biến trên chuỗi trình tự quyết định “a” liên quan đến hiệu lực của vaccine hoạt hóa kháng thể kháng HBs (30, 43). Nhiều acid amin thay đổi ở vùng tiếp xúc của HbsAg bao gồm cả xóa đoạn trình tự trước acid amin 124 được xác định là làm giảm khả năng bám, bắt hoạt phản ứng của kháng thể đơn và đa dòng kháng HBs với cụm epitope của chuỗi trình tự quyết định “a” (11). Đây là các đột biến “thoát” làm mất hiệu lực bảo vệ của vaccine đối với các đối tượng nhiễm HBV (5) (9). Dạng đột biến thứ hai xảy ra trên gen S của HBV là đột biến xóa đoạn preS. Theo Gao ZY và CS thì đột biến này xảy ra trên bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát và viêm gan mạn với tần xuất lần lượt là 38,46% và 7,14%. Thông thường đột biến trên gen S bao gồm chuỗi trình tự quyết định “a” của HBV không phát hiện được trên các bệnh nhân viêm gan cấp do HBV. Sự tích lũy đột biến trên gen S song song với sự tồn tại của HBV trong cơ thể và phần nào đó chỉ được phát hiện trong giai đoạn muộn của bệnh với những tổn thương điển hình tại tế bào gan (42). Đột biến này có thể truyền qua các đối tượng và tồn tại cả khi có sự hiện diện của kháng thể kháng HBs với nồng độ cao trong huyết thanh (41). Đây là một vấn đề đầy thách thức đối với các nhà Y-Sinh học trong việc tìm ra các vaccine mới có hiệu lực với các loại đột biến nói trên.

Trong nước:

Các nghiên cứu được thực hiện từ trước đến nay ở nước ta chủ yếu là điều tra về tỉ lệ nhiễm, người lành mang virus mắc bệnh cùng với một số phương pháp chẩn đoán, điều trị viêm gan mạn và UTTBGNP. Theo Hipgrave và CS, tỷ lệ HbsAg (+) ở người lớn khỏe mạnh ở nước ta từ 10-20%. Nghiên cứu các yếu tố nguy cơ cho thấy tỉ lệ bệnh nhân UTTBGNP sau viêm gan mạn là trên 50%. Tần suất xuất hiện ung thư sau thời gian nhiễm virus sau 5 năm là 6%, sau 10 năm là 15% (31). Theo thống kê của Trần Thị Chính và CS thì tỉ lệ bệnh nhân UTTBGNP có HbsAg (+) chiếm tới 82% và theo một số tác giả khác thì tỉ lệ này cũng khá cao chiếm từ 62-85%. Trong những năm gần đây với sự phát triển mạnh mẽ trong nghiên cứu Y sinh học phân tử và tế bào ở nước ta, một số nhóm nghiên cứu đã bước đầu xác định đột biến trên gen X của HBV nhưng chưa có một nghiên cứu đồng bộ nào được triển khai để đánh giá đột biến trên gen tiền lõi/ lõi cũng như gen S của HBV. Đây là một nghiên cứu có ý nghĩa hết sức quan trọng vì sự thay đổi về gen bao giờ cũng là sự thay đổi sớm nhất trước khi xuất hiện thay đổi hình thái tế bào. Việt Nam là quốc gia có tỉ lệ nhiễm HBV cao, việc xác định đột biến gen HBV từ đó tìm ra các đột biến đặc hiệu để dự đoán các yếu tố nguy cơ, chẩn đoán sớm và chẩn đoán giai đoạn phát triển cũng như đánh giá tiên lượng các bệnh lý về gan

là một việc làm hết sức cấp bách và cần thiết. Đây cũng là một công trình có tính khoa học và thực tiễn cao, giải quyết một vấn đề bức thiết đặt ra cho nền Y học Việt Nam. Là trường Đại học Y đầu ngành trong cả nước, Trường Đại học Y Hà Nội có đội ngũ khoa học nhiều kinh nghiệm trong lĩnh vực Y học cơ sở cũng như Y học lâm sàng. Đó là tiền đề vững chắc để có thể áp dụng những tiến bộ khoa học trong lĩnh vực Y-Sinh học phân tử và thực tiễn lâm sàng phục vụ sự nghiệp chăm sóc sức khỏe người dân. Trường đã và đang chủ trì những dự án lớn về Đào tạo-Nghiên cứu khoa học, kể cả các dự án do tổ chức quốc tế tài trợ, nhiều trang thiết bị hiện đại đã được đầu tư cho các Bộ môn Y học cơ sở như Bộ môn Hoá sinh, Bộ môn Mô phôi, Bộ môn Sinh học-Di truyền, Bộ môn Miễn dịch và đặc biệt là Labo trung tâm với các danh mục trang thiết bị cần thiết và Trường cũng đang được Bộ Y tế cấp kinh phí để xây dựng một Trung tâm Gen-Protein với đầy đủ các trang thiết bị máy móc hiện đại, cần thiết để có thể triển khai các công trình nghiên cứu khoa học theo định hướng này.

- Liệt kê danh mục các công trình nghiên cứu có liên quan đã được công bố trong vòng 10 năm gần đây hoặc đề tài nghiên cứu đã được nghiệm thu trong vòng 5 năm gần đây.

Tài liệu tham khảo

1. **Ashton-Rickardt, P. G., and K. Murray.** 1989. Mutations that change the immunological subtype of hepatitis B virus surface antigen and distinguish between antigenic and immunogenic determination. *J Med Virol* **29**:204-14.
2. **Beasley, R. P.** 1988. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* **61**:1942-56.
3. **Brechot, C., D. Gozuacik, Y. Murakami, and P. Paterlini-Brechot.** 2000. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol* **10**:211-31.
4. **Bruce, S. A., and K. Murray.** 1995. Mutations of some critical amino acid residues in the hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* **46**:157-61.
5. **Chiou, H. L., T. S. Lee, J. Kuo, Y. C. Mau, and M. S. Ho.** 1997. Altered antigenicity of 'a' determinant variants of hepatitis B virus. *J Gen Virol* **78** (Pt 10):2639-45.
6. **Cooreman, M. P., G. Leroux-Roels, and W. P. Paulij.** 2001. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci* **8**:237-47.
7. **Coussens, L. M., and Z. Werb.** 2002. Inflammation and cancer. *Nature* **420**:860-7.
8. **Fattovich, G., T. Stroffolini, I. Zagni, and F. Donato.** 2004. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* **127**:S35-50.

9. **Fujii, H., K. Moriyama, N. Sakamoto, T. Kondo, K. Yasuda, Y. Hiraizumi, M. Yamazaki, Y. Sakaki, K. Okochi, and E. Nakajima.** 1992. Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:1152-7.
10. **Ganem, D., and A. M. Prince.** 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**:1118-29.
11. **Grethe, S., M. Monazahian, I. Bohme, and R. Thomssen.** 1998. Characterization of unusual escape variants of hepatitis B virus isolated from a hepatitis B surface antigen-negative subject. *J Virol* **72**:7692-6.
12. **Hipgrave, D. B., T. V. Nguyen, M. H. Vu, T. L. Hoang, T. D. Do, N. T. Tran, D. Jolley, J. E. Maynard, and B. A. Biggs.** 2003. Hepatitis B infection in rural Vietnam and the implications for a national program of infant immunization. *Am J Trop Med Hyg* **69**:288-94.
13. **Horikita, M., S. Itoh, K. Yamamoto, T. Shibayama, F. Tsuda, and H. Okamoto.** 1994. Differences in the entire nucleotide sequence between hepatitis B virus genomes from carriers positive for antibody to hepatitis B e antigen with and without active disease. *J Med Virol* **44**:96-103.
14. **Howard, C. R.** 1995. The structure of hepatitis B envelope and molecular variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* **2**:165-70.
15. **Howard, C. R., and C. J. Burrell.** 1976. Structure and nature of hepatitis B antigen. *Prog Med Virol* **22**:36-103.
16. **Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, and M. J. Thun.** 2007. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* **57**:43-66.
17. **Jilg, W.** 1998. Novel hepatitis B vaccines. *Vaccine* **16 Suppl**:S65-8.
18. **Kanai, K., M. Kako, T. Aikawa, K. Hino, H. Tsubouchi, Y. Takehira, S. Iwabuchi, T. Kawasaki, F. Tsuda, H. Okamoto, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1996. Core promoter mutations of hepatitis B virus for the response to interferon in e antigen-positive chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* **91**:2150-6.
19. **Kao, J. H.** 2002. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* **17**:643-50.
20. **Kramvis, A., and M. C. Kew.** 1999. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* **6**:415-27.
21. **Kurosaki, M., N. Enomoto, Y. Asahina, I. Sakuma, T. Ikeda, S. Tozuka, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato.** 1996. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* **49**:115-23.
22. **Laskus, T., J. Rakela, M. J. Tong, M. J. Nowicki, J. W. Mosley, and D. H. Persing.** 1994. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *J Hepatol* **20**:837-41.
23. **Lee, W. M.** 1997. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* **337**:1733-45.

24. **Lemon, S. M., and D. L. Thomas.** 1997. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med* **336**:196-204.
25. **Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**:643-9.
26. **Loeb, L. A., and F. C. Christians.** 1996. Multiple mutations in human cancers. *Mutat Res* **350**:279-86.
27. **Lok, A. S.** 2004. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**:S303-9.
28. **Lupberger, J., and E. Hildt.** 2007. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* **13**:74-81.
29. **Murakami, Y., K. Saigo, H. Takashima, M. Minami, T. Okanoue, C. Brechot, and P. Paterlini-Brechot.** 2005. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* **54**:1162-8.
30. **Okamoto, H., K. Yano, Y. Nozaki, A. Matsui, H. Miyazaki, K. Yamamoto, F. Tsuda, A. Machida, and S. Mishiroy.** 1992. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. *Pediatr Res* **32**:264-8.
31. **Paterlini-Brechot, P., K. Saigo, Y. Murakami, M. Chami, D. Gozuacik, C. Mugnier, D. Lagorce, and C. Brechot.** 2003. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* **22**:3911-6.
32. **Prange, R., C. M. Mangold, R. Hilfrich, and R. E. Streeck.** 1995. Mutational analysis of HBsAg assembly. *Intervirology* **38**:16-23.
33. **Ruiz-Tachiquin, M. E., H. A. Valdez-Salazar, V. Juarez-Barreto, M. Dehesa-Violante, J. Torres, O. Munoz-Hernandez, and M. T. Alvarez-Munoz.** 2007. Molecular analysis of hepatitis B virus "a" determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virol J* **4**:6.
34. **Seeger, C., and W. S. Mason.** 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:51-68.
35. **Takahashi, K., Y. Akahane, K. Hino, Y. Ohta, and S. Mishiroy.** 1998. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* **143**:2313-26.
36. **Takahashi, K., K. Aoyama, N. Ohno, K. Iwata, Y. Akahane, K. Baba, H. Yoshizawa, and S. Mishiroy.** 1995. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *J Gen Virol* **76 (Pt 12)**:3159-64.
37. **Thorgeirsson, S. S., and J. W. Grisham.** 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **31**:339-46.

	38. Tiollais, P., C. Pourcel, and A. Dejean. 1985. The hepatitis B virus. <i>Nature</i> 317:489-95. 39. Tsukuma, H., T. Hiyama, S. Tanaka, M. Nakao, T. Yabuuchi, T. Kitamura, K. Nakanishi, I. Fujimoto, A. Inoue, H. Yamazaki, and et al. 1993. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. <i>N Engl J Med</i> 328:1797-801. 40. Velazquez, R. F., M. Rodriguez, C. A. Navascues, A. Linares, R. Perez, N. G. Sotorrios, I. Martinez, and L. Rodrigo. 2003. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. <i>Hepatology</i> 37:520-7. 41. Weber, B. 2005. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. <i>J Clin Virol</i> 32:102-12. 42. Zhang, Y. Y., E. Nordenfelt, and B. G. Hansson. 1996. Increasing heterogeneity of the 'a' determinant of HBsAg found in the presumed late phase of chronic hepatitis B virus infection. <i>Scand J Infect Dis</i> 28:9-15. 43. Zuckerman, J. N., and A. J. Zuckerman. 2003. Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. <i>Antiviral Res</i> 60:75-8.
11	<i>Cách tiếp cận, phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sẽ sử dụng</i> (luận cứ rõ cách tiếp cận - thiết kế nghiên cứu, cách chọn mẫu, cỡ mẫu, tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu, phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sẽ sử dụng - so sánh với các phương thức giải quyết tương tự khác, các chỉ tiêu nghiên cứu, phương tiện kỹ thuật, trang thiết bị để xác định các chỉ tiêu nghiên cứu, nêu được tính mới, tính độc đáo, tính sáng tạo của thiết kế nghiên cứu và phương pháp nghiên cứu này)
	Như đã trình bày ở trên HBV là nguyên nhân chủ yếu gây ra các tổn thương nghiêm trọng trong các bệnh lý về gan. Cho đến nay việc điều trị các bệnh lý về gan như viêm gan mạn, xơ gan hay ung thư tế bào gan nguyên phát vẫn đang còn là một trở ngại lớn đối với các nhà Y học. Hiệu quả của điều trị là rất thấp và tốn kém. Phương pháp phòng nhiễm HBV bằng cách sử dụng vaccine ở nước ta đã có những thành công nhất định với tỷ lệ người dân sử dụng ngày càng cao và hơn nữa chúng ta đã sản xuất được vaccine phòng HBV có đáp ứng miễn dịch tốt. Tuy nhiên những đột biến thoát trên chuỗi trình tự quyết định “a” làm giảm hiệu lực của vaccine và có thể lan truyền giữa các đối tượng nhiễm HBV trong cộng đồng dân cư. Chính vì vậy, mối quan tâm hàng đầu của các nhà Y học hiện nay đối với UTTBGNP không chỉ ở Việt Nam mà còn trên thế giới là tìm ra các đột biến điển hình trên vùng gen tiền lõi/ lõi cũng như gen S của HBV để đánh giá được mối tương quan giữa đột biến và bệnh sinh cũng như các tổn thương bệnh lý tại tế bào gan. Xác định được các đột biến thoát trên chuỗi trình tự quyết định “a” của gen S để

có những nghiên cứu tiếp theo nhằm đưa ra các sản phẩm vaccine mới có hiệu lực với các dạng đột biến trên. Dựa trên điều kiện về con người, với đội ngũ cán bộ khoa học chuyên ngành Y-Sinh học phân tử tế bào và Miễn dịch học nhiều kinh nghiệm cùng với trang thiết bị hiện đại hiện có, chúng tôi thiết kế mô hình nghiên cứu triển khai đề tài này theo các bước sau: i) *Lựa chọn đối tượng, thu thập và bảo quản mẫu nghiên cứu*; ii) *Thiết lập và chuẩn hóa các kỹ thuật tách chiết gen và phân tích đột biến*; iii) *Đánh giá mối tương quan giữa đột biến gen và các giai đoạn phát triển bệnh*; iv) *Xác định các vị trí đột biến thoát trên chuỗi trình tự quyết định “a” của gen S trên các đối tượng đã và chưa tiêm vaccine từ đó đề xuất giải pháp can thiệp..* Để thực hiện được toàn bộ quy trình công nghệ đề ra ở trên, hiện nay các nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã có tất cả trang thiết bị cũng như làm chủ được các kỹ thuật cần thiết. Thêm vào đó các nhóm nghiên cứu đã và đang nhận được sự trợ giúp về kỹ thuật và đào tạo cán bộ từ các đối tác từ các cường quốc về tế bào gốc như Hoa Kỳ, Nhật Bản, Thụy Điển, Singapore. Điều này đảm bảo cho đề tài có tính khả thi cao.

Phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng:

11.1. Lựa chọn đối tượng, thu thập và bảo quản mẫu nghiên cứu:

- Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng tham gia vào nghiên cứu gồm bệnh nhân mang HBV có viêm gan mạn hoặc xơ gan. Các đối tượng được lựa chọn phân bố cân đối theo tuổi và giới.
- Tất cả các đối tượng được làm các xét nghiệm chẩn đoán, các bệnh nhân được thăm khám lâm sàng và các xét nghiệm thăm dò hình thái để chẩn đoán xác định bệnh. Các đối tượng và bệnh nhân tham gia nghiên cứu không bị các bệnh lý phối hợp khác.

- Cách thức thu thập mẫu

- Thu thập mẫu máu: Khoảng 50 mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân thuộc nhóm đối tượng nghiên cứu: người mang HBV bị viêm gan mạn, xơ gan sẽ được thu thập. Các đối tượng nghiên cứu được thu thập tại Bệnh viện trường Đại học Y Hà Nội và Viện Y học Lâm sàng các bệnh Nhiệt đới quốc gia.

11.2. Thiết lập và chuẩn hóa các kỹ thuật tách chiết gen và phân tích đột biến

Gồm các phương pháp và kỹ thuật sau:

- Thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho phản ứng khuếch đại các đoạn gen precore/ core và gen S của HBV.

- Kỹ thuật tách chiết DNA:

- DNA được tách chiết từ huyết thanh sử dụng QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen

Inc., Hilden, Germany).

- Kỹ thuật xác định týp virus và các dấu ấn kháng nguyên của virus viêm gan B:
 - Týp virus viêm gan B được xác định bằng phương pháp khuếch đại gen hình thái giới hạn (PCR-RFLP).
 - Các dấu ấn kháng nguyên của virus viêm gan B được xác định bằng phương pháp Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
- Xây dựng các quy trình tách dòng gen và lựa chọn vector biến nạp phù hợp (pTEeasy...) với từng đoạn gen virus. Thực hiện tách dòng sản phẩm PCR, và biến nạp vào E. Coli, tách chiết và tinh sạch plasmid.
- Kỹ thuật giải trình tự gen và phân tích đột biến:
 - DNA của virus tách chiết từ huyết thanh được sử dụng để khuếch đại vùng gen tiền lõi (precore)/ lõi (core) và vùng gen S bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu.
 - Sản phẩm PCR được tinh sạch từ agarose gel sử dụng Promega Wizard SV gel clean-up system (Promega, USA) và phương pháp Ethanol precipitation.
 - DNA sau khi tinh sạch được đưa vào giải trình tự trực tiếp sử dụng (tách dòng gen trong vector) sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).
 - Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự của chủng hoang dại trên GenBank (National center for biotechnology information, NCBI) và phân tích theo phương pháp ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

11.3- Đánh giá đột biến gen trên các nhóm đối tượng nghiên cứu

- Các trình tự gen sau khi phân tích được đối chiếu kết quả sử dụng chương trình GENETYX (GENETYX Corporation, Tokyo, Japan).
- Phân bố đột biến điểm và đột biến xóa đoạn được đánh giá bằng Chi-squared test và Fischer's test.
- Kết quả phân tích gen, định týp virus, các dấu ấn kháng nguyên virus được phân tích sử dụng "Wilcoxon rank sum" và Fischer's exact test.
- Tương tác của các yếu tố nguy cơ do hậu quả của đột biến gen đến sự phát sinh phát triển các bệnh lý về gan được phân tích theo phương pháp "Logistic regression".
- Kết quả mang ý nghĩa thống kê được thiết lập ở mức $P < 0.05$.

Tính mới, tính độc đáo, tính sáng tạo:

Trong khuôn khổ của đề tài này chúng tôi đề xuất và dự định thực hiện một số phương pháp và kỹ thuật mới như sau:

	➤ Sử dụng enzyme Pyrobest polymerase có tác dụng sửa chữa các nucleotide bắt cặp nhầm trong các phản ứng PCR xác định trình tự. Phương pháp này tăng độ chính xác và phản ánh trung thực kết quả nghiên cứu. Kỹ thuật này là khâu then chốt trong việc xác định một cách chính xác các đột biến điển hình trên chuỗi trình tự quyết định “a” trên gen S của HBV. 11-4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu: ▪ Các đối tượng nghiên cứu hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. ▪ Các đối tượng nghiên cứu lấy máu, gai rau hoặc tế bào nước ối để phân tích gen miễn phí. ▪ Các đối tượng được bồi dưỡng khi phỏng vấn, lấy mẫu xét nghiệm. ▪ Đối tượng hoàn toàn có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia vào nghiên cứu. ▪ Các thông tin của đối tượng sẽ được đảm bảo bí mật.
12	Nội dung nghiên cứu (liệt kê và mô tả những nội dung nghiên cứu cần thiết, nêu bật được những nội dung mới và phù hợp để giải quyết vấn đề đặt ra, giải quyết các mục tiêu nghiên cứu đã đề ra kể cả những dự kiến hoạt động phối hợp để chuyển giao kết quả nghiên cứu đến người sử dụng)
	1. Lựa chọn đối tượng nghiên cứu. ▪ Xây dựng các mẫu phiếu, bệnh án. ▪ Thăm khám lâm sàng và thực hiện các xét nghiệm chẩn đoán. ▪ Lựa chọn mẫu nghiên cứu. 2. Tiến hành lấy máu của các đối tượng tham gia nghiên cứu để tách chiết DNA. 3. Chuẩn hoá kỹ thuật PCR khuếch đại vùng gen tiền lõi/ lõi và gen S 4. Chuẩn hóa quy trình tách dòng gen và biến nạp vào vector. 5. Chuẩn hóa kỹ thuật và phương pháp giải trình tự gen. 6. Phân tích kết quả, xác định các vị trí đột biến điển hình và các đột biến thoát trên chuỗi trình tự quyết định “a” của gen S. 7. Đánh giá mối tương quan giữa đột biến gen HBV và các giai đoạn phát triển của HBV gây tổn thương tế bào gan. 8. Đề xuất giải pháp can thiệp và các ứng dụng trong việc hoàn thiện các sinh phẩm chẩn đoán và nghiên cứu vắc xin. 9. Tổng kết và viết báo cáo.

13	Hợp tác quốc tế			
Tên đối tác			Nội dung hợp tác	
Đã hợp tác	- Phòng Sinh học phân tử và gen, Khoa Y, Trường Đại học tổng hợp Kyoto, Nhật Bản. - Phòng Công nghệ gen-protein, Khoa Sinh học ứng dụng, Viện Khoa học Công nghệ Kyoto, Nhật Bản. Phòng Sinh học phân tử và Nội tiết, Khoa Sinh học, Trường Đại học Tổng hợp Delaware, Delaware, Hoa Kỳ.		- Đào tạo Tiến sĩ và nâng cao sau Tiến sĩ về Công nghệ gen - Đào tạo Tiến sĩ và phối hợp nghiên cứu về Công nghệ protein và các hợp chất tự nhiên. - Đào tạo nâng cao sau Tiến sĩ về Sinh học phân tử tế bào.	
14	Tiến độ thực hiện			
TT	Các nội dung, công việc chủ yếu (các mốc đánh giá chủ yếu)	Sản phẩm phải đạt	Thời gian (BĐKT)	Người thực hiện
1	2	3	4	5
1	Lựa chọn đối tượng nghiên cứu: Xây dựng các mẫu phiếu, bệnh án, thăm khám lâm sàng và thực hiện các xét nghiệm chẩn đoán và lấy mẫu.	Lựa chọn đúng và đủ đối tượng nghiên cứu. Thu thập đủ mẫu nghiên cứu.	7/2009-9/2009	Đặng Kim Oanh và CS. Khoa Nội, Bệnh viện Bạch Mai / Bộ môn Nội, Trường Đại học Y Hà Nội
2	Xác định týp virus và các dấu ấn kháng nguyên của virus viêm gan B	Tối ưu hoá được các điều kiện cho các quy trình.	8/2000-10/2009	Nguyễn Thị Hà và CS, Trường ĐHY Hà Nội
3	Thiết kế mới và chuẩn hóa kỹ thuật tách chiết DNA	Tối ưu hoá được các điều kiện cho các quy trình.	8/2009-9/2009	Tạ Thành Văn, Trần Văn Khánh và CS, Trường ĐHY Hà Nội
3	Chuẩn hoá kỹ thuật	Tối ưu hoá được các điều	10/2009	Tạ Thành Văn,

	PCR khuếch đại vùng gen tiền lõi/ lõi và gen S. Thực hiện khuếch đại gen.	kiện cho các quy trình. Khuếch đại được vùng gen giải trình tự.	11/2009	Trần Văn Khánh và CS, Trường ĐHY Hà Nội
4	Chuẩn hóa quy trình tách dòng gen và biến nạp vào vector.	Biến nạp được vùng gen giải trình tự vào vector, thu được plasmid tinh khiết.	12/2009-1/2010	Trần Văn Khánh, Nguyễn Thu Thúy và CS. ĐHY Hà Nội
5	Chuẩn hóa kỹ thuật, phương pháp và thực hiện giải trình tự gen.	Chuẩn hoá được quy trình. Kết quả giải trình tự gen rõ ràng.	2/2009-3/2010	Trần Văn Khánh, Nguyễn Thị Phương Thúy, Nguyễn Hữu Thọ và CS. ĐHY Hà Nội
6	Phân tích kết quả, xác định các vị trí đột biến điển hình và các đột biến thoát trên chuỗi trình tự quyết định “a” của gen S.	Kết quả rõ ràng, có thể đánh giá và phân tích được bằng các phương pháp thống kê.	4/2009-7/2010	Nguyễn Thu Thúy, Nguyễn Thị Phương Thúy, Nguyễn Thúy Hà và CS. ĐHY Hà Nội
7	Đánh giá mối tương quan giữa đột biến gen HBV và các giai đoạn phát triển của HBV gây tổn thương tế bào gan.		8/2009-12/2010	Nguyễn Thu Thúy, Nguyễn Thúy Hà và CS. ĐHY Hà Nội
8	Đề xuất giải pháp can thiệp và các ứng dụng trong việc hoàn thiện các sinh phẩm chẩn đoán và nghiên cứu vaccin.		4/2011	Tạ Thành Văn và CS. ĐHY Hà Nội
9	Đánh giá và nghiệm thu đề tài		4/2011-6/2011	Tạ Thành Văn, Nguyễn Thị Hà và CS. ĐHY Hà Nội

III. Kết quả của đề tài

15	Dạng kết quả dự kiến của đề tài																																						
<table><tr><td>I</td><td>II</td><td>III</td><td></td></tr><tr><td>♦ Mẫu (model, maket)</td><td>♦ Quy trình công nghệ</td><td>♦ Sơ đồ</td><td></td></tr><tr><td>♦ Sản phẩm</td><td>♦ Phương pháp</td><td>♦ Bảng số liệu</td><td></td></tr><tr><td>♦ Vật liệu</td><td>♦ Tiêu chuẩn</td><td>♦ Báo cáo phân tích</td><td></td></tr><tr><td>♦ Thiết bị, máy móc</td><td>♦ Quy phạm</td><td>♦ Tài liệu dự báo</td><td></td></tr><tr><td>♦ Dây truyền công nghệ</td><td>♦ Chuyển giao kỹ thuật</td><td>♦ Đề án, quy hoạch, triển khai</td><td></td></tr><tr><td>♦ Thuộc mới</td><td></td><td>♦ Luận chứng kinh tế-kỹ thuật, nghiên cứu khả thi</td><td></td></tr><tr><td>♦ Vắc xin mới</td><td></td><td>♦ Chương trình máy tính</td><td></td></tr><tr><td>♦ Sinh phẩm mới</td><td></td><td>♦ Khác (các bài báo, đào tạo NCS, SV,...</td><td></td></tr></table>				I	II	III		♦ Mẫu (model, maket)	♦ Quy trình công nghệ	♦ Sơ đồ		♦ Sản phẩm	♦ Phương pháp	♦ Bảng số liệu		♦ Vật liệu	♦ Tiêu chuẩn	♦ Báo cáo phân tích		♦ Thiết bị, máy móc	♦ Quy phạm	♦ Tài liệu dự báo		♦ Dây truyền công nghệ	♦ Chuyển giao kỹ thuật	♦ Đề án, quy hoạch, triển khai		♦ Thuộc mới		♦ Luận chứng kinh tế-kỹ thuật, nghiên cứu khả thi		♦ Vắc xin mới		♦ Chương trình máy tính		♦ Sinh phẩm mới		♦ Khác (các bài báo, đào tạo NCS, SV,...	
I	II	III																																					
♦ Mẫu (model, maket)	♦ Quy trình công nghệ	♦ Sơ đồ																																					
♦ Sản phẩm	♦ Phương pháp	♦ Bảng số liệu																																					
♦ Vật liệu	♦ Tiêu chuẩn	♦ Báo cáo phân tích																																					
♦ Thiết bị, máy móc	♦ Quy phạm	♦ Tài liệu dự báo																																					
♦ Dây truyền công nghệ	♦ Chuyển giao kỹ thuật	♦ Đề án, quy hoạch, triển khai																																					
♦ Thuộc mới		♦ Luận chứng kinh tế-kỹ thuật, nghiên cứu khả thi																																					
♦ Vắc xin mới		♦ Chương trình máy tính																																					
♦ Sinh phẩm mới		♦ Khác (các bài báo, đào tạo NCS, SV,...																																					
16	Yêu cầu khoa học đối với sản phẩm tạo ra (dạng kết quả II, III)																																						
TT	Tên sản phẩm	Yêu cầu khoa học	Chú thích																																				
1	2	3	4																																				
1	Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ huyết thanh	- Thu được DNA tinh khiết; OD 260/280 ~ 1.8-2. (trương đương tiêu chuẩn BD Biosciences, San jose, CA, USA)																																					
2	Quy trình giải trình tự gen xác định đột biến	- Xác định được trình tự các nucleotid trực tiếp từ sản phẩm PCR - Hình ảnh rõ ràng đối chiếu được với trình tự trên GenBank - Xác định được các kiểu và vị trí đột biến																																					
3	Phương pháp xác định đột biến điển hình bằng PCR và enzyme cắt giới hạn	- Hình ảnh điện di trên agarose gel rõ ràng - Sản phẩm PCR cắt bằng enzym đúng kích thước																																					
4	03 bài báo	Đăng trên tạp chí khoa học chuyên ngành uy tín trong nước																																					
5	Đào tạo 01 nghiên cứu sinh hoặc 02 cao học hoặc bác sĩ	- Nắm vững các kỹ thuật Y sinh học phân tử																																					

	đa khoa	- Biết cách thiết lập mô hình nghiên cứu - Độc lập trong nghiên cứu				
5.	Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài.	Được hội đồng nghiệm thu chấp nhận				
17	<i>Yêu cầu kỹ thuật, chỉ tiêu chất lượng đối với sản phẩm tạo ra (dạng kết quả I)</i>					
TT	Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu	Đơn vị đo	Mức chất lượng			Dự kiến số lượng sản phẩm tạo ra
			Cần đạt	Mẫu tương tự		
				Trong nước	Thế giới	
I	2	3	4	5	6	7
1						
18	<i>Phương thức chuyển giao kết quả nghiên cứu</i> (Nêu tính ổn định của các thông số công nghệ, ghi địa chỉ khách hàng và mô tả cách thức chuyển giao kết quả...)					
19	<i>Các tác động của kết quả nghiên cứu</i> (ngoài tác động đã nêu tại mục 18 trên đây)					
<i>Bồi dưỡng đào tạo cán bộ khoa học</i> Trong khuôn khổ của đề tài 01 nghiên cứu sinh hoặc 02 Thạc sĩ hoặc Bác sĩ đa khoa sẽ được đào tạo. Thêm vào đó nhiều cán bộ giảng dạy, cán bộ nghiên cứu trẻ và kỹ thuật viên thuộc các Bộ môn Y học cơ sở trong các Trường Đại học Y, Bệnh viện sẽ được tập huấn các kỹ thuật Y-Sinh học phân tử ứng dụng trong Y học như: PCR, giải trình tự gen để phát hiện đột biến... <i>Đối với lĩnh vực khoa học liên quan</i> Kết quả nghiên cứu của đề tài này là tiền đề quan trọng để dự đoán các yếu tố nguy cơ, chẩn đoán sớm và chẩn đoán giai đoạn phát triển cũng như đánh giá tiên lượng các bệnh lý về gan. Việc xác định đột biến gen HBV từ đó tìm ra các đột biến đặc hiệu là một việc làm hết sức có ý nghĩa giúp cho các nhà Y-Sinh học trong việc tìm ra các vaccine mới có hiệu lực. <i>Đối với kinh tế - xã hội</i> Sản xuất ra vaccine mới và có hiệu lực để phòng chống viêm gan sẽ giúp ngăn ngừa và làm giảm tỉ lệ mắc bệnh, giảm thiểu những thiệt hại về người gây ra bởi ung thư do viêm gan. Đây cũng là một trong những định hướng quan trọng trong chiến lược chăm sóc sức khỏe, nâng cao hiệu quả kinh tế xã hội của Đảng và Nhà nước ta.						

20	Hoạt động của các tổ chức phối hợp tham gia thực hiện đề tài (Ghi tất cả các tổ chức phối hợp thực hiện đề tài và phân nội dung công việc tham gia trong đề tài)		
TT	Tên tổ chức	Địa chỉ	Hoạt động/đóng góp cho đề tài
1			
2			
3			
4			
5			
6			
21	Liên kết với sản xuất và đời sống (Ghi rõ đơn vị sản xuất hoặc những người sử dụng kết quả nghiên cứu tham gia vào quá trình thực hiện và nêu rõ nội dung công việc thực hiện trong đề tài)		

IV. Các tổ chức/ cá nhân tham gia thực hiện đề tài

22	Đội ngũ cán bộ thực hiện đề tài (Ghi những người có đóng góp chính thuộc tất cả các tổ chức chủ trì và tham gia đề tài, không quá 10 người)		
TT	Họ và tên	Cơ quan công tác	Tỉ lệ phần trăm làm việc cho đề tài
A	PGS. TS. Nguyễn Thị Hà Chủ nhiệm đề tài	Labo trung tâm Y sinh học, Trường Đại học Y Hà Nội	18
	PGS. Tạ Thành Văn Đồng chủ nhiệm đề tài	Bộ môn Hoá - Hoá sinh/ Labo Trung tâm Y sinh học, Trường Đại học Y Hà Nội	12
B	Cán bộ tham gia nghiên cứu		
1	TS. Đặng Kim Oanh	Khoa Nội, Bệnh viện Bạch Mai / Bộ môn Nội, Trường Đại học Y Hà Nội	15
2	TS. Trần Văn Khánh	Labo Trung tâm Y sinh học, Trường Đại học Y Hà Nội	20
3	ThS. Nguyễn Thu Thuý	Labo Trung tâm Y Sinh học, Trường Đại học Y Hà Nội.	20
4	CN. Nguyễn Hữu Thọ	Labo Trung tâm Y Sinh học, Trường Đại học Y Hà Nội	10
5	CN. Nguyễn Phương Thuý	Bộ môn Hoá - Hoá sinh, Trường Đại học Y Hà Nội	10
6	CN. Nguyễn Thuý Hà	Bộ môn Hoá - Hoá Sinh, Trường Đại học Y Hà Nội	10

V. Kinh phí thực hiện đề tài và nguồn kinh phí (giải trình chi tiết xin xem phụ lục kèm theo)

Đơn vị tính: Triệu đồng

23	Kinh phí thực hiện đề tài phân theo các khoản chi						
TT	Nguồn kinh phí	Tổng số	Trong đó				
			Thuê khoán chuyên môn	Nguyên vật liệu, năng lượng	Thiết bị, máy móc	Xây dựng, sửa chữa nhỏ	Chi khác
I	2	3	4	5	6	7	8
	Tổng kinh phí	550	187	253	0	0	110
	Trong đó:						
1	Ngân sách SNKH	550	187	253	0	0	110
2	Các nguồn vốn khác						
	- Tự có	0	0	0	0	0	0
	- Khác (vốn huy động ...)	0	0	0	0	0	0

Hà Nội, ngày 10 tháng 11 năm 2008

Thủ trưởng
Cơ quan chủ trì đề tài
(Họ tên, chữ ký và đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài
(Họ, tên và chữ ký)

Hà Nội, ngày tháng năm 2008
TL. BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ
KT. VỤ TRƯỞNG VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO