BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

CHƯƠNG TRÌNH KHCN CẤP NHÀ NƯỚC KC-10/06-10

BÁO CÁO TỔNG HỢP

KẾT QUẢ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ ĐỀ TÀI

ĐỀ TÀI:

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TRONG CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ BỆNH Ở NGƯỜI

MÃ SỐ KC-10.09/06-10

7713
12/02/2010

Hà Nội-2009

THÔNG TIN CHUNG

Tên đề tài: ***Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán và điều trị bệnh ở người.*** Mã số KC-10.09/06.10

Thời gian thực hiện: 30 tháng (Từ tháng 4/2007 đến tháng 10/2009)

Cấp quản lý: Nhà nước

Thuộc chương trình: ***Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ phục vụ, bảo vệ, chăm sóc và nâng cao sức khỏe cộng đồng***. Mã số KC-10/06-10

Kinh phí: 2.750 (Hai nghìn bảy trăm năm mươi triệu đồng)

Chủ nhiệm đề tài: Lê Quang Huấn, năm sinh: 7/3/1956 Nam/Nữ: Nam

Học hàm: Phó giáo sư Học vị: Tiến sỹ

Chức danh khoa học: NCVC. Chức vụ: Trưởng phòng nghiên cứu

Điện thoại: CQ: 04 38362599; NR: 04 37870525; Mobile: 0904253600

Fax: 04 38363144 E-mail: huanlequang@gmail.com

Tên cơ quan đang công tác: Viện Công nghệ sinh học

Địa chỉ cơ quan: 18 Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội

Địa chỉ nhà riêng: Số 8, ngõ 87, Hoàng Quốc Việt, Quận Cầu Giấy, Hà Nội

Tên cơ quan chủ trì đề tài: Viện Công nghệ sinh học

Địa chỉ: 18 Hoàng Quốc Việt, Q. Cầu Giấy, Hà Nội, Điện thoại: 04 38362599

Fax: 04 38363144, E-mail: tnhai@ibt.ac.vn, Website: http://www.ibt.ac.vn

Họ và tên thủ trưởng cơ quan: Trương Nam Hải

Số tài khoản: 931.01.064 Tại: Kho bạc nhà nước Ba Đình Hà Nội

Tên cơ quan chủ quản đề tài: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Mục tiêu của đề tài: Xây dựng được quy trình sản xuất kháng thể đơn dòng nhằm tạo KIT chẩn đoán các bệnh ung thư ở người (ung thư máu, ung thư phổi, ung thư vú), nghiên cứu quy trình tạo chế phẩm định hướng điều trị bệnh ở người.

Nội dung nghiên cứu của đề tài

1. Nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng

- Tạo dòng tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên CYFRA21-1, trong ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ.
- Tạo dòng tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên CD33 trong ung thư máu dạng bạch cầu tuỷ cấp tính.
- Tạo dòng tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên HER2/neu trong ung thư vú dạng tăng trưởng biểu bì.

2. Nghiên cứu tạo KIT chẩn đoán ung thư

- Gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên CD33 với chất tạo mầu để tạo KIT chẩn đoán ung thư máu dạng bạch cầu tuỷ cấp tính.
- Gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên CYFRRA 21-1 với chất tạo mầu để tạo Kit chẩn đoán ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ.
- Gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên HER2/neu với chất tạo mầu để tạo KIT chẩn đoán ung thư vú dạng tăng trưởng biểu bì.
- Thử nghiệm và đánh giá chất lượng các KIT tạo được của đề tài.

3. Nghiên cứu tạo chế phẩm điều trị ung thư

- Thiết kế vector biểu hiện gen tái tổ hợp mã hoá kháng thể đơn dòng trong *E. coli* hoặc nấm men đặc hiệu kháng nguyên CD33, CYFRA 21-1 và HER2/neu.
- Tinh sạch và xác định hoạt tính kháng thể thu được.

4. Sản phẩm dự kiến của đề tài

- Xây dựng được quy trình thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên;
- Xây dựng được quy trình tạo Kit chẩn đoán;
- Xây dựng được quy trình tạo chế phẩm định hướng điều trị;
- Thu nhận được 3 bộ KIT (100 phản ứng)/1 bô KIT/một kháng nguyên;

- Thu nhận được 1 gram chế phẩm/1 kháng thể
- Công bố: 3 bài báo trên các tạp chí chuyên ngành
- Đào tạo theo nội dung của đề tài: 1 tiến sỹ, 2 cao học, 2 cử nhân

MỞ ĐẦU

Do tác động của điều kiện sống, tỷ lệ mắc bệnh ung thư ngày một tăng. Những năm gần đây, mỗi năm Việt Nam phát hiện khoảng 150.000 bệnh nhân ung thư mới, nhiều nhất là ung thư phổi, ung thư vú và bạch cầu. Với trẻ em, chỉ tính riêng ở Bệnh viện nhi Trung ương, hàng năm tiếp nhận trung bình 200 bệnh nhân ung thư mới. Trẻ trong độ tuổi từ 5-15 tuổi đang được điều trị bệnh ung thư tại bệnh viện đã tăng từ 1.262 trẻ năm 2002 lên 1.708, và nay (2009) là 2.000 trẻ, đa số mắc bệnh bạch cầu và u não cấp tính. Đáng lưu ý, tỷ lệ tử vong ở trẻ mắc bệnh ung thư khá cao, do phần lớn trẻ được đưa đến bệnh viện khám thì bệnh đã nặng. Ước tính, khoảng 90% không được đưa đến bệnh viện trước khi ở trẻ xuất hiện biến chứng như rối loạn thần kinh.

Ung thư - vốn được xem là bệnh khó trị, nhưng gần đây các nhà khoa học đã đưa ra nhiều liệu pháp chống ung thư, chẳng hạn liệu pháp gen, điều trị miễn dịch với việc sử dụng các kháng thể đơn dòng, các vaccine, đã mang lại những thành công đáng khích lệ, tỉ lệ tử vong do mắc bệnh ung thư ngày một giảm. Tuy nhiên ở Việt Nam, theo GS. Bác sỹ Nguyễn Chấn Hùng, giám đốc Bệnh viện ung bướu TP. Hồ Chí Minh thì "Hiện nay, chúng ta chưa dùng liệu pháp nào vì giá thành còn rất cao, chẳng hạn như một liều là 600 USD, mỗi đợt điều trị là 6 liều". Bệnh ung thư nếu được phát hiện sớm thì tỷ lệ điều trị thành công rất cao. Vì vậy, việc nghiên cứu và sản xuất các kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên đích sẽ góp phần kiểm soát bệnh, chẩn đoán và điều trị ung thư ngày một có hiệu quả hơn, góp phần chăm sóc và bảo vệ sức khỏe của cộng đồng ngày một tốt hơn.

Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng chủ yếu được thực hiện theo phương pháp tạo tế bào hybridoma của Kohler và Milstein (1975). Tế bào hybridoma vừa có khả năng sinh tổng hợp kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên đã gây miễn dịch vừa có khả năng tồn tại lâu dài sau nhiều lần phân

chia. Dòng tế bào hybridoma được nhân nuôi để sản xuất kháng thể đặc hiệu trong điều kiện *in vivo* (tạo báng ở chuột) hoặc *in vitro* (nuôi cấy trong môi trường đặc biệt).

Tuy nhiên, quy trình sản tạo tế bào hybridoma là phức tạp, kháng thể sản xuất ra có giá thành cao và hơn thế nữa khi ứng dụng trong điều trị lại gặp những trở ngại về tính hiệu quả do chúng có bản chất từ chuột (cơ thể người bệnh sinh kháng thể kháng lại nó, gọi tắt là hiện tượng HAMA). Phần lớn các kháng thể đơn dòng được thử nghiệm trong điều trị vào giai đoạn 1980-1987 có bản chất hoàn toàn của chuột đều không thành công, ứng dụng thử nghiệm lâm sàng đối với các kháng thể dạng này đã giảm mạnh và hoàn toàn chấm dứt vào năm 2003.

Vì vậy, để khắc phục vấn đề này các nhà khoa học đã sử dụng kỹ thuật gen để tạo kháng thể đơn dòng dạng ghép và các kháng thể có bản chất của người hoàn toàn.

Kháng thể dạng ghép đã làm tăng hiệu quả điều trị và giảm hiện tượng HAMA. Trên thực tế đã có 5 kháng thể đơn dòng dạng ghép đã được bán trên thị trường ở nhiều nước để điều trị miễn dịch và ung thư (*Abciximab, Rituximab, Basiliximab, Infliximab, Cetuximab*), các kháng thể hoàn toàn có bản chất của người mới được nghiên cứu trong những năm gần đây và đang trong giai đoạn thử nghiệm.

Phần I. GIỚI THIỆU CHUNG

1.1. Kháng thể đơn dòng và quy trình sản xuất

Kháng thể là các phân tử immunoglobulin (có bản chất glycoprotein), do các tế bào lympho B cũng như các tương bào (biệt hóa từ lympho B) tổng hợp và tiết ra để giúp hệ miễn dịch nhận biết và vô hiệu hóa các tác nhân lạ, chẳng hạn các vi khuẩn hoặc virus. Các kháng thể có hình chữ Y, có hai bộ "cành" gắn vào một "thân". Các đầu của Y (Fab) được gọi là các vùng biến đổi, ở phía đầu các cành chứa các vùng gắn kết kháng nguyên (vùng quyết định bổ trợ, CDR) và thân (Fc) là một vùng hằng định. Các vùng hằng định chứa "lẫy khởi động" chức năng phản ứng lại kích thích bằng việc gắn kết các phức hệ của tế bào khác của hệ miễn dịch.

Kháng thể thực hiện các chức năng cơ bản như liên kết đặc hiệu với kháng nguyên, hoạt hóa các bổ thể, hoạt hóa các tế bào miễn dịch.

Kháng thể đơn dòng là những kháng thể được tổng hợp từ một dòng tế bào lympho B. Kohler và Milstein (1975) đã đề xuất phương pháp tạo kháng thể đơn dòng (Công trình đạt giải Nobel) bằng cách dung hợp các tế bào myeloma với các tế bào sản xuất kháng thể tách từ chuột đã gây miễn dịch.

Để tăng hiệu quả điều trị của các kháng thể đơn dòng, các nhà khoa học đã kết hợp các gen từ các nguồn tế bào lympho B khác nhau để tạo gen tái tổ hợp mã hoá các **kháng thể đơn dòng** có vùng gắn kết với cùng một vị trí (một epitope) của kháng nguyên, các kháng thể đơn dòng khi đó có thể là:

-Kháng thể đơn dòng chuột (Mouse monoclonal antibody) là một kháng thể có nguồn gốc hoàn toàn từ chuột, được tạo ra theo phương pháp của Kohler và Milstein.

-Kháng thể đơn dòng ghép (Chimeric monoclonal antibody) là kháng thể mang vùng biến đổi có nguồn gốc kháng thể chuột và vùng hằng định có nguồn gốc kháng thể người.

-Kháng thể đơn dòng "nhân" hoá (Humanized monoclonal antibody) là kháng thể có vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) nguồn gốc từ kháng thể chuột, phần còn lại của vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ kháng thể người.

-Kháng thể đơn dòng khỉ (Primatized monoclonal antibody) là kháng thể có vùng biến đổi từ khỉ và vùng hằng định từ kháng thể người.

-Kháng thể đơn dòng gà: Do sự cách xa nhau trong hệ thống phân loại, nên gà được chọn để tạo kháng thể đơn dòng kháng lại các protein kháng nguyên có nguồn gốc từ động vật có vú. Vì đáp ứng miễn dịch đối với các kháng nguyên này ở gà xảy ra mạnh hơn ở động vật có vú: chuột, khỉ, thỏ.

-Kháng thể đơn dòng người (Human monoclonal antibody) là kháng thể đơn dòng hoàn toàn có nguồn gốc từ người. Các gen mã hoá vùng biến đổi có nguồn gốc từ người được chuyển vào chuột (chuột chuyển gen) và thực khuẩn thể (thư viện phage) để sản xuất kháng thể đơn dòng người.

Các đoạn kháng thể tái tổ hợp có kích thước nhỏ, ví dụ các đoạn kháng thể đơn trị (Fab, ScFv) và các dạng tổ hợp khác nhau (diabodies, triabodies, minibodies) đang được xem là những dược phẩm đáng tin cậy. Các tổ hợp kháng thể này vẫn giữ được tính đặc hiệu hướng đích của toàn bộ phân tử kháng thể nhưng được sản xuất với giá thành rẻ hơn và có những đặc tính quý làm nguyên liệu cho tạo Kit chẩn đoán và thuốc điều trị. Các kháng thể khi được gắn với các thuốc, enzyme, độc tố hoặc đồng vị phóng xạ (gọi là độc tố miễn dịch, Immunotoxin) đã làm tăng hiệu quả điều trị.

1.2. Các kháng thể đơn dòng đang được sử dụng trong y học

Các kháng thể đơn dòng được FDA chấp thuận sử dụng trong điều trị có cơ chế tác động đặc trưng khác nhau:

Ức chế hệ miễn dịch: *Muromomab-CD3* nhận biết và gắn kết với phân tử CD3 trên bề mặt các tế bào T, hạn chế sự đào thải trong ghép nội tạng,

Infliximab liên kết với yếu tố hoại tử khối u-alpha (TNF-α). Kháng thể này thể hiện tiềm năng lớn trong điều trị một số bệnh nhiễm khuẩn như bệnh viêm khớp, *Omalizumab* gắn kết với IgE do vậy hạn chế sự gắn kết của IgE đối với các tế bào lớn (mast cell) sử dụng trong điều trị bệnh hen dị ứng, *Daclizumab* gắn kết với một phần của thụ thể IL2 (CD25) trên bề mặt tế bào T để ngăn ngừa việc đào thải trong ghép thận và kháng lại ung thư tế bào T.

Ức chế hoặc giết các tế bào di căn: *Rituxan®* nhận biết và gắn kết với phân tử CD22 trên hầu hết các tế bào lympho B và thường được sử dụng trong điều trị ung thư tế bào B, *Zevalin®* nhận biết và gắn kết kháng nguyên **CD20** trên các tế bào B (và u bạch huyết), *Bexxar*® (tositumomab) là phức chất của kháng thể đơn dòng kháng **CD20** và đồng vị phóng xạ ^{131}I (isotope iodine-131), được sử dụng cho các bệnh nhân u bạch huyết, *Herceptin®* (trastuzumab) gắn với **HER2**, một thụ thể của yếu tố phát triển biểu mô trên bề mặt tế bào một số loại ung thư (ung thư vú, ung thư bạch huyết), *Erbitux®* (cetuximab) gắn kết với HER1, là một thụ thể của yếu tố phát triển biểu mô (EGF) được xác định trên tế bào một số loại ung thư (ung thư vú, ung thư bạch huyết), *Mylotarg®* là một cộng hợp của calicheamicin với kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên **CD33** (một kháng nguyên biểu lộ trên các tế bào ung thư bạch cầu tuỷ cấp tính, AML), *Alemtuzumab* (MabCampath®) gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD52 được sử dụng trong điều trị ung thư bạch cầu mãn tính.

Ức chế sự hình thành mạch máu của khối u: *Vitaxin* gắn kết đặc hiệu với integrin thành mạch (alpha-v/beta-3) được tìm thấy trong thành mạch của các khối u, không có trong các mạch máu của các mô bình thường, *Bevacizumab (Avastin®)* gắn với các yếu tố phát triển biểu mô thành mạch (VEGF), hạn chế khả năng gắn kết với các thụ thể của nó, *Abciximab (ReoPro®)* có tác dụng ức chế sự kết nhóm các tiểu cầu bằng cách gắn với

các thụ thể trên bề mặt của chúng giúp cho việc tắc nghẽn ở động mạch vành đối với bệnh nhân được phẫu thuật tạo mạch.

1.3. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng

Chọn lọc tế bào có khả năng sản xuất kháng thể từ động vật gây miễn dịch: Nhu cầu kháng thể sử dụng trong nghiên cứu khoa học, trong chẩn đoán và điều trị bệnh ngày càng lớn, đặc biệt là các kháng thể đặc hiệu có nguồn gốc của người. Nhưng nguồn kháng thể người thường rất khó có được. Vì vậy, phương pháp chung để nhận được các kháng thể là từ động vật gây miễn dịch và sau đó nhân hoá để hạn chế tối đa hiện tượng HAMA.

Phương pháp nuôi cấy tế bào: Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng *in vitro* đơn giản nhất là nuôi cấy tế bào hybridoma trong môi trường và thu nhận kháng thể đơn dòng từ dịch nuôi cấy tế bào. Huyết thanh bê chứa khoảng 50 μg/ml IgG bò thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, để tránh nhiễm IgG bò, một số công ty đã tạo ra những môi trường đặc hiệu cho sự phát triển tế bào hybridoma không chứa huyết thanh. Trong hầu hết các trường hợp, các tế bào hybridoma được nuôi cấy trong môi trường chứa 10% huyết thanh bào thai bê (fetal calf serum, FCS) trong thời gian 8-12 ngày sau đó chuyển vào môi trường chứa ít (1% FCS) hoặc không có FCS. Kháng thể trong dịch nuôi cấy có thể tinh sạch qua cột ái lực protein G hoặc protein A, lượng thu được theo quy trình này vào khoảng 20 μg/ml. Phương pháp sản xuất này có thể tạo lượng lớn kháng thể ở quy mô Pilot. Tuy nhiên, một số dòng tế bào hybridoma phát triển không tốt trên môi trường nuôi cấy, hơn nữa trong môi trường có chứa FCS, nên hạn chế ứng dụng trong điều trị.

Phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách tạo báng ở chuột: Phương pháp tạo báng ở chuột cho lượng kháng thể lớn hơn so với hương pháp nuôi cấy tế bào. Hơn nữa, việc sản xuất kháng thể theo phương pháp này còn tránh được khả năng lây nhiễm so với phương pháp nuôi cấy tế bào.

Không cần phải có các trang thiết bị, kỹ thuật nuôi cấy tế bào sau khi đã chọn được tế bào hybridoma sản xuất kháng thể mong muốn. Tuy nhiên, kháng thể sản xuất theo phương pháp này có thể chứa nhiều protein của chuột và có thể nhiễm trong quá trình tinh chế.

Sản xuất kháng thể đơn dòng trong hệ tế bào nhân thật, *Eukaryote*: Ngoài các phương pháp sản xuất kháng thể trên đây, phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng trong trứng gà, trong tế bào nấm men đang được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm do những ưu điểm như đơn giản, lượng kháng thể được sản xuất lớn hơn so với các phương pháp khác.

1.4. Nghiên cứu ung thư

Theo ước tính của tổ chức Y tế thế giới hàng năm có khoảng 10 triệu người mắc bệnh ung thư, 5 triệu người chết do ung thư. Dự báo vào năm 2015 mỗi năm thế giới sẽ có 15 triệu người mắc bệnh ung thư và 9 triệu người chết do ung thư, trong đó 2/3 là ở các nước đang phát triển.

Ở vùng châu Á-Thái Bình Dương, tỷ lệ chết do ung thư là 100/100 000 dân ở các nước Úc, Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Singapore. Bệnh ung thư không những gây ảnh hưởng trực tiếp đến người bệnh, mà còn là gánh nặng đối với cộng đồng. Bệnh gây tâm lý lo ngại cho gia đình và thiệt hại kinh tế cho mỗi quốc gia.

Nghiên cứu tìm hiểu cơ chế ung thư để từ đó tìm ra phương pháp điều trị là một lĩnh vực nóng bỏng và đầy trở ngại đối với các nhà Y-Sinh học hiện nay. Chúng ta có thể khái quát hai hướng tiếp cận chính trong lĩnh vực nghiên cứu này:

1) Một là các nghiên cứu về di truyền phân tử tế bào trong đó nghiên cứu phát hiện các gen gây ung thư hay các thương tổn của hệ di truyền tế bào gây nên bởi di truyền hay do các tác nhân bên ngoài. Để giải quyết căn nguyên, các nhà khoa học thuộc hướng nghiên cứu này tìm cách can thiệp vào từng

giai đoạn hoạt động của gen bao gồm: tái bản, sao chép và dịch mã để làm bất hoạt toàn bộ quá trình này. Cho tới nay liệu pháp điều trị gen là cách tiếp cận điều trị theo hướng này. Các kỹ thuật có thể kể đến như: Tạo các oligo đối mã (antisense), ghép gen (transgene), RNAi, cắt gen bằng công nghệ ribozyme hay sử dụng các hoá chất đặc hiệu ức chế hoặc bất hoạt các enzyme xúc tác trong từng giai đoạn của quá trình trên.

2) Hướng nghiên cứu thứ hai về cơ chế ung thư là nghiên cứu về protein, và các protein màng tế bào là mục tiêu chính của các nghiên cứu này. Các protein màng đóng vai trò quan trọng trong việc dẫn truyền tín hiệu tế bào-tế bào hay khoảng gian bào-tế bào. Các kênh tín hiệu này có chức năng quan trọng trong quá trình trưởng thành, phát triển và biệt hóa của tế bào. Một khi chúng ta điều khiển được các kênh này thì cũng đồng nghĩa là chúng ta có thể can thiệp được vào quá trình ung thư và di căn. Cho đến nay rất nhiều protein thuộc loại này tương ứng với nhiều kênh truyền tín hiệu khác nhau đã được phát hiện và tùy theo mà chúng có hoặc không có tính đặc hiệu tế bào. Theo hướng này, các nhà y sinh học đã và đang nghiên cứu phương thức khóa các con đường tín hiệu này để điều trị ung thư. Các kỹ thuật có thể kể đến như: tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu (có thể nội sinh hay ngoại sinh), sử dụng các chất ức chế cạnh tranh.

1.5. Các kháng nguyên ung thư theo nội dung nghiên cứu

Một trong các nội dung nghiên cứu chính của đề tài là xây dựng quy trình tạo kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên ung thư sau:

Đối với ung thư vú: Kháng nguyên đích được đề tài lựa chọn nghiên cứu là HER2. Sự biểu hiện quá mức của HER2 chiếm 20-30% ung thư vú. Hơn nữa, dạng ung thư này thường có tiên lượng xấu, nên chẩn đoán sớm dạng ung thư này sẽ giúp điều trị có hiệu quả.

Đối với dạng ung thư phổi: Kháng nguyên đích được đề tài lựa chọn để nghiên cứu là CYFRA 21-1. Đây là một trong các kháng nguyên đặc trưng trên bề mặt các tế bào ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ (chiếm 40% các bệnh ung thư phổi).

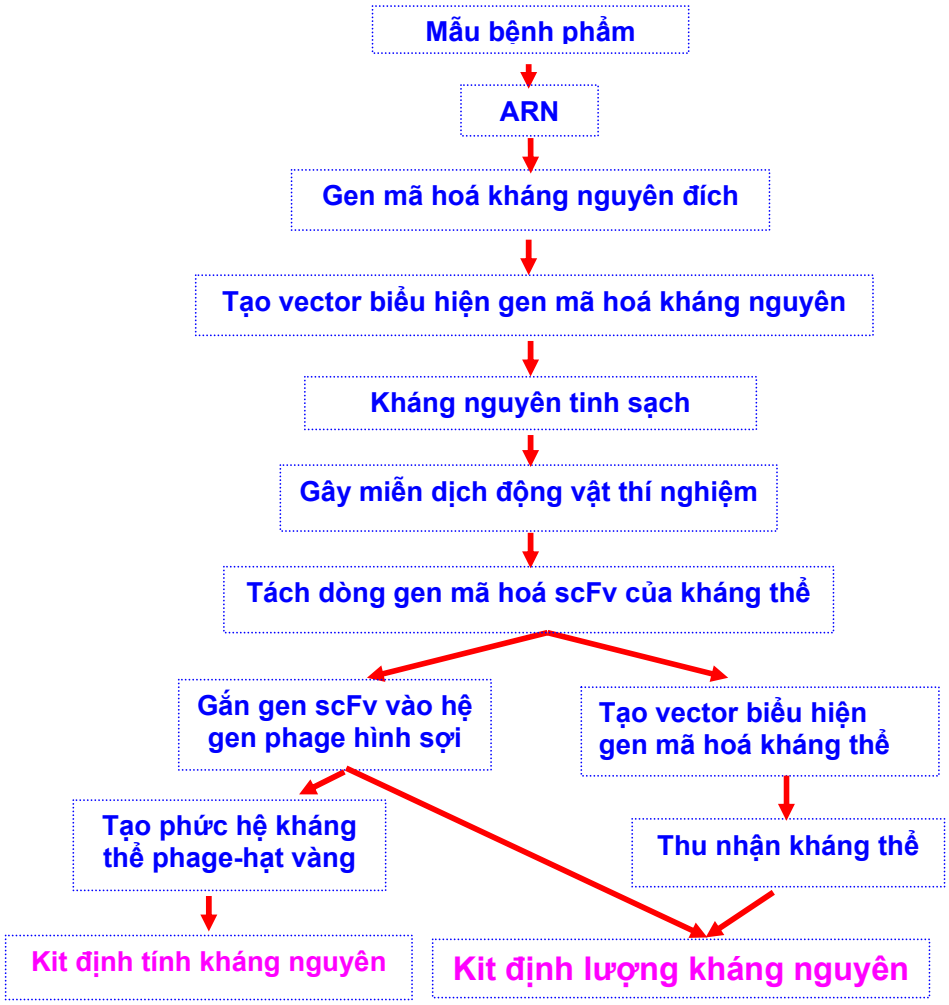
Đối với ung thư máu: Kháng nguyên đích được đề tài lựa chọn để nghiên cứu là CD33. Đây là kháng nguyên đặc hiệu AML-M3, một dạng rất khó chẩn đoán và phân biệt với các dạng leukemia khác. Hơn nữa, nếu dạng ung thư này được chẩn đoán sớm, thì hiệu quả điều trị là rất cao.

1.6. Sơ đồ nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên

1.6.1. Sơ đồ nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu để tạo KIT chẩn đoán

Do các kháng nguyên trong nội dung nghiên cứu của đề tài đều là kháng nguyên của các tế bào ung thư ở người, nên để tăng khả năng đáp ứng miễn dịch của động vật gây miễn dịch, nói đúng hơn là để thu nhận các kháng thể có khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, chúng tôi đã sử dụng động vật để gây miễn dịch thu nhận các gen mã hóa scFv của kháng thể là gà.

Vì những lý do sau: trong cây phân loại gà có mức tiến hóa thấp hơn nhiều với các động vật có vú nên sẽ có đáp ứng mạnh đối với kháng nguyên có nguồn gốc từ động vật có vú. Hơn nữa, kháng thể IgY ở gà có nét cấu trúc rất giống với kháng thể IgG ở người. Sơ đồ thu nhận các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên để tạo Kit định tính và định lượng kháng nguyên như sau:

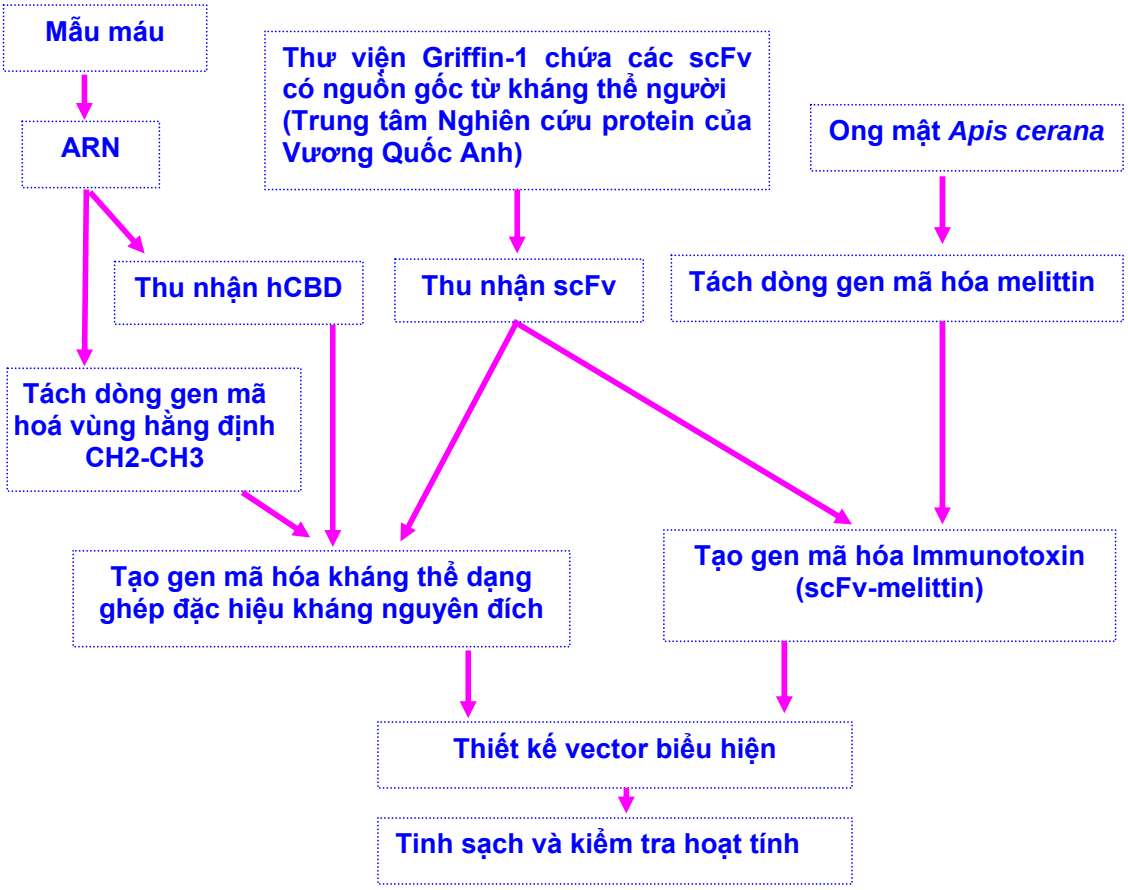


Sơ đồ tổng quát thu nhận kháng thể để tạo KIT xác định kháng nguyên

1.6.2. Sơ đồ tạo kháng thể làm nguyên liệu tạo chế phẩm điều trị

Kháng thể có thể sử dụng trực tiếp trong điều trị hoặc có thể được gắn với các độc tố tạo Immunotoxin hoặc kháng thể được gắn với các enzyme hoặc các đồng vị phóng xạ (ví dụ I^{131}). Tuy nhiện, hiệu quả điều trị của các chế phẩm thuốc phụ thuộc rất nhiều vào bản chất của kháng thể hoặc scFv của kháng thể. Hơn nữa, hiệu quả điều trị của kháng thể cũng phụ thuộc rất nhiều vào khả năng bền vững của các phân tử kháng thể. Vì vậy, trong nội dung nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng tối đa các nguồn gen tạo các phần của

kháng thể dạng ghép có bản chất của kháng thể người: scFv thu nhận từ thư viện Griffin.1 (của Trung tâm công nghệ Protein, Vương quốc Anh), và các gen mã hóa vùng hằng định CH2-CH3 và gen mã hóa vùng đôi gắn kết với chitin (hCBD) phục vụ cho việc tinh sạch kháng thể sau khi biểu hiện, gen mã hóa melittin để tạo immunotoxin được thu nhận từ ong mật *Apis cerana*. Sơ đồ thu nhận kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên ung thư định hướng làm thuốc điều trị được thực hiện theo sơ đồ sau:



Sơ đồ thu nhận kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên ung thư định hướng làm thuốc điều trị

Phần II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Mẫu bệnh phẩm

- Mẫu máu của các bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu do khoa A6 - Huyết học lâm sàng, bệnh viện Trung ương Quân đội 108 cung cấp;
- Mẫu máu của các bệnh nhân ung thư vú do bệnh viện K cung cấp;
- Mẫu máu của các bệnh nhân ung thư phổi do bệnh Viên A cung cấp. Tất cả các mẫu máu đều được chống đông bằng EDTA.
- Mẫu huyết thanh các bệnh nhân Hodgkin, Non-Hodgkin, U lympho, ung thư phổi,... do khoa Sinh hóa, Bệnh viện Bạch mai cung cấp.

2.1.2. Sinh phẩm và hóa chất

2.1.2.1. Sinh phẩm và mồi sử dụng trong nghiên cứu

Các mồi (primers) sử dụng trong nghiên cứu tách dòng gen mã hóa kháng nguyên, tách dòng vùng biến đổi chuỗi nặng, chuỗi nhẹ của kháng thể từ động vật gây miễn dịch, thiết kế vector biểu hiện các gen đã tách dòng, thiết kế gen mã hóa kháng thể đơn dòng dạng ghép theo nội dung nghiên cứu của đề tài bao gồm:

Ex33F: 5'-tggcgcctcATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCC-3'

Ex33R: 5'-AGCCGGCCTGGGTCCTGACCTCTGAGTATTCG-3'

HER2F: 5'- *CAT ATG* GTG TGC ACC GGC ACA GAC **ATG** AAG - 3'

HER2R: 5'- *CTC GAG* AAC CAC CGT AGA GAT GAT G - 3'

ExHer4F: 5'-ggcgcctcTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAG-3'

ExHer4R: 5'-AGCCGGCGGCTCTCTGCTCGGCGGGGC-3'

ExHer34F:5'-GGCGCCTCTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGC-3'

ExHer4R: 5'-AGCCGGCGGCTCTCTGCTCGGCGGGGC-3'

LinF: 5'-GATCTGGAGGTGGTGGATCAGGTGGAGGAGGATCAC-3'

LinR: 5'-CGAGTGATCCTCCTCCACCTGATCCACCACCTCCA-3'

ExantiH33F1: 5'-ggcgcctcGATATCCAGATGACCCAATCACC-3'

ExantiH33F2: 5'-ActcgagGACATGGGTTGCCCATACGGACC-3'

ExantiH33R1: 5'-CAGATCTCTCTGGACCGCATCCTGAGGCTGGC-3'

ExantiH33R2: 5'-TCCCGGGAACAGTGACTAATGTACCTTGTCC-3'

ExantiHerF1: 5'-ggcgcctcGAAGTACAATTAGTCGAATCAGG-3'

ExantiHerR1: 5'-CAGATCTTACGGTAACCAAAGTACCTTGACC-3'

ExantiHerF2: 5'-ActcgagGAATTCGATATGGACTGCC-3'

ExantiHerR2: 5'-ACCCGGGCTTAATCTCAACTTTTGTTCC-3'

PDIF:5'-TGAATTCATGAAGTTTTCTGCTGGTGCCGTC-3'

PDIR: 5'-AGCGGCCGCCAATTCATCGTGAATGGCATCTTCTTCG-3'

BIPF: 5'-AGAATTCATGGAAAAGCTATTACAGTGGTC-3'

BIPR: 5'-AGCGGCCGCTAATACATACTTTACGGCTAAATAATC 3'

EXCYF: 5'-CATATGGCTTCCTACAGCTATCGCGTC-3'

EXCYR: 5'-CTCGAGCAAGAGGACCTTGGAGGCAGAC-3'

ExpcyF: 5'– catatgggcaggtcc-3'

ExpcyR: 5'–ctcgaggtccatgagccgctggtac–3'.

SeqpMM1520_F: 5'-ATGATGAGATAAAGTTAGTTTATTGG-3'

SeqpMM1520_R: 5'- GTTTGCGCATTCACAGTTCTCC-3'

Các mồi để tách dòng gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể người:

CHybVH:5'-gctgcccaacaagccatggccgccgtgacgttggacgagtcc-3'

CHybIg-B:5'-cgatgggcccttggtggaggcggaggagacgatgacttcggtccc-3'

CHybL-B:5'-agatggtgcagccacagttcgtaggacggtcagggttgtcccggc-3'

HKC-F:5'-cgaactgtggctgcaccatctgtc-3'

HIgCHI-F:5'-gcctccaccaagggcccatcggtc-3'

lead-B:5'-ggccatggctggttgggcagc-3'

Lead-VH:5'-gctgcccaaccagccatggcc-3'

dp_seq:5'-agaagcgtagtccggaacgtc-3'

dp-EX:5'-gaggaggaggaggaggagagaagcgtagtccggaacgtc-3'

Các mồi để tạo thư viện phage biểu lộ các kháng thể đơn chuỗi scFv trên bề mặt phage đặc hiệu kháng nguyên đích đã sử dụng để gây miễn dịch ở gà:

CSVCHoF: 5'-ggtcagtcctctagatcttccgccgtgacgttggacgag-3'

CSCG-B: 5'-ctggccggcctggccactagtggaggagacgatgacttcggtcc-3'

CSC-B(notI): 5'-gaggaggaggaggaggaggagctgcggccgcactagtggagg-3'

CSCVHo-FL: 5'-ggtcagtcctctagatcttccggcggtggtggcagctccggtggtg-gcggttccgccgtgacgttggacgag-3'

CSCVK: 5'-gtggcccaggcggccctgactcagccgtcctcggtgtc-3'

CKJo-B: 5'-ggaagatctagaggactgacctaggacggtcagg-3'

CSC-F: 5'-gaggaggaggaggaggaggtggcccaggcggccctgactcag-3'

CSC-B: 5'-gaggaggaggaggaggaggagctggccggcctggccactagtggagg-3'

pET_T7F: 5'-taatacgactcactataggg-3'

pET_T7R: 5'-tagttattgctcagcggtgg-3'

Các mồi để xác định trình tự nucleotide của các gen đã tách dòng khi sử dụng vector PCR 2.1-TOPO (Invitrogen): M13F: 5'-gtaaaacgacggccag-3' và M13R: 5'-caggaaacagctatgac-3'

Các mồi để kiểm tra kết quả thiết kế gen biểu hiện kháng nguyên, kháng thể trong vector pET-21b(+) (Novagen): T7F: 5'-taatacgactcactataggg-3' và T7R: 5'-tagttattgctcagcggtgg-3'

Các mồi để xác định trình tự nucleotide của các gen mã hóa kháng thể, các gen mã hóa các vùng biến đổi của kháng thể scFv trong hệ gen của phage thuộc thư viện phage, thư viện Griffin.1 (Human Synthetic VH + VL scFv Library): LabF: 5'-caggaacagctatgac-3' và LabR: 5'-gaattttctgtatgagg-3', pHENF: 5'-catggccagatcttacggtaactacgatttcgattacacc-3' pHENR: 5'-tcgaggt-gtaatcgaaatcgtagttaccgtaagatctggc-3'

Các mồi để định lượng kháng nguyên bằng real-time PCR thông qua kháng thể biểu lộ trên bề mặt phage:

RtKT_33F: 5'- CACCATCTTCATTGTCTGCC -3'

RtKT-33R: 5'- TCTTGATGGGACACCTGAAC-3'

RtKT-Her2F: 5'- ACCATTTCATCATTGCAGCC-3'

RtKT-Her2R: 5'- ACCAAACCACCTCCTGATTC-3'

RtKT-CyfraF: 5'- CCCAGTCTCCATCCTTACTC-3'

RtKT-CyfraR: 5'- GCAAAGTGGATGCAGCATAG-3'

Epr-CyfraF: 5'- GCCGGCCTAATACCTATTGCC-3'

Cặp mồi để tách dòng gen mã hóa melittin

PrMF: 5'-ggaaggaaggaaggaagcgatcg-3'

PrMR: 5'-ccgactaaccctgttgcctcttacg-3'

Thư viện scFv của kháng thể có nguồn gốc từ người, dòng tế bào *E. coli* TG1, HB2151 do Trung tâm Công nghệ Protein của Vương Quốc Anh (MRC - Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) cung cấp. Helper phage M13K07 (Invitrogen, CA, USA).

Các bộ kit tách RNA "S.N.A.P"; kit RT-PCR "one-step RT-PCR"; Bộ kit tách dòng "TA-Topo Cloning Kit, Kit tách plasmid từ vi khuẩn của hãng QIAgen, kit real time-PCR của Roche, kit tinh sạch thu đoạn DNA từ gel agarose của hãng Bioscience, kit Big Dye Terminator sequencing.

Các enzyme: Taq DNA polymease, *Nhe*I, *Nde*I *EcoR*I, *Xho*I, *Not*I, *Sfi*I, *Bgl*II, *NgoM*IV, *Bam*HI, *Nco*I, *Sma*I, *Xma*I, *Sal*I, *Sac*I, *Hind*III, T4-DNA ligase,... do hãng BioLabs cung cấp.

Các chủng *E. coli* TOP10, BL-21 (DE3) Star, *E. coli* TG1, *E. coli* HB2151 (MRC - Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK), chúng vi khuẩn gram dương *Bacillus megaterium* (BioTech, Mỹ).

Các vector tách dòng pTZ57R/T của hãng (Fermentas), dòng pCR™ 2.1-TOPO (Invitrogen), vector biểu hiện pSTREP-HIS1525 (BioTech), pPIC3.5K, pAO815 và pPIC9K (Invitrogen),

Các kháng thể: anti-CD33 antibody, anti-HER2 antibody và anti-Cyfra 21-1 có nguồn gốc từ chuột do hãng ***Genscrip*** cung cấp. Kháng thể cộng hợp kháng M13 (anti-M13 horseradish peroxidase-conjugate) của hãng Amersham Biosciences.

2.1.2.2. Hoá chất

Bộ hóa chất chạy PCR, real time PCR như Maxima SYBR Green Master Mix, probe (Roche), RTS500 *E. coli* Disulfide (Roche), Kit tách DNA plasmid (Invitrogen), Kit tinh sạch sản phẩm PCR (Invitrogen); Kit giải trình tự gen (Invitrogen); Kit tinh sạch DyeEX (Invitrogen), Multi-copy Pichia Expression KIT (Invitrogen); Expressway™ Maxi Cell-Free *E. coli* Expression System (Invitrogen), Kit tinh sạch protein. Hóa chất dùng để nuôi cấy và chọn lọc vi sinh vật: Cao nấm men (Yeast extract), Tryptone (Difco, Mỹ), Glucose, NaCl, NaOH, Agar Bacto, các chất kháng sinh Kanamycine, Ampicilin, chất cảm ứng IPTG, chất chỉ thị X-gal.

Hóa chất dùng trong thao tác với DNA và RNA: Agarose, Acetic acid, Tris-base, EDTA, EtBr, Phenol, methanol, sucrose, Ure, Sepharose (10-1000 kDa), Ethanol, Trizol, Chloroform, Isoamylalcohol, Isopropanol.

Hóa chất thao tác với phage: PEG 6.000, Triethylamin. Hóa chất ELISA: H_3PO_4, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaCl, NaOH, TMB, Tween-20, Sodium acetate, Sodium chloride, Dimethylformamide, Dithiothreitol (DTT); Acrylamide, Bisacrylamide, SDS, Glycerol, Tris-base, Methanol, Acetic acid, Bromophenolblue, Comassie brilliant blue.

2.1.3. Trang thiết bị

Lò vi sóng (Samsung); Máy PCR; Máy lắc ổn nhiệt 37°C; Máy khuấy từ (RotoLab, OSI); Máy ly tâm (Microcentrifuge-Sorvall, Mỹ); Tủ lạnh sâu (-20°C,-85°C) (Sanyo, Nhật Bản); Máy khuấy trộn Vortex (RotoLab, OSI); Máy

quang phổ (Shimadzu, Nhật Bản); Máy soi chụp ảnh gel (Bio-Rad); Cân phân tích 10^{-4} g (Mettler Toledo); Bộ nguồn điện di (Bio-Rad); Tủ cấy vô trùng (Sanyo); Pipettman các loại (Gilson); Nồi khử trùng (Nhật Bản); Cân điện 10^{-2} g (Mettler Toledo); Máy ly tâm lạnh (Sorvall Biofuge Fresco); Bộ điện di DNA Advance Tech, Nhật Bản); Máy xác định trình tự DNA tự động (ABI 3100, Applied Biosystems, Mỹ), Nanodrope và các thiết bị khác. Các thiết bị được sử dụng chủ yếu thuộc phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

2.1.4. Phần mềm máy tính

- *GeneDOC v3.2.700* National Resource for Biomedical Supercomputing - Pittsburgh, PA – USA.
- *BioEdit v7.0.9* Ibis Biosciences A subsidiary of Isis Pharmaceuticals - Rutherford Road Carlsbad, CA – USA.
- *Vector NTIv10.3.0* Invitrogen Corporation (http://www.invitrogen.com)
- Chương trình phân tích tự động trên trang web http://www.protocol-online.org, so sánh trình tự gen, protein: http://www.ebi.ac.uk.
- Genetyx_version6 (Nhật bản)

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Các phương pháp thao tác với DNA

Các phương pháp thao tác với DNA chủ yếu thực hiện theo Sambrook và cộng sự (1989), một số phương pháp tiến hành theo các kit và hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.1.1. Tách chiết RNA từ máu

Quá trình tách chiết RNA được thực hiện (theo Kit S.N.A.P của hãng Invitrogen) trong điều kiện các dụng cụ đều được xử lý bằng DEPC 0,1% qua

đêm để loại bỏ RNase. Sau đó khử trùng hơi trong điều kiện nhiệt độ và áp suất cao (140°C; 0,8 atm; thời gian 45 phút).

Bệnh phẩm ung thư máu sau khi nhận từ bệnh viện Quân y 108 về chúng tôi tiến hành tách ngay RNA tổng số theo quy trình sau:

Bước thứ nhất: tách nucleic acid tổng số

- Lấy 200 µl máu vào ống eppendoft sạch RNase.
- Bổ sung proteinase K. Vortex 30 giây, ủ 20 phút ở 37°C.
- Ly tâm 12.000 v/p, thu dịch.
- Bổ sung 400 µl isopropanol, đảo đều. Chuyển dịch sang cột S.N.A.P.
- Ly tâm 1 phút, 12.000 v/p, bỏ dịch ly tâm.
- Rửa 2 lần bằng dung dịch rửa 1X.
- Sau 2 lần rửa ly tâm cột, thời gian 2 ph để loại hết dịch.
- Dùng 135 µl nước không chứa RNase để thu nucleic acid tổng số.

Bước thứ hai: loại DNA

- Thêm 15 µl đệm 10X và 1 µl (2 đơn vị) DNase (không chứa RNase).
- Ủ 37°C trong 10 phút.
- Thêm 450 µl đệm gắn kết, đảo ngược ống 5-6 lần.
- Thêm 300 µl Isopropanol và đảo ống 6-10 lần.
- Chuyển dịch vào một cột S.N.A.P mới.
- Ly tâm tốc độ tối đa trong 1 phút. Loại dịch ly tâm.
- Rửa 2 lần bằng dung dịch rửa 1X.
- Sau 2 lần rửa ly tâm cột, thời gian 2 phút để loại hết dịch.
- Dùng 125 µl nước không chứa RNase để thu RNA tổng số.

2.2.1.2. Phương pháp tách dòng gen *melittin* từ ong mật *Apis cerana*

- Nghiền khoảng 200 mg đến 1gam mẫu ong trong nitơ lỏng. Hoà mẫu đã nghiền trong 1,2 ml đệm chiết cho 100 mg mẫu. (Đệm chiết có thành

phần: 100 mM NaCl + 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 25 mM EDTA, pH 8,0 + 0.5% (w/v) SDS + 0.1 mg/ml proteinnase K), ủ mẫu nghiền ở 50°C, thời gian 2-5 giờ, lắc nhẹ.

- Thêm một thể tích tương đương dung dich chiết: phenol/chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1). Ly tâm 5000 vòng/phút.
- Chuyển lớp trên vào ống Eppendorf mới, bổ sung 1/2 thể tích dung dịch 7,5 M ammonium acetate và 2 thể tích cồn 100% để -20°C từ 1 giờ tới qua đêm.
- Ly tâm 10 000 vòng trên phút trong 10 phút, ở 4°C.
- Rửa cặn thu được trong 1ml cồn 70%, ly tâm thu mẫu, làm khô trong bốc cấy 5-10 phút. Hoà DNA trong đệm TE nồng độ khoảng 1mg/ml.
- Loại ARN bằng cách bổ sung 0,1% SDS và 1µg/ml DNase-free RNaza, ủ 1 giờ ở 37°C.
- Sử dụng 10ng/µl (2µl) DNA làm khuôn và cặp mồi: PrMF/PrMR để nhân bản gen mã hoá cho promelittin bằng phản ứng PCR.
- Thành phần của phản ứng PCR như sau: Nước khử ion (13,6µl) + Taq buffer (2,513,6 µl) + 25 mM $MgCl_2$(2 µl) + 100 mM dNTP (2,5 µl) + Mồi F (1µl) + Mồi R (1µl) + 10 ng/µl DNA khuôn (2µl) + Taq polymerase (2 units).
- Phản ứng PCR được tiến hành trong máy chu kỳ nhiệt GeneCyclerTM (Bior-rad) theo chương trình sau: 94°C 3 phút, 30 chu kỳ: (94°C 1 phút, 52°C 50 giây, 72°C 1 phút 30 giây), 72°C 5 phút
- Lấy 5 µl sản phẩm PCR để kiểm tra bằng điện di gel agaroza 1 %.
- Sau khi xác định trình tự nucleotide, gen mã hóa melittin được sử dụng để gắn với gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 và scFv đặc hiệu CD33 để tạo immunotoxin-Her2 và Immunotoxin-CD33.

2.2.1.3. RT-PCR nhân bản gen mã hóa kháng nguyên, kháng thể

Phản ứng RT-PCR dựa trên nguyên tắc của chuỗi phản ứng trùng hợp PCR, trong đó có sử dụng enzyme phiên mã ngược có khả năng sử dụng RNA làm khuôn tổng hợp DNA.

Phản ứng RT-PCR gồm hai giai đoạn chính là giai đoạn tổng hợp cDNA từ mRNA nhờ tác dụng của enzyme phiên mã ngược và giai đoạn tổng hợp DNA dưới tác dụng của *DNA-polymerase*.

Quá trình nhân đoạn gen mã hóa các kháng nguyên từ bệnh phẩm, gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể người hoặc gen mã hóa các kháng thể gà từ tủy xương gà đã gây miễn dịch với các kháng nguyên đặc hiệu như CD33, HER2, Cyfra 21-1 sau khi đã tách RNA tổng số đều được tiến hành theo quy trình sử dụng kit "one-step RT-PCR" của hãng Invitrogen với cặp mồi đặc hiệu cho từng gen cần tách dòng. Thành phần phản ứng nhân bản các gen từ RNA tổng số như sau:

Thành phần	***Nồng độ***	***Thể tích (µl)***
Hỗn hợp phản ứng (đệm phản ứng)	2X	25
RNA đặc hiệu đối với mỗi gen cần nhân bản	200 pg	15
Mồi xuôi đặc hiêu gen cần nhân bản	10 pM	1,5
Mồi ngược đặc hiêu gen cần nhân bản	10 pM	1,5
RT/Platinum *Taq*	2 Unit	1
H_2O đủ		50

Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt cơ bản như sau (riêng nhiệt đô ở bước 4 phù hợp với nhiệt độ bắt cặp của từ cặp mồi đặc hiệu đối với mỗi gen cần nhân bản). Sau khi trộn đều các thành phần phản ứng, phản ứng RT-PCR được tiến hành trên máy PCR với chu trình nhiệt như sau:

Bước 1:	50°C	thời gian	30 phút
Bước 2:	94°C	thời gian	2 phút
Bước 3:	94°C	thời gian	15 giây
Bước 4:	57°C	thời gian	30 giây
Bước 5:	72°C	thời gian	1 phút 30 giây
Bước 6:	Lặp lại 30 chu kì từ bước 3 đến bước 5		
Bước 7:	72°C	thời gian	8 phút
Bước 8:	bảo quản ở 4°C		

Sản phẩm RT-PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.2.1.3. Phương pháp gắn sản phẩm PCR vào vector pCR™ 2.1-TOPO

Các sản phẩm của phản ứng PCR sau khi đã kiểm tra trên gel agarose 1%, được gắn trực tiếp vào vector tách dòng pCR™ 2.1-TOPO (gọi tắt là pCR 2.1). Điều này có thể thực hiện được khá dễ dàng là do khả năng tổng hợp thêm một Adenine ở đầu 3' của sản phẩm dưới tác dụng của enzyme *Taq DNA polymerase* mà không phụ thuộc vào trình tự DNA khuôn. Trong khi đó vector tách dòng pCR 2.1 được thiết kế có chứa một nucleotide T ở đầu 3'. Do vậy, khi có mặt enzyme *topoisomerase*, sản phẩm của phản ứng RT-PCR có thể được gắn chính xác vào vector tách dòng. Thành phần phản ứng gắn sản phẩm RT-PCR vào vector pCR 2.1 cụ thể như sau:

Thành phần	Thể tích
Sản phẩm PCR	0,5 ÷ 4 µl
Dung dịch muối	1 µl
Vector pCR 2.1	1 µl
Nước tinh khiết	Bổ sung đủ 6 µl

Hỗn hợp phản ứng gắn được ủ ở nhiệt độ 22°C, thời gian 30 phút sau đó được giữ tại 4°C trong thời gian chuẩn bị để biến nạp vào tế bào khả biến.

2.2.1.4. Phương pháp biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*

Nguyên tắc

Dựa vào tác dụng của $CaCl_2$, thành tế bào đang ở thời kỳ sinh trưởng trở nên xốp, tạo điều kiện cho DNA có thể chui qua lỗ màng vào tế bào chất khi sốc nhiệt. Sau 30 phút, tế bào sẽ biểu hiện gen kháng kháng sinh có trong đoạn DNA ngoại lai.

Cách tiến hành

- Các ống tế bào khả biến bảo quản -80°C để trên đá ít nhất là 30 phút.
- Trộn vector tái tổ hợp (khoảng 10-50 ng) với tế bào trong ống tế bào khả biến, sau đó để trên đá 30 phút.
- Sốc nhiệt ở 42°C, 60 giây.
- Đặt trên đá 2 phút.
- Thêm 200 µl LB lỏng ở nhiệt độ phòng, nuôi lắc ở 37°C, 1 h.
- Cấy trải 100 µl mẫu trên môi trường LB đặc chứa kháng sinh.
- Ủ đĩa ở 37°C, qua đêm.

2.2.1.5. Phương pháp tách DNA plasmid từ vi khuẩn *E. coli*

Nguyên tắc

Các tế bào vi khuẩn *E. coli* mang plasmid sau khi nuôi cấy đến pha dừng thì được ly tâm thu lại. Thành và màng tế bào được phá vỡ bằng kiềm và chất tạo sức căng bề mặt. Sau đó DNA hệ gen và protein được tủa và loại bỏ khỏi dịch DNA plasmid nhờ ly tâm. DNA plasmid được tủa lại bằng cồn.

Cách tiến hành

Nhặt các khuẩn lạc trắng cấy vào 2 ml môi trường LB lỏng có bổ sung Amp (100 µg/ml). Nuôi lắc qua đêm ở 37°C, 200 v/p.

- Hút 1 ml dịch nuôi qua đêm cho vào ống Eppendorf 1,5 ml.
- Ly tâm 6.000 v/p trong 5 phút thu tế bào.
- Bổ sung 150 µl Sol I, vortex để hòa tan tế bào.
- Bổ sung 150 µl Sol II, đảo nhẹ.
- Bổ sung 150 µl Sol III, đảo nhẹ.
- Bổ sung 450 µl Chloroform: Isoamylalcohol (24 : 1), đảo nhẹ.
- Ly tâm 10.000 v/p trong 10 phút.
- Chuyển toàn bộ dịch pha trên sang Eppendorf mới.
- Bổ sung 1/10 thể tích CH_3COONa 3 M, pH 5,2 và 2,5 lần thể tích Ethanol 100%, tủa DNA plasmid ở -25°C trong thời gian 2 giờ.
- Ly tâm 13.000 v/p trong 20 phút, thu cặn.
- Rửa cặn DNA bằng 500 µl Ethanol 70%.
- Ly tâm 13.000 v/p, thu tủa.
- Làm khô DNA plasmid bằng máy Speed Vac trong 3p.
- Hòa cặn DNA trong 40 µl TE có bổ sung RNase (100 µg/ml).
- Ủ ở bể ổn nhiệt 37°C trong 1 giờ để loại RNA.

2.2.1.6. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose

DNA tích điện âm có khả năng chuyển động trong điện trường theo chiều từ cực âm đến cực dương. Tốc độ chuyển động của chúng trong điện trường có hiệu điện thế không đổi phụ thuộc hai yếu tố: dạng tồn tại của DNA và kích thước DNA. Các DNA có kích thước càng lớn thì chuyển động càng chậm, các DNA dạng siêu xoắn chuyển động nhanh hơn DNA dạng thẳng.

Trong một phạm vi nhất định của nồng độ gel agarose, kích thước phân tử tuyến tính với quãng đường dịch chuyển của DNA trên gel agarose. Thường các đoạn gen có kích thước từ 300-10.000 bp có thể được phân tách trên gel agarose 0,8%.

DNA trên gel agarose được phát hiện bằng cách nhuộm với Ethidium Bromide (EtBr) và quan sát dưới tia UV.

2.2.1.7. Phương pháp thu đoạn DNA từ gel agarose

Nguyên tắc

Đề tài sử dụng kit thu đoạn DNA từ gel agarose của hãng QIAGEN. Phương pháp dùng các dung dịch đệm khác nhau để gắn DNA lên màng và giải hấp DNA.

Cách tiến hành

- Mẫu DNA sau khi điện di trên gel agarose đem soi dưới ánh sáng tử ngoại và cắt thu băng quan tâm.
- Xác định trọng lượng miếng gel đã cắt.
- Bổ sung đệm QG theo tỷ lệ 300 µl/100 mg gel đã cắt.
- Ủ ở 50°C, 10 phút, trong quá trình ủ đảo ống 2-3 lần.
- Chuyển dịch sang cột thôi gel và ly tâm tốc độ 12.000 vòng trong 1 phút, loại dịch ly tâm.
- Bổ sung 0,5 ml đệm QG và ly tâm 12.000 v/p trong 1phút.
- Rửa cột bằng 0,75 ml đệm PE và ly tâm 1 phút. Loại dịch và ly tâm thêm 1 phút để loại hoàn toàn dịch.
- Chuyển cột sang ống epd mới
- Bổ sung 30-50 µl H_2O, để nhiệt độ phòng 2 phút.
- Ly tâm 12.000 v/p, 1 phút, thu dịch.

2.2.1.8. Phương pháp tinh sạch DNA

- Bổ sung đệm PB với thể tích gấp 3 lần thể tích dung dịch DNA cần tinh sạch. Đảo đều, chuyển sang cột tinh sạch.
- Ly tâm 12.000 v/p, 1 phút, loại dịch.
- Bổ sung 700 µl đệm rửa PE, để 1 phút, ly tâm như trên, loại dịch.

- Ly tâm thêm một lần nữa để loại hoàn toàn đệm rửa.
- Dùng 30-50 µl nước tinh khiết để thu DNA vào ống Eppendorf mới.

2.2.1.9. Phương pháp cắt, gắn DNA

Phương pháp cắt DNA dựa vào khả năng nhận biết và cắt các trình tự đặc hiệu từ 4 - 8 bp của các enzyme cắt giới hạn để cắt các đoạn DNA ở vị trí xác định, tạo thành những đoạn DNA có đầu bằng hoặc đầu dính, có kích thước xác định để làm nguyên liệu và kiểm tra trong phản ứng gắn.

Phương pháp gắn DNA dựa vào khả năng xúc tác hình thành các liên kết, nối hai đoạn axit nucleotide với nhau của enzyme *ligase* để tạo thành DNA tái tổ hợp.

Trong đề tài sử dụng các enzyme cắt, gắn: *Eco*RI, *Xho*I, *T_4-DNA ligase*. Chế phẩm enzyme thường được pha trong dung dịch đệm với thành phần và pH môi trường thích hợp cho hoạt động của enzyme. Trong một thể tích nhất định có đầy đủ các thành phần trong dung dịch đệm cho một enzyme hoạt động, các DNA cần cắt gắn cùng với số lượng enzyme tương ứng và được ủ trong một nhiệt độ thích hợp, các enzyme sẽ cắt hoặc gắn DNA cho ta sản phẩm mong muốn.

2.2.1.10. Phương pháp nhân gen bằng PCR

Nguyên tắc

PCR, phản ứng chuỗi trùng hợp nhờ enzyme *DNA-polymerase* do Karl Mullis phát minh năm 1983. Thực chất đây là một phương pháp tạo dòng *in vitro*, nhằm mục đích thu nhận một lượng lớn bản sao của một trình tự xác định. Cơ sở của phương pháp PCR là dựa vào đặc tính hoạt động của *DNA-polymerase*. Trong thực nghiệm, sử dụng đoạn mồi có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của mạch khuôn và *DNA-polymerase* sẽ nối dài mồi để hình thành mạch mới. Các đoạn DNA mới lại được sử dụng làm khuôn, sau một

chu kỳ thì số lượng đoạn DNA được nhân lên theo cấp số nhân. Một gen trong một thời gian ngắn có thể được nhân lên hàng triệu lần.

Cách tiến hành

- Trộn phản ứng PCR với đầy đủ các thành phần: DNA khuôn, cặp mồi, dNTPs, *Taq polymerase*, $MgCl_2$, dung dịch đệm. Thành phần phản ứng như sau:

Thành phần phản ứng	Nồng độ	Thể tích
Dung dịch đệm	10X	2,5 µl
Mồi F	10 pmol/µl	1 µl
Mồi R	10 pmol/µl	1 µl
DNA khuôn	10-100 ng/µl	1 µl
Taq-polymerase	5 unit/µl	0,5 µl
dNTPs	10 nM	2,5 µl
$MgCl_2$	25 mM	2,5 µl
BSA 1X	1 mg/ml	4 µl
Bổ sung H_2O đủ		10 µl

Chạy máy PCR với chu trình nhiệt sau: Biến tính ở 94^oC: 2 phút; Thực hiện 30 chu kỳ phản ứng với chu trình nhiệt: biến tính 94^oC – 45 giây, bắt cặp 50-60^oC – 45 giây, kéo dài 72^oC – 8 phút để hoàn tất phản ứng; sau đó mẫu được giữ ở 4^oC. Tuy nhiên, đối với mỗi cặp primer cần xác định nhiệt độ bắt cặp thích hợp.

2.2.1.11. Phương pháp xác định trình tự nucleotide

Nguyên tắc

Sử dụng dideoxynucleotide có đánh dấu huỳnh quang để làm ngừng các mạch đơn DNA đang được tổng hợp một cách ngẫu nhiên. Enzyme DNA-*polymerase* xúc tác gắn các nucleotide vào mạch đơn DNA đang tổng hợp ở vị trí 3'-OH, khi gặp ddNTP (không có nhóm 3'-OH) thì phản ứng tổng hợp

bị ngừng lại. Kết quả phản ứng tổng hợp nên các đoạn DNA dài ngắn khác nhau 1 nucleotide, có thể phân tách nhờ điện di trên gel polyacrylamide, phát hiện các dNTP đã đánh dấu nhờ tia laze.

Cách tiến hành

- Thực hiện phản ứng xác định trình tự gen (nhân bản một sợi).
- Sản phẩm PCR sau khi đã tinh sạch được đưa vào máy xác định trình tự tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems).

2.2.2. Các phương pháp thao tác với protein tái tổ hợp

2.2.2.1. Phương pháp biểu hiện gen trong tế bào *E. coli*

Nguyên tắc

Nuôi cấy các thể biến nạp trong môi trường có chất cảm ứng để protein tái tổ hợp có thể được tổng hợp. Sau đó, kiểm tra protein tái tổ hợp bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide để phát hiện băng protein.

Cách tiến hành

- Lấy 1 khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp cho vào môi trường LB lỏng chứa kháng sinh thích hợp, nuôi lắc 200 v/p, 37°C, qua đêm.
- Cấy chuyển sang môi trường LB lỏng chứa kháng sinh với tỷ lệ chủng là 2%.
- Nuôi lắc 200 v/p, 37°C đến khi OD_{600} đạt 0,6 - 1.
- Thu mẫu trước cảm ứng, sau đó bổ sung vào dịch nuôi chất cảm ứng IPTG với nồng độ thích hợp.
- Nuôi tiếp với thời gian thích hợp để biểu hiện. Thu mẫu sau cảm ứng.

2.2.2.2. Phương pháp biểu hiện gen trong tế bào *Bacillus megaterium*

Hệ biểu hiện Bacillus đã được sử dụng trong biểu hiện nhiều loại protein tái tổ hợp. Vi khuẩn *B. megaterium* chủng WH320 của hãng BioTec là một

vật chủ khá lý tưởng để biểu hiện các protein tái tổ hợp vì có nhiều ưu điểm. Tuy nhiên việc biến nạp gen vào chủng này không đơn giản vì không sử dụng được quy trình biến nạp bằng xung điện thông thường như đối với các hệ biểu hiện khác (như ở *E. coli*, nấm men…). Đối với hệ biểu hiện này cần phải sử dụng quy trình biểu hiện riêng và khá phức tạp, khó hơn so với quy trình xung điện: Biến nạp vào protoplast (tế bào trần).

Tạo protoplast

Quy trình tạo protoplast phức tạp hơn so với việc tạo tế bào khả biến ở *E. coli* do *B. megaterium* là chủng vi khuẩn gram dương có cấu trúc tế bào phức tạp hơn so với chủng gram âm. Quy trình tạo protoplast của *B. megaterium* như sau:

Nuôi tế bào *B. megaterium* trong 3 ml môi trường LB lỏng, tỷ lệ giống 3%, lắc 250 rpm/37°C qua đêm. Sau đó cấy chuyển 1ml dịch nuôi cấy qua đêm sang 50 ml môi trường LB lỏng, lắc 250 rpm/37°C đến khi OD_{578nm}=1.0.

Ly tâm 2.600 x g/15 phút/4°C. Loại dịch, thu tế bào. Bổ sung 5 ml SMMP [(Trộn các thể tích tương đương 2x SMM và 2x AB3 trước khi sử dụng), trong đó 2x SMM gồm 1M sucrose; 40 mM maleic acid, disodium salt; 40 mM MgCl2, pH 6.5; Khử trùng 12 phút (có thể có mầu nâu nhạt) và 2x AB3 (Antibiotic Medium No. 3, DIFCO)] để hòa tế bào. Tiếp đó, bổ sung 100 µl Lysozyme (đã được hòa tan trong 1x SMM với nồng độ 100 mg/µl), lắc nhẹ ở 37°C/30 phút. Ly tâm 1300 x g/10 phút ở nhiệt độ phòng, loại dịch thu protoplast.

Hòa protoplast trong 5 ml SMMP, ly tâm tiếp 1300 x g/10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại dịch và hòa protoplast lại trong 5 ml SMMP và 750 µl Glyxerol 87% (w/v). Chia ra mỗi eppendoft 500 µl và bảo quản ở -80°C sử dụng trong thời gian không quá 2 tháng. Trước khi biến nạp, protoplast có thể được kiểm tra trước bằng cách trộn 500 µl protoplast với 2.5 ml thạch CR5-

top agar và phủ trên đĩa thạch môi trường LB đặc không có kháng sinh và nuôi cấy qua đêm.

Biến nạp gen tái tổ hợp vào protoplast *B. megaterium* WH320

Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào protoplast và trải trên đĩa thạch có bổ sung chất kháng sinh tetracillin 10 µg/ml, ủ 37°C qua đêm, một phần lưu giữ ở – 80°C.

Chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy để kiểm tra kết quả biến nạp bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen mã hóa cho V_H-V_L trong gen tái tổ hợp dạng ghép mã hóa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đich (CD33, HER2, Cyfra21-1).

Biểu hiện gen mã hóa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích (CD33, HER2, Cyfra21-1) trong *B. megaterium WH320*

Chủng *B. megaterium* mọc tốt trên môi trường giàu dinh dưỡng như LB, TB ở 37°C. Chủng WH320 và các chủng dẫn xuất của nó không sinh bào tử, sẽ chết trong môi trường thạch, giữ ở 4°C trong vòng 2 tuần, cần sử dụng ống gốc trong glycerol để trải mới 7-10 ngày.

- Chọn lọc các chủng mang pSTREP-HIS1525 có thể bổ sung tetracycline với nồng độ 10 µg/ml để biểu hiện trên môi trường LBA (NaCl 5 g; Trypton: 10 g; Beef extract: 5g/1lít).
- Nuôi lắc ở 37°C, 250 rpm, sau khi nuôi đạt OD_{600nm}= 0.3 thì thu mẫu trước cảm ứng, lấy một lượng thể tích làm mẫu nuôi cùng và tiến hành cảm ứng bằng xylose 0.5 % và nuôi tiếp 24 h thì lấy các mẫu ra và điện di SDS-PAGE để kiểm tra.
- Tinh sạch tên cột Ni-NTA: Sử dụng các hạt Ni-NTA Magnetic Agarose (hãng QIAGEN). cụ thể:

Phá tế bào (sử dụng 100 ml dịch nuôi cấy biểu hiện với 1,5 mM IPTG):

- Ly tâm thu cặn tế bào; Bổ sung 20 ml Lysis buffer

- Thêm 60 UDNase
- Bổ sung 300 µg RNase và 30 mg lysozyme; ủ trong đá 45'
- Vortex 6 lần, mỗi lần 10'', cách quãng 5''. Ly tâm 10.000 v/ph, 4°C, 30 phút

Tinh sạch (sử dụng 900 µl dịch phá tế bào):

- Cho 240 µl dung dịch chứa hạt Ni-NTA 5% vào 900 µl dịch phá tế bào.
- Ủ lắc ở 28°C trong 1h. Đặt trên giá từ tính 1 phút, bỏ dịch nổi
- Bổ sung 750 µl đệm rửa (Wash Buffer), đảo đều rồi đặt trên giá từ tính 1 phút, bỏ dịch nổi. Lặp lại 2 lần bước rửa bằng đệm rửa.
- Bổ sung 100 µl đệm tách (Elution Buffer), đảo đều trong 2 phút rồi đặt trên giá từ tính 1 phút, bỏ dịch nổi.
- Thêm 50 µl đệm tách, đảo đều 2 phút, đặt trên giá từ 1 phút, thu cặn.
- Hòa cặn bằng nước tinh khiết, sau đó điện di kiểm tra kết quả tinh sạch.

2.2.2.3. Phương pháp biểu hiện gen trong tế bào nấm men

Các gen mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên HER2 và CD33 được nghiên cứu tiếp về khả năng biểu hiện trong nấm men, *Pichia pastoris*. Sau khi tạo được các chủng nấm men tái tổ hợp pAO815 mang gen mã hoá kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33, HER2, cần tạo các chủng nấm men có khả năng biểu hiện các kháng thể dạng ghép nhằm đáp ứng đủ nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo. Các bước cụ thể như sau:

Tạo đoạn gắn kết mang nhiều bộ biểu hiện

- Cắt 2µg vector pAO815 tái tổ hợp chứa 1 bộ biểu hiện bằng 10units enzyme mỗi loại *Bgl*II và *Bam*HI trong phản ứng có dung tích 20µl, nhiệt độ phản ứng là 37°C và thời gian phản ứng là 1-2 giờ.
- Sau khi phản ứng hoàn thành, điện di toàn bộ sản phẩm trên 1% low melting agarose.

- Nhuộm gel bằng ethidium bromide. Cắt băng gel chứa bộ biểu hiện để thu nhận bộ biểu hiện. (chú ý băng chứa bộ biểu hiện phụ thuộc vào kích thước gen quan tâm, còn khung vector sau phản ứng được cắt thành 2 đoạn: đoạn *Bam*HI-*Bgl*II kích thước 4,0 kb chứa các trình tự *HIS4* và 3'- *AOX1; Đoạn BglII kích thước 2,4kb chứa trình tự của gen kháng sinh và gốc pBR322*) .
- Tách DNA từ băng gel theo phương pháp đã chọn.
- Tủa DNA với 1/10 thể tích 3M sodium acetate và 2 thể tích cồn 100%.
- Hoà tủa trong 15µl dH_2O. Để trên đá khi sử dụng ngay, nếu không cần bảo quản ở -20^oC.

Tạo vectơ để tiếp nhận đoạn gắn kết mang nhiều bộ biểu hiện

- Cắt 2 µg vector pAO815 tái tổ hợp chứa 1 bộ biểu hiện với 10 unit enzyme *Bam*HI trong dung tích 20 µl, phản ứng được thực hiện ở 37^oC trong 1-2 giờ. Khi kết thúc phản ứng, dung dịch cắt được chiết với phenol, tủa với ethanol và hoà lại trong 17 µl dH_2O.
- Khử phosphoryl được tiến hành như sau: 17 µl vector pAO815 đã cắt với *Bam*HI; 2 µl 10X CIP bufer; 1µl CIP (1Unit/µl)
- Ủ 15 phút ở 37^oC. Thêm 30 µl dH_2O vào ống phản ứng tới thể tích 50µl
- Thêm 50 µl phenol/chloroform, lắc đều, ly tâm, chuyển lớp chứa DNA sang ống mới.
- Tủa DNA với 5µl 3M sodium acetate và 110 µl ethanol 100%. Ủ trên đá 30 phút. Hoà tủa trong 8µl dH_2O. Giữ trên đá khi sử dụng ngay, nếu không bảo quản ở -20^oC.

Cần tách cả 2 dạng nấm men biến nạp His^+Mut^+ và His^+Mut^S vì rất khó dự đoán cấu trúc nào sẽ biểu hiện tốt nhất gen quan tâm. Bằng việc mở vòng cấu trúc DNA trong vùng 5' *AOX1* hoặc trong gen *HIS4* và sử dụng các chủng

GS115 (Mut^+) và KM71 (Mut^S), để tách các thể biến nạp Mut^+ và Mut^S. Sử dụng khoảng 10µg DNA đã mở vòng cho mỗi lần biến nạp.

Sử dụng Kit S.N.A.P để tách DNA plasmid cho biến nạp vào *Pichia.* Tuy nhiên, cũng có thể chuẩn bị theo phương pháp biến tính kiềm, chiết phenol và tủa với cồn.

Điều cần lưu ý là bạn phải mở vòng DNA plasmid mang gen quan tâm thế nào đó để tạo ra hai kiểu hình biến nạp là Mut^+ và Mut^S vì chỉ một trong hai kiểu hình có thể biểu hiện tốt đối với một gen cụ thể.

Sử dụng chủng KM71 khi kiểu hình biến nạp là Mut^S. Dễ thực hiện và hiệu quả hơn nhiều khi tạo kiểu hình biến nạp Mut^S, nếu sử dụng hiện tượng 1 trao đổi chéo hơn là sử dụng trao đổi chéo kép (nghĩa là gắn vào vào *AOX1* hoặc *his4* đối lập với sự thay thế *AOX1*).

- Nếu gắn gen quan tâm vào pPIC3.5K, cần mở vòng vector với:

  Sac I để gắn vào vùng *AOX1* (GS115, Mut^+ hoặc KM71, Mut^S)

  Sal I để gắn vào vùng *HIS4* (GS115, Mut^+ hoặc KM71, Mut^S)

- Nếu gắn gen quan tâm vào vector pAO815, cần mở vòng vector với:

  Sal I hoặc *Stu* I để gắn vào vùng *HIS4* (GS115, Mut^+ hoặc KM71, Mut^S)

  Chú ý: Vị trí đa trị SacI sẽ được hình thành nếu có 2 hoặc nhiều hơn bản sao gen quan tâm trong vector pAO815.

- Nếu gắn gen quan tâm vào vector pPIC9K, cần cắt mở vòng với các enzyme:

  *Sac*I để gắn vào vùng *AOX1* (GS115, Mut^+ hoặc KM71, Mut^S)

  *Sal*I để gắn vào vùng *HIS4* (GS115, Mut^+ hoặc KM71, Mut^S)

Quy trình chuẩn bị DNA để biến nạp

- Cắt cả 2 vector (vector gốc và vector mang gen mã hóa kháng thể). Vector gốc được biến nạp vào GS115 /hoặc KM71 và được sử dụng làm đối chứng âm khi biểu hiện.

- Phân tích một phần nhỏ sản phẩm cắt trên gel agarose để khẳng định sự cắt hoàn toàn.
- Chiết sản phẩm cắt với phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) và tủa với ethanol. Hoà sản phẩm tủa được trong 10-20 µl đệm TE.
- Bảo quản ở -20°C cho đến khi biến nạp.
- Đối với vector gốc được mở vòng giống như vector tái tổ hợp mang gen quan tâm. Các vector pPIC3.5K, pAO815 hoặc pPIC9K chứa một bộ biểu hiện. Hầu hết các thể biến nạp His^{+} được tạo ra khi sử dụng các vector pPIC3.5K và pPIC9K để biến nạp chỉ có một bản sao. Cần chắc chắn rằng thể biến nạp lựa chọn chỉ kháng với 0,25 mg/ml Geneticin®.
- Thể đối chứng một bản sao được tạo ra khi sử dụng các vector pPIC3.5K, pAO815 và pPIC9K có thể có cùng kiểu hình Mut như thể biến nạp được giả định mang nhiều bản sao bộ biểu hiện khi kiểm tra.

Chuẩn bị các môi trường và bảo quản ở 4°C

- Môi trường YPD (yeast extract Peptone Dextrose), 1 lit.
- Đĩa YPD, 1 lít
- Đĩa RDB (Regeneration Dextrose Base), 1 lít
- Đĩa RDHB (Regeneration Dextrose Histidine Base), 1lit.

Chuẩn bị các dung dịch trong ngày biến nạp và giữ ở 45°C:

- 5% dung dịch SDS trong nước cất.
- RD (Regeneration Dextrose), agarose hoà tan, 100 ml.

Dung dịch để tạo khả biến và biến nạp

- 1 M Sorbitol
- SE: 1 M sorbitol, 25 mM EDTA, pH 8.0
- DTT: 1 M DTT trong nước cất
- SCE: 1 M sorbitol, 1 mM EDTA và 10 mM đệm citrate natri, pH 5.8

- CaS: 1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl2
- Zymolyase: 3 mg/ml trong nước cất.
- 40% PEG: 40% (w/v) PEG 3350 trong nước cất.
- CaT: 20 mM Tris, pH 7.5 and 20 mM CaCl2
- SOS: 1 M sorbitol, 0.3X YPD, 10 mM CaCl2

Chuẩn bị mới cho mỗi lần biến nạp

- **SED**: 19 ml of SE and 1 ml of 1 M DTT.
- **PEG/CaT**: Hỗn hợp (1:1) của 40% PEG và CaT .

Quy trình thực hiện

- Cấy vạch GS115 hoặc KM71 trên đĩa YPD sao cho có thể tách các colony riêng biệt. Ủ đĩa 2 ngày ở 28-30°C.
- Chọn 1 colony cho vào 10 ml YPD đựng trong dung tích 50 ml hoặc 100 ml, nuôi lắc qua đêm với tốc độ 250-300 vòng/ph ở nhiệt độ 28-30°C. Dịch nuôi cấy này có thể giữ ở 4°C trong vài ngày.
- Bổ sung 5, 10 và 20 µl dịch nuôi cấy trên vào 3 bình dung tích 500 ml có chứa sẵn 200 ml YPD. Nuôi lắc qua đêm với tốc độ 250-300 v/phút ở nhiệt độ 28-30°C.
- Sáng hôm sau, để các dung dịch biến nạp (SE, SCE, nước cất, SOS, PEG, CaS, CaT, 1 M sorbitol) theo KIT, đĩa RDB để trải chọn thể biến nạp và đĩa RDHB để đối chứng.
- Kiểm tra OD_{600} của mỗi bình nuôi cấy. Thu tế bào từ các bình nuôi cấy đạt OD_{600} giữa 0,2-0,3. Ly tâm thu tế bào ở nhiệt độ phòng, thời gian 10 phút tốc độ 1500 x g. Loại bỏ dịch nuôi cấy.

Chú ý: *Nếu OD_{600} của dịch nuôi >0,3 chọn 1 trong các dịch nuôi và pha loãng (1:4) với môi trường và ủ ở 28-30°C cho tới khi OD đạt giữa 0,2-0,3 (khoảng 2-4 giờ). Thu tế bào và tiếp tục các bước tiếp theo.*

- Chuẩn bị 100 ml môi trường RD có agarose và giữ ở 45°C.
- Làm tan đá ống 1M DTT (kèm theo Kit).
- Chuẩn bị SED mới cho mỗi mẻ tế bào khả biến: Trong điều kiện vô khuẩn, lấy 19 ml SE (theo KIT) vào ống nón dung tích 50 ml, vô khuẩn. Thêm 1ml 1MDTT, lắc đều. Nên chuẩn bị và sử dụng ngay.

Rửa tế bào

- Tế bào thu được ở bước trên được hoà trong 20 ml nước cất (của KIT), hoà tế bào bằng lắc ống. Chuyển vào ống vô khuẩn dung tích 50 ml.
- Ly tâm 1500 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch ly tâm.
- Rửa tế bào 1 lần bằng hoà lại trong 20 ml dung dịch SED mới. Ly tâm 1500 xg trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Rửa tế bào 1 lần với 20 ml dung dịch 1M sorbitol và ly tâm 1500 x g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Hoà tế bào trong 20 ml SCE bằng xoay xoay và chia làm 2 phần cho vào các ống hình nón dung tích 50 ml.
- Lấy 1 ống Zymolyase từ -20°C đặt trên đá, búng nhẹ vài lần để trộn đều. Zymolyase có dạng hồ nên cần lắc kỹ để bảo đảm lượng Zymolyase cần thiết.

Bổ sung Zymolyase

- Sử dụng một ống tế bào chuẩn ở trên cho việc xác định thời gian tối ưu xử lý với Zymolyase để tạo tế bào khả biến (spheroplasts). Khi đã xác định được thời gian tối ưu thì sử dụng ống thứ 2 để tạo tế bào khả biến, spheroplast.
- Zymolyase cắt thành tế bào làm cho tế bào rất dễ gãy. Cầm mẫu thật nhẹ nhàng. Ngay sau khi thêm Zymolyase, sự phân cắt tế bào bắt đầu.

- Chuẩn bị ít nhất 20 ml dung dịch 5% SDS để sử dụng như sau: Bật máy đo quang phổ ở bước sóng 800 nm và đo blank với 800 µl 5% SDS và 200 µl SCE. Lấy 17 ống ly tâm sạch và đánh số: 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50. Thêm 800 µl 5% SDS vào mỗi ống.
- Từ một trong 2 ống tế bào hút 200 µl dịch tế bào bổ sung vào ống đánh dấu "0". Đây là thời điểm 0 của thử nghiệm, đặt ống trên đá.
- Thêm 7,5µl dịch Zymolyase vào ống tế bào thử nghiệm, đậy nắp và lật ngược-xuôi nhẹ nhàng, ủ ở 30^oC. Không lắc ống phản ứng ống Mẫu này sẽ được sử dụng để xác định thời gian ủ tạo khả biến tối ưu. Giữ ống tế bào thứ 2 ở nhiệt độ phòng (sử dụng cho bước 6 sau đây). Giữ Zymolyase còn lại trên đá.
- Xác định sự hình thành spheroplast (khả biến) như sau: Tại thời gian 2 phút, hút 200 µl tế bào (từ ống có bổ sung Zymolyase ở trên) cho vào ống đánh số 2. Tiếp tục với các ống đánh số 4, 5,..., 50 tại các thời điểm tướng ứng sau khi thêm Zymolyase. Xác định OD_{800} tất cả các mẫu.
- Xác định % tạo spheroplasst cho các thời điểm xử lý theo công thức:
  % tạo spheroplast = 100-[(OD_{800} thời điểm t/OD_{800} thời điểm 0) x 100],
  Ví dụ: tại t=0, OD_{800}= 0,256; thời điểm t=15 thì OD_{800}= 0,032. khi đó
  % tạo spheroplast=100-[(0,032/0,256)x100]=100-[(0,125)x100]= 87,5%
- Xác định thời gian ủ mà kết quả khoảng 70% tế bào tạo spheroplast. Thời gian ủ tối ưu có thể khác nhau đối với mỗi lô Zymolyase. Thường từ 15-40 phút.
- Điều quan trọng là xác định thời gian ủ với Zymolyase tối thiểu để đạt được % tế bào tạo spheroplast mong muốn. Nếu kéo dài thời gian ủ sẽ làm chết tế bào và hiệu quả biến nạp sẽ thấp.

- Thêm 7,5 µl Zymolyase vào ống tế bào thứ 2. Ủ ở 30°C với thời gian vừa được xác định để đạt % tế bào tạo được khả biến (spheroplast) khoảng 70%.
- Thu các tế bào khả biến bằng ly tâm 750 x g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Hút bỏ dịch ly tâm.
- Rửa tế bào khả biến với 10 ml 1M sorbitol (búng nhẹ nhàng), ly tâm 750 x g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để thu tế bào khả biến (spheroplasts).
- Rửa tế bào khả biến với 10ml CaS (búng nhẹ nhàng), ly tâm 750 x g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Sau đó hoà lại trong 0,6 ml CaS. Tế bào khả biến cần sử dụng ngay (trong vòng 30 phút) cho biến nạp. Lượng tế bào khả biến nhận được theo chuẩn bị trên đây đủ cho 6 mẫu biến nạp.

Biến nạp

- Hãy chắc chắn đã có đĩa môi trường RDB ở nhiệt độ phòng và môi trường RD nóng chảy. Làm tan đá đối với mẫu DNA đã mở vòng và giữa trên đá.

Chú ý

- *Nếu cấu trúc mở vòng với SalI, StuI hoặc SacI khi đó sẽ ưu tiên cho việc tách thể biến nạp His^{+}Mut^{+} trong GS115.*
- *Nếu cấu trúc mở vòng với SalI, StuI hoặc SacI khi đó sẽ ưu tiên cho việc tách thể biến nạp His^{+}Mut^{S} trong KM71.*
- *Plasmid gốc làm đối chứng được mở vòng với cùng enzyme giới hạn.*

- Đối với mỗi biến nạp: Lấy 100 µl tế bào khả biến (spheroplast) vừa chuẩn bị cho vào ống falcon dung tich 15 ml.
- Thêm 10 µg DNA và ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng.

- Trong thời gian 10 phút này cần chuẩn bị dung dịch PEG/CaT (mỗi lần biến nạp cần 1ml dung dịch PEG/CaT, cần tính toán số lượng cần sử dụng. Chuẩn bị bằng cách hoà dung dịch 40% PEG với dung dịch CaT (theo tỉ lệ 1:1).
- Thêm 1ml dung dịch PEG/CaT vào ống phản ứng, lắc nhẹ và ủ tiếp 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Ly tâm 750 x g trong 10 phút và hút nhẹ nhàng dung dịch PEG/CaT, lật ngược ống và gõ nhẹ để làm khô dung dịch PEG/CaT còn sót.
- Hoà tế bào biến nạp trong 150 µl môi trường SOS, ủ ở nhiệt độ phòng 20 phút.
- Thêm 850 µl dung dịch 1M sorbitol và trải đĩa ở các bước tiếp sau đây.

Trải đĩa

- Tế bào khả biến (spheroplast) Pichia cần được trải trên top agarose hoặc agar để bảo vệ chúng khỏi sự thuỷ phân trước khi chọn lọc.
- Trộn đều 100-300 µl dung dịch spheroplast-DNA chuẩn bị ở trên với 10ml agarose RD nóng chảy và đổ lên đĩa RDB. Để cho top agarose đông lại. Chú ý lượng spheroplast-DNA này đủ trải cho 2-3 đĩa.
- Lật ngược đĩa và ủ ở 28-30°C. Thể biến nạp xuất hiện sau 4-6 ngày.
- Để nhìn thấy tế bào: Trộn 100 µl spheroplast với 900 µl dung dịch 1M sorbitol.
- Trộn 100 µl mẫu pha loãng này với 10 ml agarose RDH nóng chảy và đổ trên đĩa RBDH. Để top agarose đông lại, lật ngược đĩa và ủ ở 28-30°C. Xuất hiện các colony sau 4-6 ngày.

Phân tích các thể biến nạp His^{+}

- Nếu biến nạp vào Pichia với các cấu trúc dựa trên pPIC3.5K hoặc pPIC9K thì sự kiểm tra kết quả biến nạp được thực hiện như sau:

- Hiệu suất biến nạp thường đạt được 10^3-10^4 thể biến nạp His^+/µgDNA sử dụng trong phương pháp tạo spheroplast. Sẽ không có các colony trên đĩa "không có DNA hoặc pBR322 hoặc đĩa chỉ có DNA plasmid (không có tế bào)".
- Một số nhà nghiên cứu sử dụng phép thử chức năng để trực tiếp kiểm tra sự biểu hiện cao của các chủng tái tổ hợp *Pichia* mà không cần kiểm tra về kiểu hình Mut^S hoặc Mut^+. Sau khi kiểm tra sự biểu hiện mạnh, có thể kiểm tra lại kiểu hình Mut sẽ giúp bạn tối ưu hoá việc biểu hiện dòng tái tổ hợp.

Biểu lộ các đoạn gắn nhiều bản sao *in vivo*

- Nếu tần suất của các đoạn gắn nhiều bản sao là 1% thì cần bộc lộ được 1000 thể biến nạp His^+ để nhận được 10 colony có tính kháng cao đối với Geneticin® cho các phép thử tiếp theo. Điều này có thể cần tới 1-5 đĩa chứa các thể biến nạp His^+.
- Có hai phương pháp để bộc lộ (xác định) các thể biến nạp His^+ có tính kháng cao đối với Geneticin®. **Phương pháp 1**: Dễ thực hiện, bộ lộ được lượng lớn colony nhưng độ tin cậy kém. Sau khi chọn được các thể biến nạp His^+, chúng được gộp lại và trải lên đĩa YPD-Geneticin® chứa nồng độ Geneticin® cao hơn. Phương pháp 1 có thể áp dụng đối với các tế bào biến nạp được tạo ra theo phương pháp biến nạp xung điện và spheroplast. **Phương pháp 2**: Được thực hiện với kỹ thuật khó hơn và bộc lộ được một vài colony nhưng độ tin cậy cao hơn. Phương pháp này liên quan tới việc nuôi cấy các colony trên các đĩa vi chuẩn cho đến khi tất cả các colony có cùng mật độ. Sự nuôi cấy, sau đó được đánh dấu trên đĩa YPD-Geneticin® và đánh giá tính kháng đối với Geneticin®.

Trước khi bắt đầu

- Chuẩn bị 4 đĩa môi trường YPD có nồng độ Geneticin®: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0 và 4 mg/ml.

Phương pháp 1 (spheroplasts)

- Sử dụng quy trình này khi biến nạp là các *Pichia* khả biến (spheroplast Pichia). Bắt đầu với các đĩa chứa các thể biến nạp His^+.
- Sử dụng que gạt vô khuẩn, loại bỏ lớp soft agar ở trên chứa các thể biến nạp His^+ chuyển vào ống hình nón vô trùng dung tích 50ml.
- Thêm 10-20 ml dH_2O và có thể là 2x thể tích nước so với lượng agarose. Vortex mạnh 1-2 phút.
- Để ống ly tâm thẳng đúng trên bàn 1 phút để agarose lắng đọng..
- Xác định mật độ tế bào của phần dịch nổi. Cần ít nhất $5x10^5$ tế bào/ml nhờ đó có thể trải đĩa với 200 µl hoặc ít hơn (nếu tế bào quá loãng, chuyển dịch sang ông mới và ly tâm, hoà lại tế bào sao cho đạt mật độ cần thiết $5x10^5$ tế bào/ml) [OD_{600}=1 tương đương 5 x 10^7tế bào/ml].
- Trải 10^5 tế bào lên đĩa YPD chứa Geneticin® với các nồng độ cuối cùng là 0,25 : 0,5 : 0,75 : 1,0 : 1,5 : 1,75 : 2,0 : 3,0 : 4,0 mg/ml.
- Sử dụng 4 đĩa cho một nồng độ Geneticin®. Cần chuẩn tế bào trên đĩa không chứa Geneticin® để tính % các colony kháng Geneticin® nhận được đối với mỗi nồng độ và xác định tỷ lệ này có nằm trong khoảng 1-10% thể biến nạp.
- Chuẩn bị dịch pha loãng 10^{-5},10^{-6},10^{-7} đối với tổng các thể biến nạp bằng dH_2O. Trải đĩa 100-200 µl/đĩa. ***Phần còn lại được chia nhỏ và bảo quản trong 15% glycerol ở -80°C để phân tích sau.***
- Ủ đĩa ở 30°C và kiểm tra hàng ngày. Các colony kháng Geneticin® cần 2-5 ngày để xuất hiện, trong khi các tế bào trải trên đĩa YPD không có Geneticin® cần 2-3 ngày để xuất hiện.

Phương pháp 2 (xung điện, Eletroporation)

- Quy trình sử dụng khi xung điện để nhận tế bào *Pichia* biến nạp. Các thể biến nạp sẽ không trải trên top agar. Quy trình bắt đầu với các đĩa chứa thể biến nạp His^+.
- Cho 1-2ml dH_2O lên mỗi đĩa biến nạp His^+. Sử dụng tất cả các đĩa có thể biến nạp His^+.
- Hoà thể biến nạp bằng que khuấy vô khuẩn và gạt nhẹ lên bề mặt agar. Cẩn thận để không làm xước agar.
- Chuyển và gộp tất cả dịch tế bào vào ống hình nón, vortex ngắn.
- Xác định mật độ tế bào (1 OD_{600}= 5 x 10^7 tế bào/ml).
- Trải 10^5 tế bào lên đĩa YPD chứa Geneticin® với các nồng độ cuối cùng là 0,25 : 0,5 : 0,75 : 1,0 : 1,5 : 1,75 : 2,0 : 3,0 : 4,0 mg/ml.
- Sử dụng 4 đĩa cho một nồng độ Geneticin®. Bạn cần chuẩn tế bào trên đĩa không chứa Geneticin® để tính % các colony kháng Geneticin® nhận được ở mỗi nồng độ và xác định xem tỷ lệ này có nằm trong khoảng 1-10% thể biến nạp.
- Chuẩn bị dung dịch pha loãng 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} đối với tổng các thể biến nạp bằng dH_2O. Trải đĩa 100-200 µl/đĩa. ***Phần còn lại được chia nhỏ và bảo quản trong 15% glycerol ở -80°C để phân tích sau.***
- Ủ đĩa ở 30°C và kiểm tra hàng ngày. Các colony kháng Geneticin® cần 2-5 ngày để xuất hiện, trong khi các tế bào trải trên đĩa YPD không có Geneticin® cần 2-3 ngày để xuất hiện.

2.2.2.4. Phương pháp điện di protein (Laemmli, 1970)

Nguyên tắc

- Phức hợp protein-SDS thu được sau khi biến tính protein bằng SDS có điện tích âm chỉ phụ thuộc vào kích thước của protein mà không phụ thuộc vào trình tự của protein đó. Nhờ đó, hỗn hợp protein sau khi biến

tính có thể chuyển động trong điện trường theo chiều từ cực âm đến cực dương và tách các băng theo kích thước trên gel polyacrylamide.

- Protein trong gel polyacrylamide được phát hiện bằng cách nhuộm với Coomasie Brilliant Blue (CBB) và quan sát bằng mắt thường.

Cách tiến hành

- **Chuẩn bị gel điện di polyacrylamide:**

Gel phân tách:

H2O	3,125 ml
Tris-HCl (pH = 8; 3M)	0,625 ml
Acrylamide	2,1 ml
Glycerol	1 ml
APS.10%	25 µl
SDS.10%	25 µl
Temed	4 µl

Gel cô mẫu:

H2O	1,385 ml
Tris-HCl (pH = 6,8 M ; 0,5 M)	0,625 ml
Acrylamide	0,425 ml
APS.10%	25 µl
SDS.10%	12,5 µl
Temed	3 µl

- **Xử lý mẫu**: Hút 1 ml dịch sau phản ứng ly tâm 12.000 v/p, thu cặn tế bào. Hòa lại trong 40 µl H_2O + 10 µl SDS Sample, biến tính ở 100^oC trong 5 phút. Tra mẫu lên bản gel: 15 µl.
- **Chạy điện di**: Điện di theo chiều thẳng đứng với cường độ dòng điện 40 mA, trong thời gian khoảng 40 phút.

- **Nhuộm bản gel**: Bằng dung dịch CBB được pha trong dung dịch tẩy gel. Sau đó tẩy bản gel và xác định kết quả.

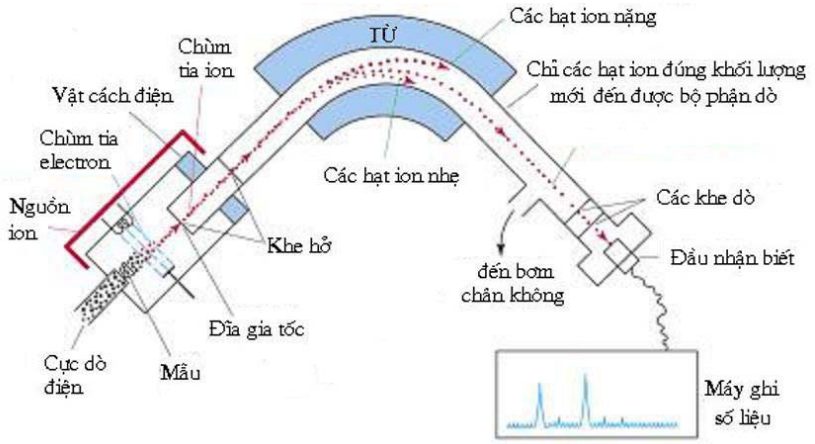
2.2.2.5. Phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp bằng cột ái lực Ni2+

Cột sắc ký ái lực Ni^{2+} được thiết kế để tinh sạch protein tái tổ hợp có chứa 6 gốc histidine. Quy trình cụ thể:

- Ly tâm thu cặn tế bào từ 50 ml môi trường. Bổ sung 8 ml Guanidin Lysis Buffer (6 M Guanidin hydrochloride, Sodium phosphate 20 nM, pH 7.8, NaCl 500 mM), vortex nhẹ. Siêu âm để phá tế bào trong 5 phút.
- Ly tâm 5.000 v/p, thu dịch nổi để chuyển lên cột Ni2+. Đảo đều trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Cố định cột theo chiều thẳng.
- Rửa cột 2 lần bằng 4 ml Denaturing Binding Buffer (8 M Urea; 20 mM Sodium phosphate pH = 7,8; NaCl 500 mM). Sau đó rửa cột 2 lần bằng 4 ml Denaturing Wash Buffer (8 M Urea; Sodium phosphate 20 mM pH = 6; NaCl 500 mM).
- Rửa cột 4 lần bằng 8 ml Native Wash Buffer (Native Purification Buffer và Imidazole pH = 6). Giải hấp protein bằng 6 ml Native Elution Buffer và thu từng phân đoạn 1 ml.

2.2.2.6. Phương pháp phân tích khối phổ

Cấu tạo: Máy gồm một đĩa đựng mẫu, máy bắn laser, một ống tròn đảo chiều điện cực liên tục và đầu nhận biết theo sơ đồ sau:



Thủy phân protein trong gel bằng enzyme trypsin

Protein, sau khi phân tách qua SDS-PAGE, được cắt băng thành các phân đoạn và tiến hành thủy phân protein trong gel theo phương pháp của Stensballe, Jensen (2001).

Các peptide sau thủy phân được chiết rút khỏi gel bằng dung dịch chiết (60% acetonitrile, 1% TFA). Dịch chiết có chứa các peptide được làm khô bằng máy SPD1010 SpeedVac® System (ThermoSavant, Mỹ).

Phân tích thành phần peptide qua hệ thống sắc ký lỏng 1 chiều NanoLC

Hỗn hợp peptide sau khi thủy phân được phân tích qua hệ thống sắc ký lỏng một chiều thông qua cột ngược pha (reverse phase, RP-C18). Mẫu được đưa vào với thể tích 20 µl và được đẩy lên cột với tốc độ dòng 30 µl/phút bằng 0,1% formic acid. Các peptide bám trên cột RP-C18 (75 µm x15 cm) được thôi ra bằng pha linh động A (0,1% formic acid) và B (85% acetonitrile và 0,1% formic acid) với tốc độ dòng 200 nl/phút, theo gradient nồng độ tuyến tính từ 5 đến 100% pha linh động B trong 90 phút. Cột ngược pha C18 được gắn vào đầu đưa mẫu Silica Tip kết nối với máy khối phổ QSTAR®XL bằng nguồn ESI.

Ghi phổ MS/MS

Máy khối phổ QSTAR®XL được vận hành ở chế độ IDA (Information Dependent Acquisition) để thực hiện việc chuyển từ quét phổ TOF MS đơn đối với các ion nằm trong dải khối (TOF mass) từ 400 đến 1200 sang khối phổ liên tiếp trên 3 ion phân tử có mật độ cao nhất và lớn hơn 15 được xác định tự động nhờ phần mềm BioAnalyst QS v1.8 (AppliedBiosystems). Thời gian thực hiện MS/MS đối với mỗi ion không quá 90 giây. Hiệu điện thế được đặt để ion hóa mẫu là 2200 V.

Phân tích phổ khối peptide bằng phần mềm Mascot

Phổ khối MS/MS được phân tích bằng phần mềm Mascot v1.8, đây là phần mềm có khả năng phân tích dữ liệu phổ MS/MS để nhận dạng protein dựa trên thuật toán Mowse được phát triển bởi MatrixScience (London, UK). Cơ sở dữ liệu được dùng để tìm kiếm trong Mascot là NCBInr, một cơ sở dữ liệu các protein với khoảng trên 1,7 triệu trình tự khác nhau được cài đặt trên một máy tính HP Proliant Server.

2.2.3. Các kỹ thuật phage display

2.2.3.1. Chuẩn bị thư viện

Thư viện bán tổng hợp Griffin.1 bao gồm khoảng $1,2.10^9$ dòng phagemid pHEN2 mang các mảnh kháng thể scFv khác nhau trong vi khuẩn TG1.

Thư viện được cất giữ trong glycerol ở -80°C. Khi thao tác với thư viện, cần phải nhân nuôi và lưu giữ thư viện thứ cấp, quá trình này được thực hiện theo các bước sau:

- Chuẩn bị 100 ml môi trường 2xTY chứa Ampicillin (100 µg/ml) và 1% glucose, bổ sung 1 ml thư viện $1,2.10^9$ dòng vi khuẩn mang các scFv khác nhau.
- Nuôi lắc tại 37°C trong 1,5 h hoặc đến khi OD_{600} = 0,5.
- 10 ml dịch nuôi sẽ được chuyển thành kháng thể phage-scFv theo quy trình *2.2.3.2*
- Lượng dịch nuôi còn lại được ly tâm thu tế bào và giữ trong glycerol ở -80°C, đây chính là thư viện thứ cấp.

2.2.3.2. Tạo kháng thể phage-scFv từ thư viện

- Lấy 10 ml dịch nuôi thư viện, cho helper phage vào với mật độ 1 vi khuẩn/20 helper phage (M13K07).
- Ủ trong bể ổn nhiệt 30 phút, 37°C (không lắc).

- Ly tâm thu tế bào với tốc độ 4.000 v/p trong 10 phút.
- Hòa lại cặn tế bào trong 30 ml 2xTY + 25 µg/ml Kanamicin và 100 µg/ml Ampicillin.
- Lấy 30 ml dịch vi khuẩn, thêm 270 ml 2xTY+25 µg/ml Kanamicin µg/ml Ampicillin đã làm ấm.
- Ủ có lắc 30°C qua đêm. Phần này được dùng để tạo các kháng thể phage.
- Ly tâm dịch nuôi qua đêm với tốc độ 8.000 v/p trong 10 phút (hoặc 4.000 vòng/30 phút).
- Thu dịch nổi chứa phage và kết tủa các hạt phage bằng cách cho thêm 1/5 thể tích PEG/NaCl. Trộn đều và để tối thiểu 1 h tại 4°C (trong đá).
- Ly tâm 12.000 v/p trong 30 phút.
- Hòa lại cặn trong 40 ml nước, thêm 8 ml PEG/NaCl, trộn đều giữ ở 4°C, 20 phút. Ly tâm 4.000 vòng/30 phút, bỏ dịch.
- Hòa lại cặn kháng thể phage-scFv trong 2,5 ml PBS và ly tâm 4.000 v/p trong 10 phút để loại hầu hết các mảnh vụn tế bào còn sót lại.

2.2.3.3. Chuẩn bị helper phage

Helper phage M13K07 được đặt mua của hãng BioLabs, sau đó được nhân lên để phục vụ cho thí nghiệm, quy trình cụ thể như sau:

- Nhiễm 200 µl *E. coli* TG1 (OD_{600} ~ 0,2) với 10 µl chuỗi pha loãng 10 lần của helper phage, ủ 37°C trong 30 phút.
- Cho các tế bào đã nhiễm vào 3 ml YT-top agar (50°C), đổ vào đĩa thạch TYE, ủ qua đêm tại 37°C.
- Nhặt 4 vết tan của helper phage, mỗi vết tan cho vào 1 ml dịch vi khuẩn TG1 OD = 0,5; nuôi lắc trong 2 h ở 37°C.
- Bổ sung 20 ml 2xTY, nuôi lắc tiếp 2 h.
- Bổ sung vào mỗi ống 15 µl Kanamycin 100 mg/ml, nuôi lắc qua đêm.
- Ly tâm dịch nuôi với tốc độ 10.800 g trong 15 phút, thu dịch.

- Tủa dịch ly tâm bằng 5 ml PEG, ủ 45 phút trong đá (4^oC).
- Ly tâm 10.800 g trong 20 phút, thu tủa.
- Hòa tủa trong 1,5 ml TE và giữ helper phage đã thu ở -20^oC hoặc -80^oC tùy mục đích sử dụng.

2.2.3.4. Sàng lọc dòng kháng thể phage-scFv đặc hiệu kháng nguyên đich

Có rất nhiều phương pháp cố định tùy thuộc bản chất của đích cần sàng lọc. Kháng nguyên CD33, HER2, Cyfra21-1 là phân tử protein có kích thước không lớn, dễ dàng được hấp phụ trên bề mặt đĩa polystyrene. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn cách đơn giản để cố định các kháng nguyên trong quá trình sàng lọc và thu nhận kháng thể phage-scFv đặc hiệu kháng nguyên đích, cụ thể như sau :

- Kháng nguyên được pha loãng trong PBS (10-100 ng) sau đó được phủ trên đĩa polystyrene qua đêm ở nhiệt độ phòng.
- Để tránh phage liên kết không đặc hiệu với bề mặt, đĩa được phủ tiếp với dung dịch MPBS 2% sữa tách bơ và ủ ở 37^oC trong 2 giờ.
- Rửa đĩa bằng PBS 3 lần sau đó cho hỗn hợp phage (đã nhân nuôi từ thư viện gốc *Bacteriophage* Griffin.1) vào các giếng.
- Ủ đĩa 37^oC trong 2 h.
- Sau đó rửa 10 lần bằng dung dịch TPBS (0,05% Tween 20 pha trong PBS), rửa tiếp 10 lần với dung dịch PBS.
- Các phage gắn với kháng nguyên được giải hấp phụ bằng 1 ml triethylamine 100 mM trong 10 phút ở nhiệt độ phòng sau đó trung hoà bằng 0,5 ml Tris-HCl, pH = 7,5.
- Dung dịch phage giải hấp phụ được ly tâm 10.000 v/p, thu dịch ly tâm. Dịch ly tâm này chứa các phage mang mảnh kháng thể gắn đặc hiệu với kháng nguyên đích đã cố định.

- Các phage sau mỗi vòng sàng lọc sẽ được nhân nuôi trong tế bào TG1 để phục vụ cho các vòng sàng lọc tiếp theo.
- Sau lần sàng lọc thứ 3 ái lực trung bình của các kháng thể phage-scFv được kiểm tra bằng ELISA với kháng thể cộng hợp kháng M13.

2.2.3.5. Phục hồi và nhân phage

Một phần kháng thể phage-scFv sau mỗi vòng sàng lọc đều được đưa vào vi khuẩn TG1 để nhân và tạo phage để phục vụ cho các lần sàng lọc tiếp theo. Cụ thể:

- Vi khuẩn *E. coli* TG1 được nuôi trong môi trường 2xTY chứa 1% glucose đến khi OD_{600} = 0,5.
- Ủ phage từ các vòng sàng lọc với dịch vi khuẩn TG1 trong 30 phút ở 37^oC, không lắc. Cấy trải toàn bộ dịch nhiễm phage trên đĩa môi trường TYE chứa Ampicillin 100 µg/ml, ủ đĩa ở 37^oC qua đêm.
- Cho 2 - 5 ml môi trường 2xTY vào đĩa, hòa tế bào bằng que cấy và dồn toàn bộ dung dịch chứa tế bào vào 1 ống. Cho 50 µl huyền phù vi khuẩn vào 50 ml dung dịch đệm 2xTY chứa 100 µg/ml ampicillin và glucose 1%, tăng sinh tế bào tại 37^oC đến khi OD_{600} = 0,5.
- Sử dụng 10 ml dịch nuôi cho mục đích tạo phage để thu kháng thể phage-scFv phục vụ cho các bước sàng lọc tiếp theo và kiểm tra.
- Lượng dịch nuôi còn lại sẽ tiếp tục được nuôi lắc thêm 1 h, ly tâm thu tế bào, giữ trong glycerol nồng độ cuối cùng là 15% (v/v).

2.2.3.6. Chuẩn độ phage

- Nuôi lắc chủng vi khuẩn thích hợp tại 37^oC đến khi OD_{600} = 0,5 - 0,7.
- Tạo chuỗi pha loãng 10 lần của phage và cho vào 100 µl dịch vi khuẩn.
- Để vi khuẩn nhiễm phage 30 phút tại bể ổn nhiệt 37^oC.

- Trải dịch vi khuẩn đã nhiễm lên đĩa với các điều kiện chọn lọc thích hợp và nuôi ủ qua đêm ở 37°C.
- Từ số khuẩn lạc mọc trên mỗi đĩa, tính ra nồng độ phage theo đơn vị tải nạp (transducing unit).

2.2.3.7. Sản xuất mảnh kháng thể (scFv) hòa tan

- Lấy 10 µl dịch phage để gây nhiễm 200 µl dịch tế bào *E. coli* chủng HB2151 đang phát triển ở pha log, thời gian 30 phút, ở 37°C. Trải lên đĩa TYE chứa ampicillin (100 µg/ml) và glucose (1%) với 1 µl, 10 µl, 100 µl và 1/10 dịch pha loãng. Nuôi ủ qua đêm ở 37°C.
- Nhặt các khuẩn lạc riêng biệt nuôi cấy trong 100 µl 2xTY chứa ampicillin (100 µg/ml) và glucose (1%) trong khay miễn dịch 96 giếng. Nuôi lắc qua đêm ở 37°C. Phần các khuẩn lạc còn lại có thể giữ ở -70°C sau khi bổ sung 15% glycerol.
- Chuyển 2 µl dịch nuôi cấy từ mỗi giếng của khay miễn dịch sang các giếng của khay miễn dịch mới có chứa 200 µl 2xTY chứa Ampicillin (100 µg/ml) và glucose 0,1%, nuôi lắc ở 37°C cho đến khi OD_{600} = 0,9.
- Khi OD đã đạt, bổ sung 25 µl 2xTY/ampicillin (100 µg/ml) và 9 mM IPTG (nồng độ cuối cùng đạt 1 mM IPTG), nuôi lắc tiếp ở 30°C từ 16 đến 24 giờ.
- Thu dịch môi trường nuôi cấy và tế bào để kiểm tra sự biểu hiện và tồn tại của các scFv.

2.2.3.8. Phương pháp ELISA

ELISA là một kỹ thuật hóa sinh miễn dịch được sử dụng để phát hiện sự có mặt của một kháng nguyên hay một kháng thể trong mẫu. ELISA cũng đã được sử dụng như là một công cụ để chẩn đoán trong y sinh học.

Phương pháp ELISA được dùng để kiểm tra ái lực của các kháng thể phage-scFv thu được với kháng nguyên đích, so sánh với kháng thể chuẩn của thế giới. Đồng thời phương pháp ELISA cũng được dùng để xác định hàm lượng kháng nguyên trong huyết thanh bệnh nhân. Cụ thể:

- Cố định huyết thanh hoặc 100 µl kháng nguyên (10-100 ng) đã sử dụng để sàng lọc (CD33, HER2, Cyfra21-1) trên đĩa ELISA qua đêm ở nhiệt độ phòng.
- Rửa đĩa 3 lần với PBS, làm khô trên giấy thấm.
- Bổ sung vào mỗi giếng 300 µl MPBS, ủ tiếp 2 giờ ở 37°C.
- Rửa đĩa 3 lần với T-PBS, 3 lần với PBS.
- Thêm 100 µl dịch phage-scFv (hoặc kháng thể chuẩn) với vai trò là kháng thể 1 được bổ sung vào mỗi giếng và ủ 90 phút ở nhiệt độ phòng.
- Rửa đĩa 3 lần bằng TPBS, 3 lần bằng PBS.
- Phát hiện phage gắn bằng cộng hợp kháng thể kháng M13 theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Xác định độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm và 650 nm để chọn được các phage mang kháng thể đặc hiệu mong muốn.

2.2.3.9. Phương pháp phage display immuno real time-PCR

Phage display immuno real time-PCR gián tiếp được thực hiện với các bước như phản ứng ELISA nhưng sử dụng kỹ thuật real-time PCR thay cho phản ứng tạo mầu của enzyme với cơ chất.

Vì vậy, sau khi ủ với phage, các giếng của khay thử được rửa với dung dịch đệm ET-PBS (chứa 5 mM EDTA và 0,1% Tween-20), tiếp theo rửa với H_2O để loại bỏ phage không gắn kết. Làm khô trên giấy thấm, thêm 50 µl H_2O vào mỗi giếng, sử lý nhiệt ở 95°C để thủy giải phage liên kết. Sử dụng 5 µl dịch thủy giải làm khuôn cho phản ứng real time-PCR. Đây cũng là nguyên lý cơ bản của phản ứng định lượng các kháng nguyên trong mẫu phân tích.

Phản ứng real time-PCR là rất nhạy, do vậy để tránh trường hợp dương tính giả do tạp nhiễm từ môi trường, cần phải có mẫu đối chứng âm (mẫu không có dịch thủy giải). Thành phần phản ứng như sau:

Thành phần	Thể tích (µl)
H_2O vô trùng	4,4
Mồi xuôi (10 pmol/µl)	0,3
Mồi ngược (10 pmol/µl)	0,3
SYBR Green Master Mix	10
Kháng thể phage-scFv	5
Tổng thể tích	**20**

Sau khi chuẩn bị xong, ly tâm nhẹ và đặt vào máy Eppendorf hoặc máy LighCycle2.1 (Roche) để thực hiện phản ứng.

Chu kỳ nhiệt của phản ứng

- Bước 1: Biến tính 95°C trong thời gian 15 phút.
- Bước 2: Chu trình lặp lại 40 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây) đồng thời có phân tích định lượng.
- Bước 3: Xác định nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm real time-PCR (Melting Curves), 95°C, 65°C trong thời gian 10 giây, 95°C đồng thời có phân tích đường cong nóng chảy và đỉnh nhiệt độ nóng chảy.
- Bước 4: Làm mát sản phẩm real time-PCR, 40°C trong thời gian 1 phút.

Phản ứng khuếch đại có thể quan sát được nhờ tín hiệu huỳnh quang của SYBR Green I phát ra khi gắn vào sợi DNA mạch kép thông qua hệ thống camera theo dõi tín hiệu phát huỳnh quang từ mỗi ống.

2.2.4. Phương pháp thống kê sinh học

Phương pháp thống kê sinh học được sử dụng để đánh giá kết quả thí nghiệm, như kết quả ELISA là 2 phương pháp kiểm định **Ftest** và **Ttest**.

2.2.5. Gắn kháng thể với vàng làm nguyên liệu của KIT định tính

Quy trình: Gắn kháng thể với hạt vàng theo quy trình của Beesley J (1989):

Hóa chất gồm: Aqua regia: 50% HCl và 50% HNO_3; Deionized H_2O; Borax: $Na_2B_4O_7.10H_2O$ (2mM); NaCl (10%); BSA (10%); K_2CO_3 (100 nM); HCl (100 mM).

Dụng cụ, thiết bị thí nghiệm: Cốc thủy tinh, que khuấy thủy tinh, ống nhựa ly tâm được rửa nhiều lần bằng nước cất sau đó được silicon hóa để chống dính. Máy đo phổ hấp thụ của dung dịch.

Chuẩn bị kháng thể đã được tinh sạch trên cột sắc ký ái lực

Pha kháng thể trong đệm 2mM borax tới nồng độ 0.1µg/µl. Thẩm tích dung dịch thu được ít nhất 4 giờ trong 1 lít đệm borax với pH=9,0. Ly tâm dung dịch kháng thể tốc độ 10000 x g thời gian 1 giờ ở 4^oC, sau đó giữ ở 4^oC cho tới khi sử dụng.

Chuẩn độ dung dịch để xác định tỉ lệ kháng thể-vàng (Ab-Au)

1. Chuẩn dung dịch hạt vàng tới pH 9. Dùng Pipette nhỏ giọt 500µl dung dịch hạt vàng vào dãy các ống ly tâm (1.5ml).
2. Điều chỉnh pH của dịch kháng thể (0.1 µg/µl) tới pH 9.2 với 100 nM K_2CO_3 hoặc 100 mM HCl
3. Thêm kháng thể vào mỗi ống ly tâm chứa đệm theo dãy sau: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50. Cụ thể như sau:

Ab	Buffer	Ab	Buffer	Ab	Buffer	Ab	Buffer	Ab	Buffer	Ab	Buffer
50	0	50	0	10	40	10	40	35	15	35	15
45	5	45	5	5	45	5	45	30	20	30	20
40	10	40	10	0	50	0	50	25	25	25	25
35	15	35	15	Borax	50	Borax	50	20	30	20	30
30	20	30	20	Water	50	Water	50	15	35	15	35
25	25	25	25	50	0	50	0	10	40	10	40
20	30	20	30	45	5	45	5	5	45	5	45
15	35	15	35	40	10	40	10	0	0	0	0

4. Thêm đệm vào mỗi ống chứa kháng thể để các ống đạt thể tích 1mL
5. Lắc đều, nhẹ các ống và để đứng khoảng 5 phút để tạo phức hệ **Ab-Au**.
6. Thêm vào mỗi ống ly tâm 100 µl of 10% NaCl và lắc đều 1 phút.
7. Xác định độ hấp thụ và soi kính để đánh giá phức hệ **Ab-Au** tạo thành.

2.2.6. Phương pháp thử nghiệm độc tính cấp sản phẩm kháng thể

Tài liệu sử dụng

- Quy trình thử độc tính cấp của Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương.
- OECD guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity – Fixed dose procedure OECD 420, 2001

Động vật thí nghiệm

- Loài: chuột nhắt trắng giống Swiss. Cân nặng: 18-22 g. Số lượng: 50 con
- Nguồn gốc cung cấp: Viện vê sinh dịch tễ trung ương.
- Điều kiện chăm sóc: ĐVTN được nuôi trong điều kiện chuồng thoáng mát, đảm bảo vệ sinh, chế độ ăn uống theo nhu cầu của chuột.
- Cân nặng: Tất cả ĐVTN được để ổn định 3 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm và theo dõi cân nặng trong quả trình thử nghiệm.

Mẫu thử

- Dùng nguyên mẫu (dưới dạng dung dịch, hàm lượng 2mg/ml)
- Các mức liều thử nghiệm: **Mức liều 1**: 20,0 ml mẫu thử /kg chuột; **Mức liều 2**: 30,0 ml mẫu thử/kg chuột; **Mức liều 3**: 40,0 ml mẫu thử/kg chuột; **Mức liều 4**: 50,0 ml mẫu thử/kg chuột

Quy trình thử nghiệm

- **Chuột được nhịn ăn 15 giờ** trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm.
- **Cách dùng**: Đưa mẫu thử dưới dạng dung dịch theo con đường tiêm tĩnh mạch đuôi chuột. Lấy thể tích mẫu thử theo quy định tiêm vào tĩnh mạch đuôi chuột bằng xylanh vô trùng.
- **Dựa trên kết quả thăm dò trong thử nghiệm sơ bộ**, tiến hành thử nghiệm chính thức trên 50 chuột, chia thành 5 nhóm gồm 1 nhóm chứng tiêm dung dịch tiêm truyền NaCl 0,9% và 4 nhóm thử theo mức liều đã dự tính. Các nhóm thử được tiêm các dung dịch thử ở các mức liều như sau:

Nhóm chuột	Liều dùng (ml mẫu thử/20g chuột)	Liều dùng (ml mẫu thử/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm
Nhóm chứng	1,0 ml NaCl 0,9%	----	10
Mức liều 1	0,4 ml mẫu thử	20,0 ml / kg chuột	10
Mức liều 2	0,6 ml mẫu thử	30,0 ml / kg chuột	10
Mức liều 3	0,8 ml mẫu thử	40,0 ml / kg chuột	10
Mức liều 4	1,0 ml mẫu thử	50,0 ml / kg chuột	10

- **Lịch theo dõi**: Theo dõi biểu hiện của chuột sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của động vật thí nghiệm trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

Phần III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Nội dung nghiên cứu của đề tài bao gồm 3 phần chính. ***Phần 1****: Tạo kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên HER2 trong ung thư vú, tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên Cyfra 21-1 trong ung thư phổi, tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 trong ung thư máu;* ***Phần 2****: Tạo KIT chẩn đoán trên cơ sở các kháng thể thu được ở phần 1;* ***Phần 3****: Nghiên cứu tạo các kháng thể dạng ghép đặc hiệu các kháng nguyên trên (HER2; Cyfra 21-1; CD33).*

Do nội dung nghiên cứu nhiều với các kháng nguyên đặc trưng cho các dạng ung thư khác nhau, nên để tiện theo dõi chúng tôi trình kết quả nghiên cứu theo từng dạng ung thư và đối với mỗi dạng ung thư thì kết quả nghiên cứu được trình bày từ việc tách dòng kháng nguyên đặc hiệu ung thư, tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đã tách dòng, tạo Kit chẩn đoán kháng nguyên trên cơ sở kháng thể tạo được và cuối cùng là tạo gen mã hóa kháng thể dạng ghép nhằm tạo nguyên liệu cho việc nghiên cứu tạo chế phẩm điều trị ở giai đoạn nghiên cứu sau này.

3. I. TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU HER2 TRONG UNG THƯ VÚ

3.1.1. Tổng quan về ung thư vú

Ung thư vú hiện nay đang là một trong hai loại ung thư chiếm tỷ lệ cao nhất trong các bệnh ung thư ở nữ giới. Điều trị ung thư vú cũng như nhiều loại ung thư khác theo các liệu pháp truyền thống như hoá trị liệu và xạ trị liệu mặc dù hiệu quả tiêu diệt khối u cao nhưng lại có một nhược điểm rất lớn, đó là tác dụng lên cả các cơ quan bình thường xung quanh (non-targeted effect). Những nghiên cứu gần đây về các marker sinh học trong ung thư vú đã mở ra một hướng điều trị mới, thông minh và đầy triển vọng, liệu pháp điều trị tấn công đích (targeted therapy), có thể loại bỏ gần như hoàn toàn nhược điểm của các liệu pháp truyền thống.

Theo thống kê, tỉ lệ tử vong do UTV ở phụ nữ tại Nhật Bản, Mêxico, Venezuela là 2-5/100.000 người, tại Anh, Đan Mạch, Hà Lan, Hoa Kỳ và Canada là 25-35/100.000 người.

Tỉ lệ UTV trên thế giới có chiều hướng gia tăng, nhưng tỉ lệ tử vong lại có chiều hướng giảm xuống. Theo nghiên cứu của hiệp hội ung thư, tỉ lệ UTV ở Mỹ đã tăng từ 80/100.000 người trong năm 1975 lên 105/100.000 người trong năm 1985 và 178/100.000 người trong năm 1998.

Theo Nazario và cs, tỉ lệ UTV ở Puerto Rico đã tăng từ 15,3/100.000 người trong giai đoạn 1960-1964 lên 43,3/100.000 người trong giai đoạn 1985-1989. Tại Vaud, Thụy Sĩ, tỉ lệ UTV đã tăng từ 2,1/100.000 phụ nữ (1997-1979) lên 9,4/100.000 phụ nữ (1992-1994).

Tỉ lệ UTV ở châu Á có xu hướng tăng nhanh, đặc biệt ở Nhật Bản, Hồng Kông và Singapore, nơi có lối sống tây hóa. Điều này cho thấy các yếu tố môi trường, lối sống và đặc biệt là chế độ ăn uống đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của bệnh UTV. Cũng theo số liệu thống kê ở Anh năm 2005, có 212.930 trường hợp mắc bệnh mới trong đó 40.840 ca tử vong (Hobday & Perez, 2005). Ở Mỹ Năm 2007, 178.480 trường hợp mới được xác định mắc bệnh UTV trong đó 40.460 trường hợp tử vong (American cancer society, statistics 2007)

Việc đặt tên các loại ung thư dựa trên những cơ quan bị tác động bởi khối u như: ung thư phổi, ung thư xương, ung thư máu, UTV v.v. Chúng có thể được phân loại dựa trên nguồn gốc phát sinh bệnh (Hanahan & Weinberg, 2000) và được chia thành 4 nhóm cơ bản sau:

1. **Carcinoma** (nguồn gốc từ biểu bì): là loại ung thư khá phổ biến, xuất phát từ những tế bào có nguồn gốc biểu bì (ephithelial cell) như ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến tiền liệt…
2. **Sarcoma**: là ung thư xuất phát từ những mô liên kết hoặc tế bào trung mô như, ung thư xương, sụn hay các mô liên kết.

3. **Lymphoma**: là dạng ung thư tương đối hiếm, thường xuất phát từ các tế bào thuộc hạch bạch huyết và các mô thuộc hệ thống miễn dịch như bệnh ung thư Lymphoma Burkitt.
4. **Leukemia**: là loại ung thư nguy hiểm biểu hiện ở cả trẻ em nhưng phổ biến ở người trên 50 tuổi, xuất phát từ các tế bào tạo máu.

Ung thư vú (UTV) có thể được phân loại bằng nhiều cách, phụ thuộc vào các đặc tính, giai đoạn phát triển khác nhau của bệnh (Đái Duy Ban, 2006):

Theo bệnh học (pathology): sự phân loại dựa trên sự biểu hiện về mô học. Bao gồm: ung thư xâm lấn ống biểu mô (invasive ductal carcinoma), hình thành khối u ác tính ở các ống của tuyến vú (breast's ducts), sự xâm lấn các thùy vú (lobular carcinoma) và ung thư ác tính các thùy vú.

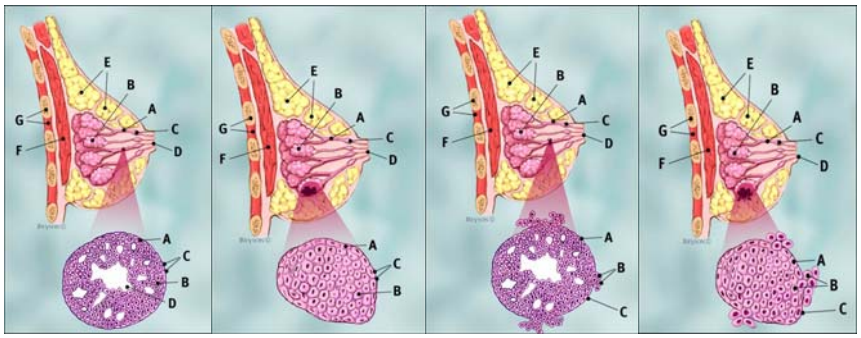
Theo mức độ phát triển của khối u (grade of tumor): Phương pháp này được xác định dựa trên các cấp độ mô học của khối u dưới kính hiển vi: giai đoạn nhẹ (low grade-sự sai khác ít giữa tế bào bình thường với tế bào thư), giai đoạn nặng (high grade-có khối u khác biệt so với mô bình thường do tế bào bị rối loạn chức năng), và giai đoạn vừa (intermediate grade-nằm trong khoảng hai mức biểu hiện trên).

Theo sự biểu hiện của gen và protein: Tất cả các dạng của UTV có thể kiểm tra sự biểu hiện hoặc những ảnh hưởng có thể nhận biết của ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor) và protein HER2/neu. Hiện nay có nhiều gen hoặc protein đã và đang được nghiên cứu như các dấu hiệu chuẩn (marker) dùng cho chẩn đoán bệnh UTV.

Theo các giai đoạn của khối u: Đây là hệ thống phân loại miêu tả sự phát triển của khối u trong cơ thể bệnh nhân. Trong đó, T (tumor) miêu tả kích thước của khối u, N (lymph nodes) miêu tả các hạt lympho có liên quan và M (metastatic) dùng để miêu tả sự di căn. Hệ thống phân loại này được xây dựng và phát triển bởi UICC (International Union Against Cancer), nó cũng được AJCC (American Joint Committee on Cancer) sử dụng và được thống nhất

thành một hệ thống phân loại với UICC vào năm 1987. Trong đó các đặc tính trên lại có các cấp độ phân loại nhỏ hơn như sau: (**i**) Có 5 mức phân loại khối u (Tis, T1, T2, T3, và T4). Điểm khác nhau ở các cấp độ phụ thuộc vào sự có mặt hoặc không của việc xâm lấn, hướng xâm lấn, và sự xâm lấn ra các cơ quan bên ngoài vú (như phần da của vú, cơ hay dưới lồng ngực); (**ii**) Có 4 mức độ phân loại dựa trên hạt lympho (N0, N1, N2 và N3), dựa vào số lượng, kích cỡ và vị trí của tế bào ung thư vú có mặt trong hạt lympho; (**iii**) Có 2 mức phân loại dựa trên sự di căn (M0 và M1), dựa trên sự có hay không có mặt của các tế bào UTV ngoài các vị trí ở vú.

Một trong các hệ thống phân loại phổ biến hiện nay là hệ thống phân loại của Tổ chức Y tế thế giới WHO. Hệ thống này phân loại UTV thành 4 kiểu chính (hình 3.1): (1) Ung thư không xâm lấn (tại chỗ) gồm có ung thư ống tuyến tại chỗ và ung thư tiểu thùy tại chỗ; (2) Ung thư thâm nhiễm gồm có ung thư ống tuyến thâm nhiễm và ung thư tiểu thùy thâm nhiễm; (3) Ung thư viêm nhiễm; (4) Bệnh paget núm vú.



Hình 3.1. Các dạng ung thư vú thường gặp

I-ung thư ống tuyến tại chỗ; II- ung thư tiểu thùy tại chỗ; III- ung thư ống tuyến thâm nhiễm; IV- ung thư tiểu thùy thâm nhiễm. Trong đó: ở hình ảnh tuyến vú: A: ống tuyến; B: tiểu thuỳ; C: vùng giãn nở của ống tuyến để giữ sữa; D: núm vú; E: mô mỡ; F: cơ ngực; G: thành ngực, ở hình phóng to: A: tế bào ống/tiểu thuỳ bình thường; B: tế bào ống/tiểu thuỳ ung thư; C: màng rìa; D: lõi ống

3.1.2. Ung thư vú liên quan tới sự biểu hiện mạnh HER2

Thụ thể của yếu tố phát triển biểu mô gồm 4 loại: EGFR hay HER-1, HER-2, HER-3 và HER-4 (Human Epidermal growth factor Receptor). Trong đó được biết đến và được nghiên cứu nhiều nhất là HER-2. Gen quy định thụ thể này nằm trên nhánh q của NST 17, mã hóa một thụ thể có chứa tyrosine kinase xuyên màng.

HER2 [*HER2*- Human epidermal growth factor receptor (EGFR) 2] là thành viên của họ thụ thể phát triển biểu mô hay còn được biết tới như họ protein ErbB. Chức năng của HER2 liên quan tới con đường dẫn truyền tín hiệu qui định sự phát triển và biệt hóa của tế bào. Gen *HER-2/neu* được nghiên cứu phát hiện ra với tên *HER-2* và *c-erbB-eerG* bởi hai nhóm độc lập vào năm 1985 (Coussens et al., 1985; Semba et al., 1985). Tuy nhiên các nghiên cứu sau đó cho thấy hai gen này hoàn toàn giống nhau và thống nhất đặt tên gọi *HER-2/neu (HER2).* Đến năm 1987, *HER2* được xem như một gen tiền ung thư và sự biểu hiện quá mức của nó gây ra bệnh UTV ở người (Slamon et al., 1987).

Sau khi HER2 được phát hiện (1985) thì lần lượt sau đó các nhóm khác trong họ HER cũng dần được phát hiện vào các năm 1989, 1993 và 2002. Cho đến nay họ HER bao gồm 4 nhóm là HER1 (EGFR, erbB1), HER2 (erbB2, HER2/neu), HER3 (erbB3) và HER4 (erbB4). (Kraus, 1989; Manning, 2002; Plowman, 1993).

Cấu trúc của thụ thể HER bao gồm 3 vùng: vùng gắn với ligand ngoại bào, vùng chuyển màng và vùng tyrosine kinase nội bào. Đây là loại thụ thể, mà tương tác giữa thụ thể với ligand dẫn tới việc tạo dimer với thụ thể (có thể là dimer đồng hình hoặc dimer dị hình). Sự thay đổi cấu trúc của thụ thể sẽ hoạt hóa tyrosine kinase nội bào thông qua một số chất chuyển tải trung gian và cuối cùng là đến các yếu tố phiên mã (TF-Transcription Factors). Các yếu

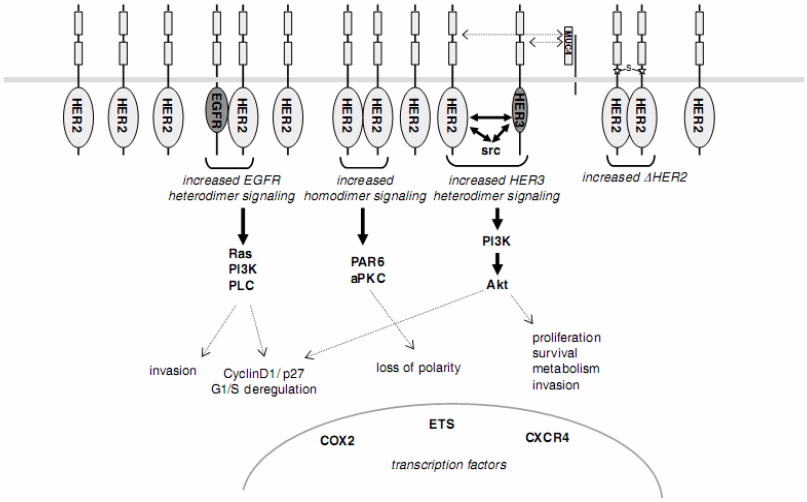
tố đó sẽ điều khiển mức độ biểu hiện của gen tùy thuộc vào độ mạnh hay yếu của tín hiệu. Bất kỳ một đột biến nào liên quan đến việc tạo ra sản phẩm protein có hoạt tính không bình thường trong con đường dẫn truyền tín hiệu đều có thể khởi động quá trình hình thành ung thư.

Ung thư vú không phải là một bệnh đơn lẻ mà là tập hợp của các phân nhóm (subtypes) nhỏ. Mỗi phân nhóm có một tiền sử bệnh và hướng điều trị khác nhau. Vùng nội bào tyrosine kinase của HER2 đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều khiển các đặc tính vật lý, sự phát triển và sự biệt hóa của tế bào. Phần ngoài của HER2 liên kết với các thành viên khác của họ HER tạo nên các coreceptor. Tuy nhiên, nhiều giả thuyết cho rằng HER2 có vai trò chủ đạo trong việc điều chỉnh tín hiệu sau khi ligand gắn vào các coreceptor (Burstein, 2005; Tracy & Jeffrey, 2007).

Sự biểu hiện quá mức của HER2 là tác nhân làm tăng dimer hóa giữa HER2 với chính nó và các thụ thể khác (HER1, HER3). Đấy cũng là những tín hiệu khởi đầu cho các con đường sinh ung thư khác nhau. Tuy nhiên mối liên quan giữa các con đường đó là rất khó để có thể xác định. Dưới đây là một đề xuất của Moasser về con đường sinh ung thư do sự biểu hiện quá mức của HER2 (hình 3.2.).

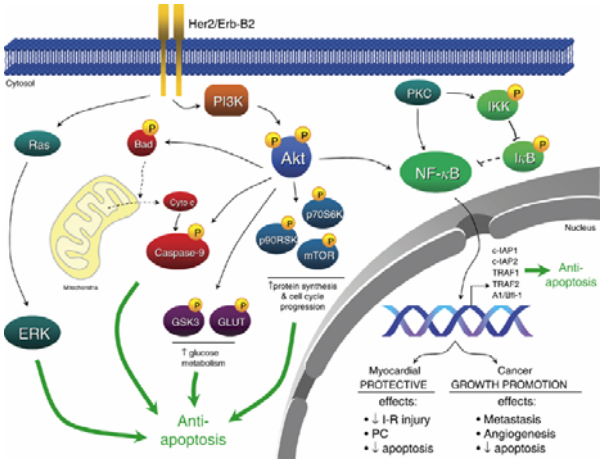
Feldman và cs (Feldman, Koch & Force, 2007) đã đưa ra mô hình về con đường truyền tín hiệu của những thụ thể hoạt động này. Ở trạng thái hoạt động nó kích thích con đường truyền tín hiệu phos-phatidyl inositol 3′-kinase (PI3K) thông qua việc gắn tiểu phần p85 vào Akt, dẫn tới hoạt hóa Akt. Akt làm bất hoạt các phân tử tiền apoptosis bao gồm Bad, caspase-9, và p53 (sơ đồ trên hình 3.3.). Thêm vào đó, dưới tác động của Akt, các hoạt động chuyển hóa glucose, các kênh vận chuyển glucose (GLUT) (nhờ sự phosphoryl GSK3) và sự tổng hợp protein, chu trình phát triển của tế bào (thông qua sự phosphoryl hóa của protein p90RSK, p70S6K, mTOR) đều tăng lên là những nhân tố ngăn chặn quá trình apoptosis. Hơn thế nữa, sự hoạt hóa các yếu tố

phiên mã κB (nuclear factor κB) còn kích ứng sự biểu hiện của các gen antiapoptosis thông qua các protein c-IAP1-2, TRAP 1-2, và A1/Bfl-1. Kết quả của sự tăng sinh này cũng là một trong những nguyên nhân dẫn tới quá trình hình thành ung thư (Liang, 2002; Shin, 2002; Viglietto, 2002).



Hình 3.2. *Sự bất thường trong việc truyền tín hiệu do sự biểu hiện quá mức của HER2. Sự biểu hiện quá mức là nguyên nhân của sự tăng dimer hóa. Tăng dimer HER2-EGFR dẫn tới sự tăng sinh và sự xâm lấn của tế bào. Sự tăng dimer hóa đồng hình HER2 làm mất tính phân cực của tế bào. Sự tăng dimer HER2-HER3 có ảnh hưởng tới sự tăng sinh, khả năng tồn tại, tính xâm lấn và chức năng trao đổi chất của tế bào. Tăng sự biểu hiện quá mức của HER2 làm tăng isoform hiếm ΔHER2 dẫn tới tăng cường độ truyền tín hiệu. Một vài yếu tố phiên mã được cảm ứng trong những tế bào có sự biểu hiện quá mức HER2 là kết quả của những sự thay đổi biểu hiện gen ở mức dư thừa (Moasser, 2007).*

Các nghiên cứu thống kê cho thấy có khoảng 25-30% bệnh nhân ung thư vú có sự khuếch đại gen Her2/neu hoặc biểu hiện quá mức gen này trong các tế bào ung thư. Đặc tính này làm cho Her2/neu trở thành một marker hữu hiệu để chẩn đoán sớm cũng như đích tấn công của liệu pháp điều trị mới, liệu pháp điều trị miễn dịch.



Hình 3.3. Cơ chế gây ung thư của HER2 (Feldman et al., 2007)

3.1.3. Kết quả thu nhận kháng nguyên HER2

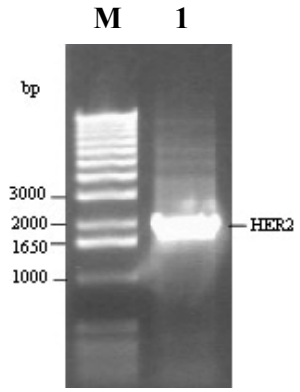
3.1.3.1. Kết quả tách dòng gen mã hóa kháng nguyên HER2

Đoạn gen *HER2* được khuếch đại bằng cặp mồi HER2R và HER2F từ gen RNA tổng số sau khi đã tổng hợp cDNA bằng phản ứng RT-PCR. Cặp mồi được thiết kế để khuếch đại đoạn gen *HER2* mã hóa cho phần thụ thể ngoại bào của HER2. Mồi HER2F bao gồm 30 nucleotide, được thiết kế thêm trình tự nhận biết của enzyme *Nde*I và bộ ba mã khởi đầu ATG. Mồi HER2R có 25 nucleotide, được thiết kế thêm trình tự nhận biết của enzyme *Xho*I. Theo tính toán đoạn gen *HER2* được nhân bản có chiều dài ~1,9 Kb. Sản phẩm RT-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agrose 1% (hình 3.4).

Trên ảnh điện di cho thấy, sản phẩm RT-PCR ở đường chạy số 1 xuất hiện một băng sáng đậm, rõ nét và so với thang DNA chuẩn thì có kích thước khoảng 1900 bp. Kết quả này phù hợp với kích thước của đoạn gen HER2 theo tính toán lý thuyết.

Như vậy, có thể chúng tôi đã nhân bản được đoạn gen HER2 mã hoá cho một phần thụ thể phát triển biểu mô ở người. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn chúng tôi tiến hành tách dòng, xác định trình tự đoạn DNA được khuếch

đại và so sánh sự sai khác với trình tự gen cùng loại đã công bố trong Ngân hàng dữ liệu gen quốc tế.



Hình 3.4. Điện di đồ kết quả RT-PCR

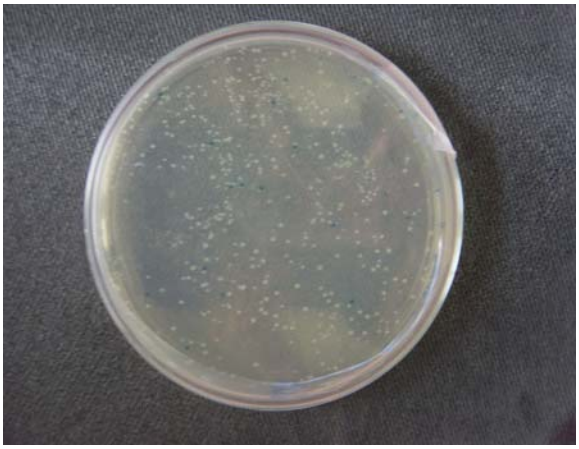
M: Thang marker DNA 1Kbp (Fermentas)

1: Sản phẩm RT-PCR đoạn gen *HER2*

Đoạn DNA của gen mã hoá cho phần thụ thể ngoài màng của HER2 được nhân dòng bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vector tách dòng pTZ57R/T của hãng Fermentas bằng enzyme nối T4-DNA ligase. Mẫu được ủ ở 22°C trong 16 giờ. Vector tái tổ hợp mong muốn sẽ là vector gắn với sản phẩm RT-PCR mang đoạn gen mã hóa cho phần thụ thể ngoài màng của HER2. Hỗn hợp ghép nối (ligation) được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5α. Tiếp đó tiến hành chọn lọc, tách chiết DNA plasmid để chọn những dòng vector tái tổ hợp mang đoạn gen mong muốn.

pTZ57R/T là vector tách dòng có độ dài 2886 bp, có số lượng bản sao lớn khi được biến nạp vào tế bào *E. coli*. Ngoài ra trên vector tách dòng này, ở vùng đa vị cắt còn có trình tự gen *lacZ*, mã hóa cho enzyme β-Galactosidase. Do đó những plasmid đã được gắn đoạn gen ngoại lai vào thì sẽ làm thay đổi cấu trúc và làm bất hoạt gen tạo β-Galactosidase. Do vậy, những vi khuẩn không chứa plasmid tái tổ hợp (chỉ chứa plasmid pTZ57R/T tự đóng vòng) sẽ có gen *lacZ* hoàn chỉnh, nên trong môi trường có chất cảm ứng IPTG thì enzyme β-Galactosidase sẽ được tổng hợp. Enzyme này sẽ phân huỷ cơ chất X-gal thành dẫn xuất indol, một dẫn xuất khi ở ngoài môi trường sẽ bị oxi-hoá cho màu xanh. Vì vậy, các khuẩn lạc xanh là những vi khuẩn không mang

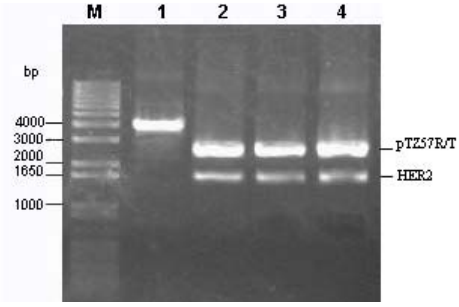
vector tái tổ hợp. Nếu sản phẩm PCR gắn được vào vector tách dòng thì nó sẽ gắn xen vào vị trí giữa gen *lacZ* và làm bất hoạt gen này. Do đó, enzyme β-Galactosidase sẽ không được tạo ra, X-gal trong môi trường sẽ không bị phân huỷ và sẽ không tạo nên dẫn xuất indol. Khuẩn lạc hình thành sẽ có màu trắng. Tuy nhiên không phải tất cả các khuẩn lạc trắng đều mang vector tái tổ hợp mang đoạn gen mong muốn. Chính vì vậy, chúng tôi đã chọn nhẫu nhiên một số khuẩn lạc từ đĩa nuôi cấy kiểm tra biến nạp (hình 3.5) để kiểm tra nuôi cấy, tách plasmid, cắt kiểm tra bằng các enzyme giới hạn để xác định dòng có mang đoạn gen *HER2*.



Hình 3.5. Kết quả biến nạp vector pTZ57R/T-HER2 vào *E. coli* DH5α

3.1.3.2. Tách chiết DNA plasmid và các định trình tự ncleotide gen *HER2*

Chọn 4 khuẩn lạc trắng và 1 khuẩn lạc xanh để nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicillin (100 µg/ml). Các khuẩn lạc được nuôi cấy qua đêm trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Tách chiết DNA plasmid và khi xử lý với enzyme *Eco*RI và *Bam*HI thì đoạn DNA ngoại lai sẽ được cắt rời khỏi plasmid với kích thước tương ứng với kích thước đoạn gen *HER2* đã nhận được bằng RT-PCR. Kết quả cắt enzyme được kiểm tra trên gel agrose 1% (hình 3.6).



Hình 3.6. Điện di đồ sản phẩm cắt bằng *Eco*RI và *Bam*HI

M: *Thang marker DNA 1Kbp (Fermentas)*

1-4: *Sản phẩm cắt plasmid của các dòng khuẩn lạc trắng*

Trên hình 3.6, các mẫu DNA plasmid tách từ các khuẩn lạc trắng sau khi xử lý bằng enzyme *Eco*RI và *Bam*HI đều xuất hiện 2 băng. Một băng có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR (~1900bp) và băng còn lại có kích thước tương ứng với vector pTZ57R/T (~2886bp). Như vậy, sản phẩm PCR đã được gắn vào vector pTZ57R/T ở các dòng đã kiểm tra 2, 3, 4. Trong khi ở giếng số 1 chỉ xuất hiện một băng có kích thước khoảng 4000 bp, đây không phải là kích thước của vector tái tổ hợp mong muốn. Chúng tôi tiến hành xác định trình tự nucleotide của đoạn DNA ở dòng plasmid ở đường chạy số 2. Kết quả xác định trình tự nucleotide gen *HER2* và so sánh với các trình tự đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế (**Phụ lục 1**) đã khẳng định việc tách dòng đoạn gen mã hóa vùng ngoại bào của thụ thể HER2 thành công.

3.1.3.3. Kết quả thiết kế vector biểu hiện kháng nguyên HER2

Vector pET-22b(+) được chọn làm hệ vector biểu hiện gen mã hóa vùng ngoại bào của HER2. Cả vector pET-22b(+) và pTZ57R/T-HER2 đều được cắt bởi *Nde*I và *Xho*I để tạo các đầu dính sole tương thích. Qui trình tạo vector tái tổ hợp có chứa đoạn gen *HER2* được tiến hành theo 4 bước sau:

(1) Nhân dòng vector pET-22b(+) trong tế bào *E. coli* DH5α.

(2) Cắt plasmid pET-22b(+) và pTZ57R/T-HER2 bằng enzyme *Nde*I và *Xho*I. Kiểm tra sản phẩm cắt bằng điện di trên gel agarose 0,8%. Sau đó đoạn gen *HER2* và đoạn vector pET-22b(+) mở vòng được tinh sạch bằng kit thôi gel của hãng Qiagen.

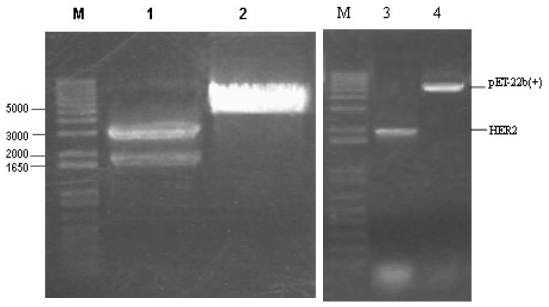
(3) Ghép nối đoạn gen *HER2* vào vector pET-22b(+) mở vòng nhờ sự hỗ trợ của enzyme ghép nối T4-DNA ligase. Tiếp đó vector tái tổ hợp được biến nạp vào chủng tế bào trung gian *E. coli* DH5α để nhân lượng lớn.

(4) Kiểm tra kết quả tạo vector biểu hiện gen *HER2* bằng các enzyme giới hạn và xác định trình tự để khẳng định chiều, khung đọc theo thiết kế. Biến nạp vector biểu hiện vào chủng vi khuẩn biểu hiện *E. coli* BL21.

Đoạn gen *HER2* từ vector tái tổ hợp pTZ57R/T và pET-22b(+) được cắt đồng thời bởi *Nde*I và *Xho*I. Hỗn hợp phản ứng cắt (các thành phần được nêu ở bảng 3.1) được ủ ở 37°C trong thời gian 4 giờ. Kết quả được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%, đoạn gen và vector mở vòng được thu hồi bằng phương pháp thôi gel theo kit của QIAGEN (hình 3.7.).

Bảng 3.1. Thành phần phản ứng cắt pET-22b(+) và pTZ57R/T-HER2

Thành phần	Thể tích (µl)
H_2O	7,5
*Nde*I	0,5
*Xho*I	0,5
Buffer II	1,5
Plasmid	5,0
Tổng thể tích	**15**



Hình 3.7. Kết quả thu nhận gen HER2 và vector pET-22b(+)

M: Thang marker DNA 1kbp (Fermentas)

1-2: Sản phẩm cắt pTZ57R/T-HER2 và pET-22b(+) bằng XhoI và NdeI

3-4: Sản phẩm tinh sạch đoạn gen HER2 và pET-22b(+) mở vòng

Trên điện di đồ cho thấy đoạn gen *HER2* (~1900 bp) và vector pET-22b(+) mở vòng (~5500 bp) đã được thu hồi đạt nồng độ và độ tinh sạch cần thiết cho phản ứng ghép nối để tạo vector tái tổ hợp pET-22b(+)-HER2. Thành phần phản ứng ghép nối được trình bày ở bảng 3.2.

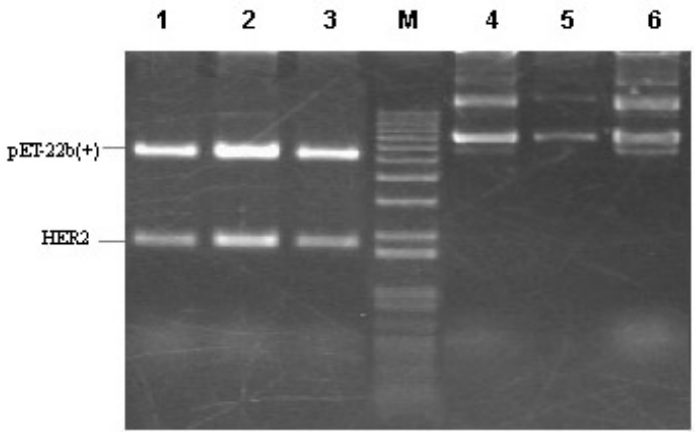
Bảng 3.2. Thành phần phản ứng ghép nối gen (ligation)

Thành phần	Thể tích (µl)
H_2O	6.5
T4 DNA ligase	0,6
Buffer	1,0
HER2	3,0
pET-22b(+) mở	1,5
Tổng thể tích	10

Phản ứng được tiến hành ở 16°C trong 18 giờ. Sau đó hỗn hợp phản ứng được giữ ở 4°C và được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 40 giây. Tế bào được cấy trải trên môi trường LB có ampicillin và nuôi ở 37°C trong 24 giờ.

Chọn 3 dòng khuẩn lạc, tiến hành hoạt hóa qua đêm trong 2 ml môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin 100 µg/ml ở 37°C trong điều kiện lắc 200v/ph. Tách plasmid bằng kit của Bioneer và cắt kiểm tra plasmid thu được bằng hai enzyme giới hạn *Xho*I và *Nde*I. Kết quả được thể hiện bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 3.8).

Trên điện di đồ cho thấy sản phẩm cắt (giếng 1-3) bằng 2 enzyme giới hạn *Xho*I và *Nde*I đã thu được hai băng có kích thước tương ứng với kích thước của đoạn gen *HER2* (~1900bp) và pET-22b(+) (~5500bp). Như vậy, có thể khẳng định vector tái tổ hợp đã được biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* DH5α.



Hình 3.8. Kết quả gắn đoạn gen HER2 vào vector biểu hiện pET-22b(+)

M: Thang marker DNA 1kbp (Fermentas)

1-3: Sản phẩm cắt bằng *Xho*I và *Nde*I của 3 dòng plasmid 4-6

4-6: 3 dòng plasmid được chọn ngẫu nhiên sau khi biến nạp

Để khẳng định đoạn gen *HER2* đã được đưa vào vector biểu hiện pET-22b(+) đúng khung đọc, không xuất hiện lỗi trong khi sao chép của DNA, chúng tôi đã tinh sạch và xác định trình tự nucleotide đoạn gen của vector biểu hiện pET-22b(+) chứa đoạn gen *HER2*. Trình tự nhận được, sau khi xử lý bằng phần mềm Bioedit và Gendoc thể hiện đúng với những tính toán lý thuyết. Như vậy, vector tái tổ hợp pET-22b(+)-HER2 hoàn toàn có đủ khả năng để biểu hiện trong tế bào *E. coli*.

3.1.3.4. Kết quả biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên HER2

Khi so sánh trình tự amino acid của đoạn protein HER2 đã tách dòng với các trình tự acid amin trên ngân hàng gen (**phụ lục 1**) cho thấy: đoạn protein nghiên cứu có trình tự tương đồng cao với các đoạn trình tự HER2 được phân lập từ người ở Nhật Bản (BAG59464, BAG58195), ở Mỹ (AAX40997, AA75493.1) và Thổ Nhĩ Kỳ (NM 004448)... Điều đó chứng tỏ ở cấp độ

protein HER2 cũng có độ bảo thủ cao giữa các mẫu ở các vùng khác nhau trên thế giới.

Chủng *E. coli* BL21 DE3(star) được lựa chọn là vật chủ dùng để biểu hiện vector tái tổ hợp có mang gen *HER2*. Đây là chủng được hãng Invitrogen thiết kế với nhiều ưu điểm trong cấu trúc di truyền giúp tăng mức độ biểu hiện của các protein không độc

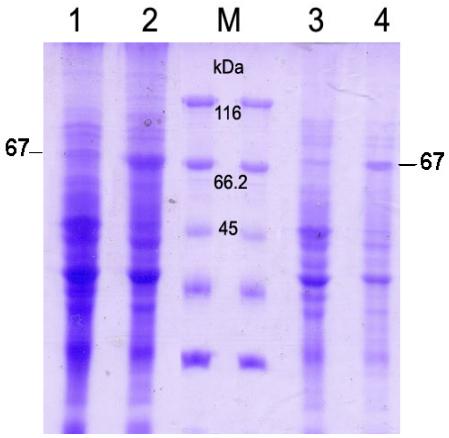
Sau khi biến nạp vector tái tổ hợp có mang đoạn gen *HER2* vào tế bào *E. coli* BL21 DE3(star) bằng phương pháp sốc nhiệt. Cấy trải sản phẩm biến nạp trên môi trường LB có chọn lọc ampicillin 100 µg/ml.

Chọn một khuẩn lạc riêng rẽ hoạt hoá qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicillin (100µg/ml) ở 37°C điều kiện lắc 200v/ph. Sau đó dịch nuôi cấy được chuyển sang môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicillin (1/10 thể tích) và nuôi lắc tiếp cho đến khi OD_{600} đạt 0,8 (khoảng 3 h). Một phần dịch nuôi được thu để làm mẫu trước cảm ứng, lượng dịch nuôi còn lại sẽ được cảm ứng với IPTG (nồng độ cuối cùng của IPTG đạt từ 0,5 mM đến 1 mM). Kết quả điện di cho thấy, không có sự khác biệt nào đáng kể ở mẫu cảm ứng và mẫu không cảm ứng (ở cả hai nồng độ IPTG 0,5 và 1 mM), cũng như không thấy xuất hiện băng có kích thước khoảng 67 kDa như đã dự đoán.

Tiếp theo chúng tôi thay đổi điều kiện biểu hiện bằng cách kéo dài thời gian biểu hiện lên 18 giờ, đồng thời giảm nhiệt độ nuôi cấy xuống còn 28°C. Cặn tế bào được loại bỏ bằng ly tâm ở 5000 v/ph trong 5 phút. Đây là tốc độ giúp việc thu hồi được gần như toàn bộ protein tổng số của tế bào ở phần dịch nổi đồng thời loại bỏ được các thành phần tạp lẫn như xác tế bào v.v.

Kết quả điện di trên gel polyacrylamide cho thấy, có xuất hiện 1 băng protein có kích thước khoảng 67 kDa (giếng 1-2, hình 3.9) khi được cảm ứng bởi IPTG 0,5 mM. Cùng mẫu nghiên cứu đó, nhưng chúng được thu hồi bằng ly tâm ở tốc độ 12000 v/ph trong 5 phút. Ở tốc độ ly tâm này thì hầu như còn

lại ở phần dịch nổi là các protein hòa tan. Trên điện di đồ hình 3.9 ở đường chạy số 3-4 cho thấy hầu hết protein biểu hiện tồn tại dưới dạng hòa tan.



Hình 3.9. Kết quả biểu hiện gen *HER2* trong *E. Coli* BL21 DE3(star)

M: Thang marker protein (Fermentas)

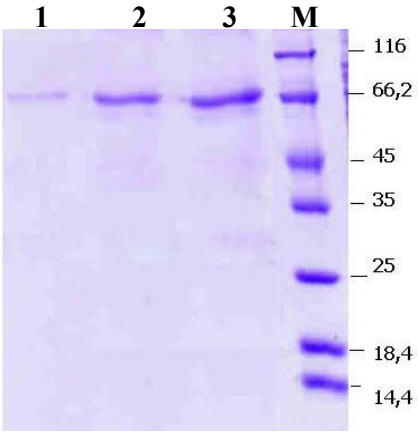
1-2: Protein tổng số sau khi xử lý và ly tâm 5000 v/5 phút

3-4: Protein tổng số sau khi xử lý và ly tâm 12000 v/5 phút

Từ kết quả đó có thể thấy rằng đoạn protein mã hóa cho phần ngoại bào của thụ thể phát triển biểu mô HER2 đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 DE3(star). Do protein tái tổ hợp có đuôi ái lực 6-Histidin, nên các protein tái tổ hợp có khả năng liên kết với ion Ni^{2+} trên cột sắc ký ái lực ion. Dịch tế bào biểu hiện được nuôi với lượng 50 ml, cảm ứng bằng IPTG với nồng độ cuối cùng 0,5 mM trong thời gian 18 tiếng. Sau khi ly tâm, cặn tế bào được hòa lại trong 8ml dịch phá (Lysis Buffer) và được siêu âm trong thời gian 5 phút. Dịch phá tế bào được ly tâm, phần địch nổi có chứa protein tái tổ hợp được đưa lên cột. Các protein có đuôi His-Tag có ái lực với Ni^{2+} và được bám chặt chất giá trên cột. Sau khi rửa cột bằng đệm rửa (Wash Buffer) Các protein của *E. coli* không có hoặc có ít gốc histidine liên tục nhau sẽ bị trôi khỏi cột chỉ còn lại các protein có ái lực cao với Ni^{2+} được giữ lại. Sau đó

protein gắn trên cột sẽ được loại ra khỏi cột nhờ Elution Buffer, chúng tôi thu 3 phân đoạn, mỗi phân đoạn 1ml.

Sau khi tinh chế protein được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,5% (hình 3.10). Kết quả trên điện di đồ thu được 1 băng protein đặc hiệu có kích thước ~67kDa, chứng tỏ protein tái tổ hợp của HER2 đã đươc tinh sạch thành công.

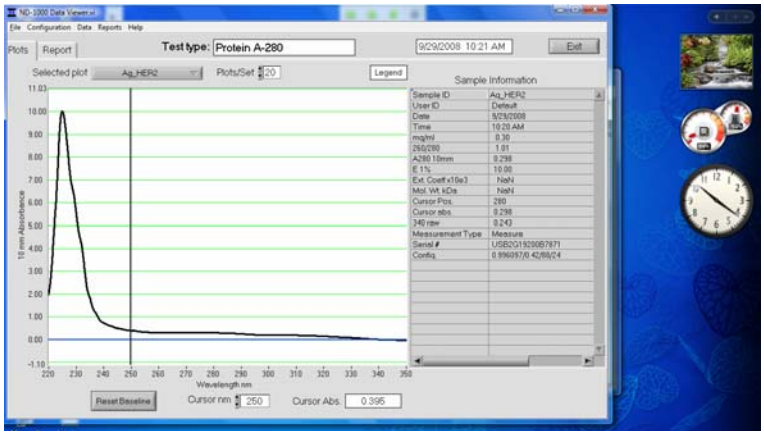


Hình 3.10. Tinh chế protein HER2 tái tổ hợp bằng cột sắc ký ái lực Ni2+.

M: Thang marker protein chuẩn.

1-3: Các phân đoạn sắc ký khác nhau.

Sau khi tinh sạch mẫu protein được xác định nồng độ bằng máy NanoDrop-1000 (hình 3.11). Kết quả nhận được lượng kháng nguyên tinh sạch ở phân đoạn 1 là 0,3 mg/ml, ở phân đoạn 2 là 3 mg/ml, và phân đoạn 3 là 7 mg/ml.



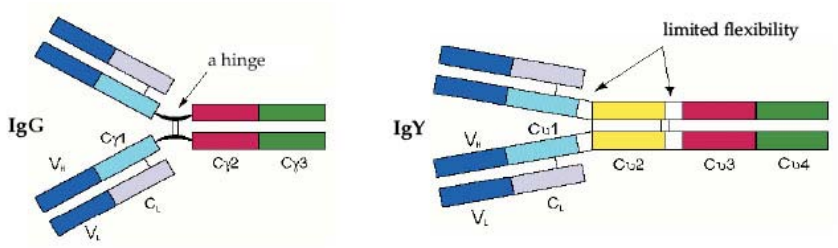
Hình 3.11. Kết quả đo nồng độ kháng nguyên HER2 (phân đoạn 1) bằng máy đo phổ Nanodrop-1000

3.1.3.5. Kết luận về tách dòng gen mã hóa kháng nguyên HER2

1. Đã tách dòng thành công đoạn gen mã hóa vùng ngoại bào của thụ thể HER2. Đây là đoạn thụ thể có tính bảo thủ cao về trình tự nucleotide nên có sự bảo thủ cao về trình tự amino axit giữa các vùng khác nhau trên thế giới.
2. Đã thiết kế thành công vector biểu hiện đoạn gen (1905 bp) mã hóa vùng ngoại bào của kháng nguyên HER2 trên cơ sở vector biểu hiện pET-22b(+).
3. Gen mã hóa kháng nguyên HER2 tái tổ hợp được biểu hiện thành công trong hệ biểu hiện prokaryote trong điều kiện ở 28°C, nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0,5 mM trong 18 giờ.
4. Tinh chế được protein tái tổ hợp bằng cột tinh sạch Ni^{2+} (Invitrogen) và có nồng độ trung bình các phân đoạn sau tinh sạch là 3,4 mg/ml.

3.1.4. Kết quả gây miễn dịch động vật thí nghiệm bằng HER2

Do kháng nguyên HER2 có bản chất từ người do vậy chúng tôi chọn gà là động vật thí nghiệm để gây miễn dịch. Như chúng ta đã biết, trong quá trình tiến hóa, các protein của động vật có vú thường có tính bảo thủ cao, do vậy khi sử dụng gà để gây miễn dịch chúng tôi hy vọng rằng phản ứng đáp ứng miễn dịch sẽ mạnh hơn nếu gây miễn dịch ở chuột hoặc ở thỏ. Hơn nữa, phân tử kháng thể của gà IgY có cấu trúc và tính chất giống với IgG ở người (hình 3.12) (Narat, 2003).



Hình 3.12. Sơ đồ cấu trúc của kháng thể người (IgG) và kháng thể gà IgY)

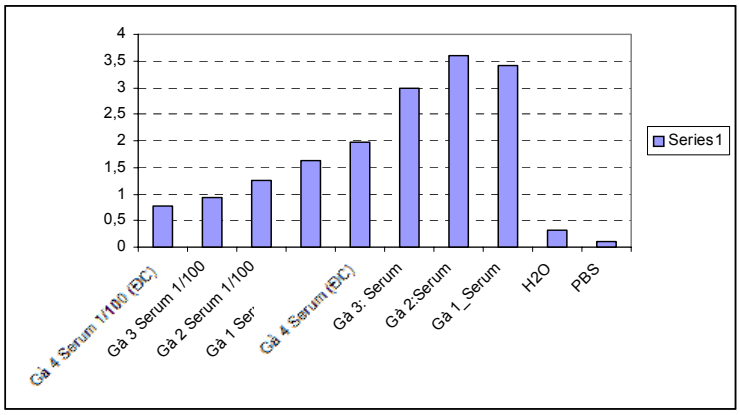
Quy trình gây miễn dịch ở gà được tiến hành như sau: 3 con gà được gây miễn dịch theo phương pháp của Nader S. và William A.F., (1998) với kháng nguyên tái tổ hợp HER2. Kháng nguyên HER2 đã tinh sạch được trộn với tá dược (lần đầu dung dịch kháng nguyên được trộn với complete Freund's adjuvant, các lần sau với incomplete Freund's adjuvant theo tỉ lệ 1:1). Tiêm dưới da 4 lần, cách nhau 1 tuần. Trước khi lấy tuỷ và lách tách RNA, các mẫu huyết thanh gà được kiểm tra đáp ứng miễn dịch bằng kỹ thuật ELISA.

Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà đã gây miễn dịch với quyết định kháng nguyên HER2 được trình bày trên hình 3.13 và bảng 3.3.

Kết quả ELISA cho thấy: gà được gây miễn dịch có đáp ứng miễn dịch tốt đối với kháng nguyên HER2. Tuy nhiên, mức độ đáp ứng miễn dịch ở các cá thể là không giống nhau. Để thu nhận được sự da dạng các đoạn gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể gà đã gây miễn dịch chúng tôi sử dụng tủy xương của cả 3 con gà đã gây miễn dịch với HER2 để tách chiết RNA tổng số và nhân bản gen mã hóa vùng biến đổi, V_H và V_L.

Bảng 3.3. Kết quả ELISA huyết thanh gà trước khi gây miễn dịch lần thứ 4

TT	Mẫu và độ pha loãng	OD $_{450nm-650nm}$
1	Con 4: Huyết thanh 1/100 (gà không gây miễn dịch)	0,774
2	Con 3 Huyết thanh pha loãng (1/100)	0,937
3	Con 2 huyết thanh pha loãng (1/100)	1,258
4	Con 1: Huyết thanh pha loãng (1/100)	1,634
5	Con 4: Huyết thanh (gà không gây miễn dịch)	1,964
6	Con 3: Huyết thanh (không pha loãng)	2,984
7	Con 2:Huyết thanh (không pha loãng)	3,599
8	Con 1: Huyết thanh (không pha loãng)	3,426
9	H2O	0,331
10	PBS	0,105



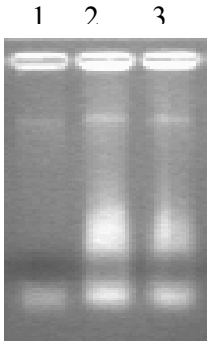
Hình 3.13. Kết quả ELISA mẫu huyết thanh gà trước khi gây miễn dịch lần thứ 4

3.1.5. Kết quả thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2

Kháng thể đặc hiệu HER2 được thu nhận theo hai hướng: (1) Tạo gen mã hóa kháng thể scFv đặc hiệu HER2 từ tủy xương gà đã gây miễn dịch với HER2 nhằm phục vụ cho việc tạo KIT chẩn đoán. (2) Tạo kháng thể dạng ghép đặc hiệu HER2 phục vụ cho việc bào chế thuốc điều trị từ thư viện Griffin.1 (Human Synthetic VH + VL scFv Library) do Trung tâm Công nghệ protein của Vương Quốc Anh cung cấp.

3.1.5.1. Kết quả thu nhận gen mã hóa scFv từ gà đặc hiệu HER2

Kết quả tách RNA từ tủy xương gà gây miễn dịch HER2 được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 3.14).

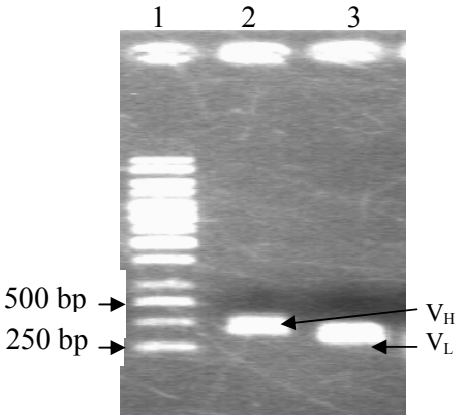


Hình 3.14. Kết quả tách RNA tổng số từ tủy xương gà đã gây miễn dịch với HER2

1, 2, 3: RNA tổng số tách từ tủy xương của các con gà đã gây miễn dịch khác nhau

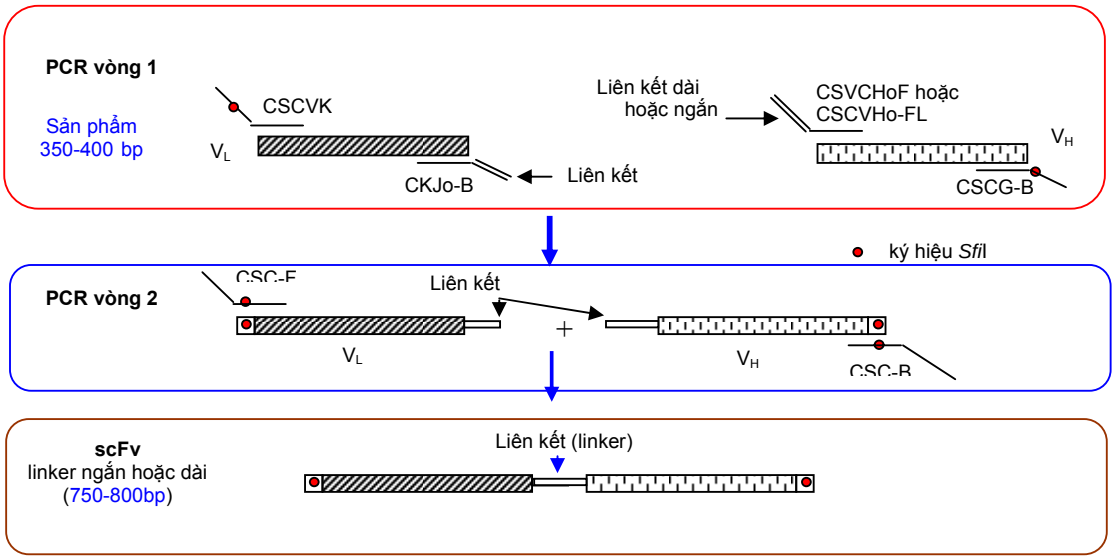
Kết quả điện di (hình 3.14) cho thấy RNA tổng số tách được có thể sử dụng để tiến hành các phản ứng cDNA và các phản ứng tiếp theo.

Sử dụng 20 µg RNA với primer oligo (dT) để tạo cDNA. Mỗi phản ứng PCR để nhân bản gen chuỗi nặng (V_H) và chuỗi nhẹ (V_L) được thực hiện với 1 µg cDNA đã tạo ra. Phản ứng PCR được thực hiện với các cặp mồi đặc hiệu dựa theo công bố của Jennifer và cộng sự (xem phần phương pháp). Kết quả điện di kiểm tra được thể hiện trên hình 3.15.



Hình 3.15. Kiểm tra sản phẩm RT_PCR
1: DNA 1 kb (Fermentas)
2: Gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H)
3: Gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L)

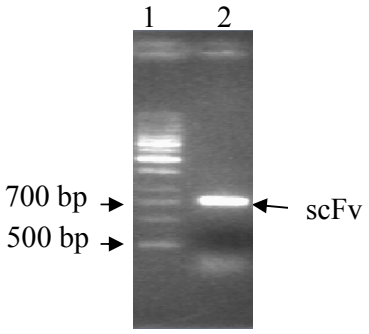
Hình 3.15 cho thấy các băng sáng đặc trưng cho sản phẩm RT-PCR nhân bản vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ với kích thước lớn hơn 300 bp theo như tín toán lý thuyết. Điều này cũng có nghĩa là các gen mã hóa vùng biến đổi của kháng thể gà đươc gây miễn dịch HER2 đã được khuếch đại bằng phản ứng RT-PCR.



Hình 3.16. Sơ đồ tạo gen mã hóa scFv

Sau khi nhân bản được các đoạn gen mã hóa cho vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chúng tôi tiến hành nối ghép gen để tạo thành đoạn gen mã hóa cho mảnh kháng thể scFv tương ứng. Phản ứng nối được thực hiện theo sơ đồ trên hình 3.16.

Từ sơ đồ có thể thấy cặp mồi CKJo-B và CSCVHo-FL hoặc CSCVHoF được thiết kế có mang các trình tự bổ sung với nhau, do đó nhờ phản ứng PCR có thể nối hai đoạn gen mã hóa V_H, và V_L tạo thành đoạn gen mã hóa scFv với linker ngắn. Mảnh kháng thể tạo thành được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR vòng 2. Kết quả nối ghép tạo gen mã hóa scFv được thể hiện trên hình 3.17:



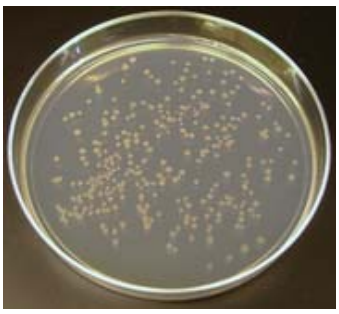
Hình 3.17. Kết qủa tạo scFv

1: Marker DNA 1 kb (Fermentas)

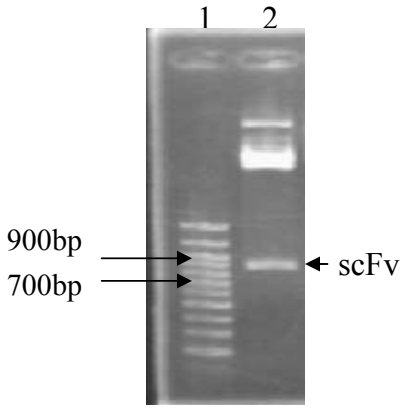
2: Mảnh scFv tạo được

Theo hình 3.17 chúng tôi thu nhận được một băng sáng đậm với kích thước >700 bp, phù hợp với tính toán khi nối ghép hai đoạn gen mã hóa cho V_H và V_L. Để xác định trình tự đoạn scFv chúng tôi đã gắn sản phẩm PCR thu được vào vector tách dòng pJET1 có kích thước 2,9 bp và đã được cắt với hai đầu bằng. Vector tái tổ hợp thu nhận được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Dịch tế bào được cấy trải trên môi trường LB đặc có chứa Amp, ủ ở 37^0C qua đêm để phát triển thành khuẩn lạc riêng rẽ. Kết quả cho thấy xuất hiện nhiều khuẩn lạc mọc riêng rẽ trên môi trường nuôi cấy (hình 3.18).

Chọn ngẫu nhiên 4 khuẩn lạc từ đĩa petri và nuôi trong 2ml môi trường LB lỏng có bổ sung ampicilin (100µg/ml) lắc qua đêm ở 37^oC, 220 v/ph. Sau đó tách DNA-plasmid cắt kiểm tra bằng enzyme *Sfi*I (hình 3.19)



Hình 3.18: Kết quả nuôi cấy tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp đã gắn scFv

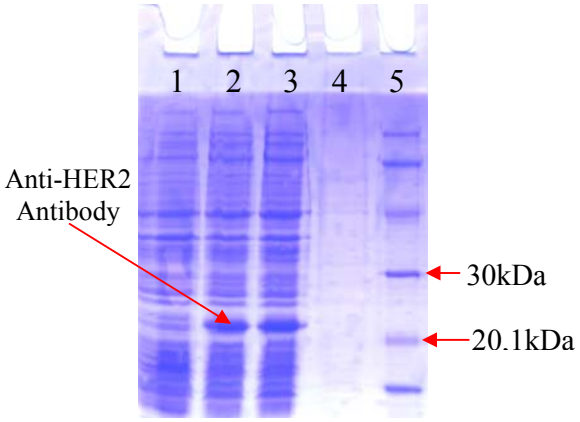


Hình 3.19. Điện di đồ kết quả cắt DNA plasmid bằng enzyme *Sfi*I

1: Marker DNA 100

2: Sản phẩm cắt

Trên ảnh điện di có thể thấy vector tái tổ hợp đã được cắt bằng enzyme *Sfi*I đã xuất hiện băng sáng có kích thước >700 bp. Như vậy, có thể kết luận rằng với quy trình trên đây chúng tôi đã thu được đoạn gen mã hóa scFv từ gà gây miễn dịch với kháng nguyên HER2 có nguồn gốc từ người. Kết quả xác định nucleotide gen mã hóa scFv (**phụ lục 2**) cũng khẳng định kết luận trên.

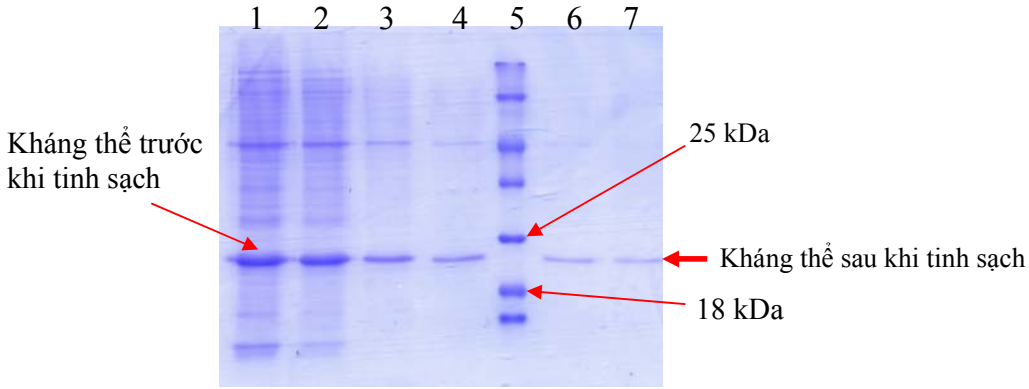


Hình 3.20. Kiểm tra sự biểu hiện gen mã hóa kháng thể đặc hiệu HER2

1: Không cảm ứng; **2,3**: Cảm ứng với nồng độ IPTG 0,6 mM

5: Protein ladders

Kết quả biểu hiện gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 trong *E. coli* BL21 được thể hiện trên hình 3.20. Gen mã hóa mã hóa scFv đặc hiệu HER2 được biểu hiện khi nuôi ở 37°C và được cảm ứng với 0,6 mM IPTG. Kết quả tinh sạch scFv sau khi biểu hiện ở *E. coli* BL21 trên cột sắc ký Ni-NTA được trình bày trên hình 3.21.



Hình 3.21. Kết quả tinh sạch kháng thể đặc hiệu HER2 trên gel polyacrylamid

1: Mẫu chưa tinh sạch;

2-4, 6,7: Các phân đoạn tinh sạch 1, 2, 3, 4, 5;

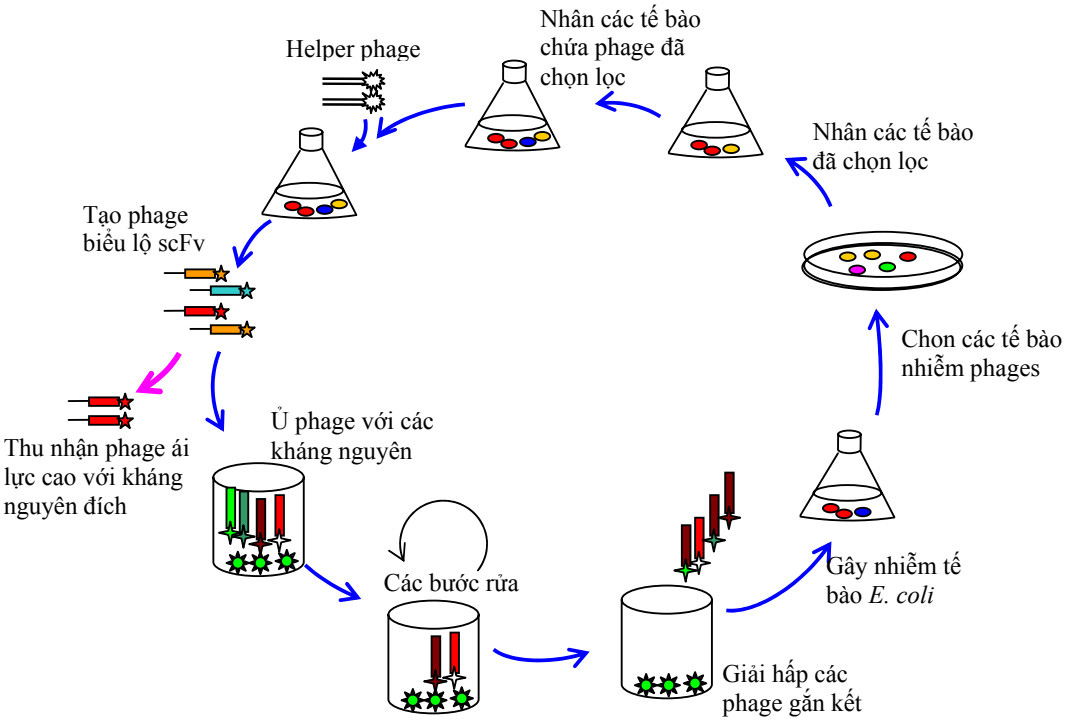
5: Protein ladders

3.1.5.2. Kết quả tạo gen mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu HER2

Kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên (các kháng nguyên theo nội dung nghiên cứu của đề tài: CD33, HER2 và Cyfra 21-1) được thực hiện bằng việc tách dòng các gen mã hóa các vùng riêng biệt sau đó nối ghép tạo kháng thể dạng ghép: ***Vùng biến đổi*** được tách dòng từ thư viện scFv có bản chất của người; Gen mã hóa ***vùng hàng định CH2-CH3***, gen mã hóa ***vùng gắn kết với chitin*** đều được tách dòng từ các tế bào lympho của người; Các gen sau đó được lắp ráp tạo gen tái tổ hợp mã hóa cho kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên đích theo sơ đồ sau:

Gen mã hóa vùng biến đổi của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích, V_H-V_L	Gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể người. Vùng CH2-CH3	Gen mã hóa vùng gắn kết CBD (chitin binding domin) có bản chất của người.

Thu nhận vùng biến đổi của kháng thể dạng ghép: Gen mã hóa vùng biến đổi scFv được thu nhận bằng kỹ thuật phage display với việc sử dụng thư viện kháng thể "**The Griffin.1 library**" do trung tâm Công nghệ protein Vương Quốc Anh cung cấp. Quá trình sàng lọc từ thư viện kháng thể trên kháng nguyên HER2 được thực hiện theo sơ đồ trên hình 3.22.



Hình 3.22. Sơ đồ sàng lọc, thu nhận phage biểu lộ scFv đặc hiệu kháng nguyên đích sau 3-4 lần sàng

Thu nhận gen mã hóa vùng hằng định: Vùng hằng định của kháng thể người được tách dòng từ các tế bào lympho B của người trưởng thành, khỏe mạnh bình thường. Bởi như chúng tã biết, trong cơ thể người khỏe mạnh, thì luôn luôn tồn tại kháng thể đặc hiệu với một kháng nguyên nào đó mà cơ thể đã từng bị tiếp xúc trong quá trình sống, các kháng nguyên này có thể là các tác nhân gây bệnh, cũng có thể các kháng nguyên đã được sử dụng để gây miễn dịch, tiêm chủng.

Kết quả tách dòng gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể người, chúng tôi nhận được đoạn peptide vùng mã hóa vùng CH_2-CH_3 có trình tự amino axit như sau:

```
PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN  50
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK 100
ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD 150
IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS 200
VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K                                221
```

Khi sử dụng phần mềm FASTA để so sánh với các trình tự đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế (**phụ lục 3**), thì vùng hằng định mà chúng tôi đã tách dòng trùng hợp 100% so với các trình tự amino axit của vùng hằng định kháng thể người có mã số PDB:2DTS_A, PDB:2DTS_B, PDB:1HZH-H,...

Thu nhận gen mã hóa vùng gắn kết với chitin: Vùng gắn kết với chitin (CBD) được gắn vào phân tử kháng thể dạng ghép giúp cho việc tinh sạch kháng thể ở quy mô lớn trên cột chitin được thuận lợi. Trình tự amino axit của vùng gắn kết với chitin đã được tách dòng như sau:

```
GCCGGCACTTTCTGTCAAGGTAAAGCTGATGGTTTGTATCCAAATCCAAGAGAAAGGTCT 60
 A  G  T  F  C  Q  G  K  A  D  G  L  Y  P  N  P  R  E  R  S

TCTTTCTATTCTTGTGCTGCTGGTAGATTGTTCCAACAATCTTGTCCAACTGGTTTGGTT 120
 S  F  Y  S  C  A  A  G  R  L  F  Q  Q  S  C  P  T  G  L  V

TTCTCTAATTCTTGTAAATGTTGTACTTGGAATTAAACCGGT   162
 F  S  N  S  C  K  C  C  T  W  N  *  T  G
```

Gen mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên HER2 (**Phụ lục 3**) được tạo ra bằng việc ghép nối các vùng gen mã hóa cho các phần riêng biệt theo kiểu lắp ráp các "khối" nhờ enzyme cắt hạn chế và T4-DNA liagtion.

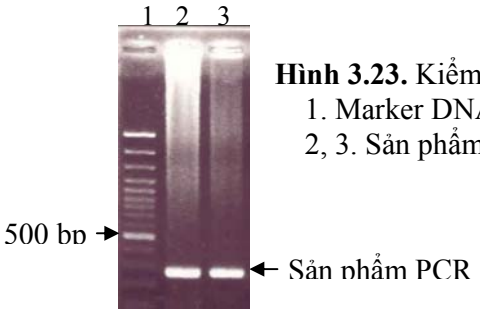
Gen tái tổ hợp mã hóa kháng thể tái tổ hợp dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên HER2 có khối lượng phân tử 59, 017 kDa, điểm đẳng điện pI= 9,155 và thành phần amino axit với tần suất xuất hiện được trình bày tại bảng 3.4

Bảng 3.4. Thành phần, tần suất xuất hiện các amino axit của kháng thể đặc hiệu HER2

Amino axit	số lần xuất hiện	Tần suất	Amino axit	số lần xuất hiện	Tần suất
Ala (A)	24	0.045	Met (M)	6	0.011
Cys (C)	18	0.033	Asn (N)	20	0.037
Asp (D)	23	0.043	Pro (P)	39	0.072
Glu (E)	23	0.043	Gln (Q)	28	0.052
Phe (F)	21	0.039	Arg (R)	20	0.037
Gly (G)	52	0.097	Ser (S)	56	0.104
His (H)	7	0.013	Thr (T)	37	0.069
Ile (I)	12	0.022	Val (V)	42	0.078
Lys (K)	36	0.067	Trp (W)	9	0.017
Leu (L)	36	0.067	Tyr (Y)	29	0.054

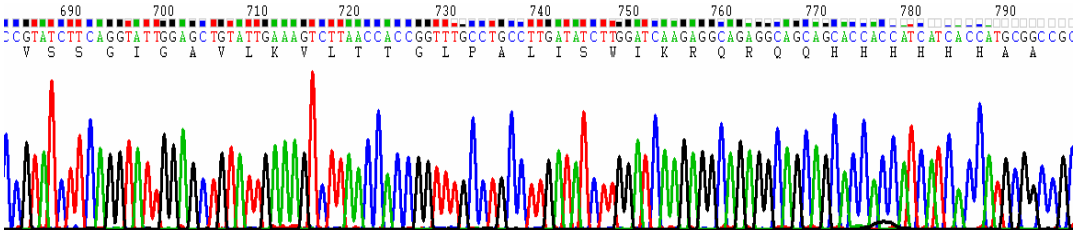
3.1.5.3. Kết quả tách dòng gen mã hóa melittin và tạo Immunotoxin

Melittin gồm 26 amino acid: GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ. Trong đó: 20 gốc amino acid đầu N- không phân cực, 4 gốc amino acid đầu cacrboxyl là các amino acid tích điện và 2 gốc amino acid phân cực. Không có amino acid cystein nên không tạo cầu disulfide. Kết quả nhân bản PCR gen mã hóa tide melittin từ ong mật Việt Nam *Apis cerana* được trình trên hình 3.23.



Hình 3.23. Kiểm tra sản phẩm PCR thu nhận gen mã hóa melittin
1. Marker DNA
2, 3. Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa melittin

Gen mã hóa melittin sau khi xác định rình tự nucleotide được gắn tiếp nối với gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 để tạo gen mã hóa độc tố miễn dịch Immunotoxin-HER2 (hình 3.24).



Hình 3.24. Kết quả gắn gen mã hóa melittin với gen scFv đặc hiệu HER2

3.1.5.4. Biểu hiện gen mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu HER2

Gen tái tổ hợp sau khi được lắp ráp, kiểm tra khung đọc bằng xác định trình tự nucleotide được gắn vào vector pSTREP-HIS 1525 (Hãng BioTec) để biểu hiện trong *Bacillus megaterium.*

Hệ biểu hiện Bacillus đã được sử dụng trong biểu hiện nhiều loại protein tái tổ hợp. Vi khuẩn *B. megaterium* chủng WH320 của hãng BioTec là một vật chủ khá lý tưởng để biểu hiện các protein tái tổ hợp vì có nhiều ưu điểm.

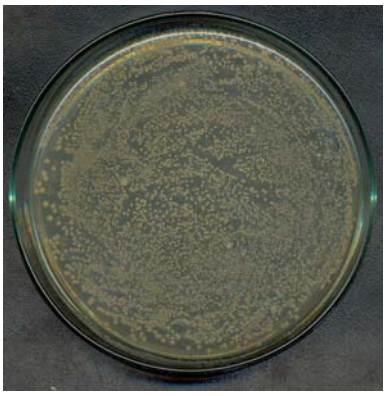
Tuy nhiên việc biến nạp gen vào chủng này không đơn giản vì không sử dụng được quy trình biến nạp bằng xung điện thông thường như đối với các hệ biểu hiện khác (như ở *E. coli*, nấm men…). Đối với hệ biểu hiện này cần phải sử dụng quy trình biểu hiện riêng và khá phức tạp, khó hơn so với quy trình xung điện: Biến nạp vào protoplast (tế bào trần).

Tạo protoplast

Quy trình tạo protoplast phức tạp hơn so với việc tạo tế bào khả biến ở *E. coli* do *B. megaterium* là chủng vi khuẩn gram dương có cấu trúc tế bào phức tạp hơn so với chủng gram âm. Quy trình tạo protoplast của *B. megaterium* như sau:

Nuôi tế bào *Bacillus megaterium* trong 3 ml môi trường LB lỏng, tỷ lệ giống 3%, lắc 250 rpm/37°C qua đêm. Sau đó cấy chuyển 1ml dịch nuôi cấy qua đêm sang 50 ml môi trường LB lỏng, lắc 250 rpm/37°C đến khi OD_{578nm}=1.0.

Ly tâm 2600 x g/15 phút/4°C. Loại dịch, thu tế bào. Bổ sung 5 ml SMMP [(Trộn các thể tích tương đương 2x SMM và 2x AB3 trước khi sử dụng), trong đó 2x SMM gồm 1M sucrose; 40 mM maleic acid, disodium salt; 40 mM MgCl2, pH 6.5; Khử trùng 12 phút (có thể có mầu nâu nhạt) và thêm 2x AB3 (Antibiotic Medium No. 3, DIFCO)] để hòa tế bào. Tiếp đó, bổ sung 100 µl Lysozyme (đã được hòa tan trong 1x SMM với nồng độ 100 mg/µl), lắc nhẹ ở 37°C/30 phút. Ly tâm 1300 x g/10 phút ở nhiệt độ phòng, loại dịch thu protoplast. Hòa protoplast trong 5 ml SMMP, ly tâm tiếp 1300 x g/10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại dịch và hòa protoplast lại trong 5 ml SMMP và 750 µl Glyxerol 87% (w/v). Chia ra mỗi eppendoft 500 µl và bảo quản ở -80°C sử dụng trong thời gian không quá 2 tháng. Trước khi biến nạp, protoplast có thể được kiểm tra trước bằng cách trộn 500 µl protoplast với 2.5 ml thạch CR5-top agar và phủ trên đĩa thạch môi trường LB đặc không có kháng sinh. Sau khi nuôi cấy qua đêm, có thể thấy xuất hiện một màng dày của *B. megaterium* (hình 3.25).



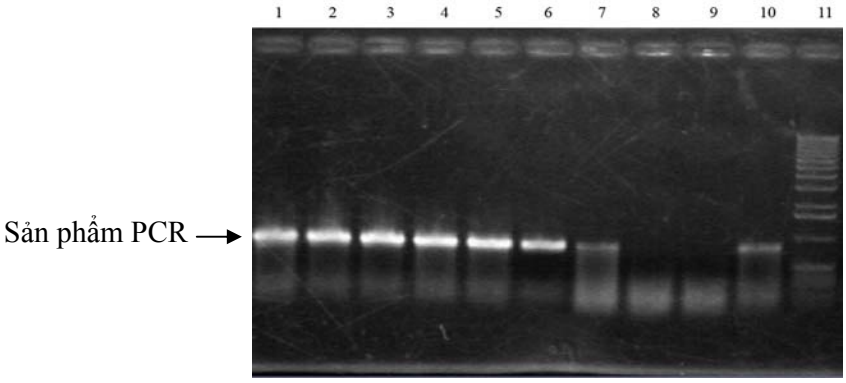
Hình 3.25. Protoplast của *B. megaterium WH320*

Biến nạp gen tái tổ hợp vào protoplast của *B. megaterium* WH320

Plasmid tái tổ hợp được chúng tôi tiến hành biến nạp vào protoplast đã được tạo từ trước và được giữ ở – 80°C. Sau khi biến nạp, tế bào vi khuẩn được trải trên đĩa thạch có bổ sung chất kháng sinh tetracillin 10 µg/ml, ủ 37°C qua đêm. Kết quả biến nạp được thể hiện ở hình 3.26.

Hình 3.26. Kết quả biến nạp gen tái tổ hợp vào tế bào *Bacillus megaterium*

Chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy để kiểm tra kết quả biến nạp bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen mã hóa cho VH-VL trong gen tái tổ hợp dạng ghép mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu HER2. Kết quả PCR được trình bày trên hình 3.27.



Hình 3.27. Kết quả PCR từ các khuẩn lạc của *B. megaterium WH320*
Giếng 1 đến 10: Các khuẩn lạc được chọn.
Giếng 11: Marker DNA 1 kb.

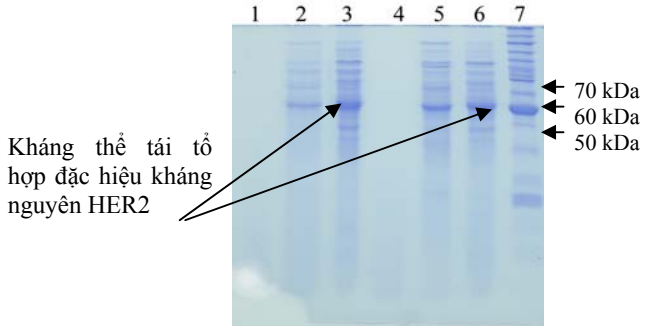
Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên hình 3.27 cho thấy các khuẩn lạc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 có xuất hiện 1 băng có kích thước khoảng hơn 900 bp tương đương kích thước tính toán lý thuyết. Do đó có thể kết luận các khuẩn lạc đó đã mang plasmid tái tổ hợp có gắn gen kháng thể tái tổ hợp.

Biểu hiện gen mã hóa kháng thể trong *B. megaterium WH320*

Chủng *B. megaterium* mọc tốt trên môi trường giàu dinh dưỡng như LB, TB ở 37°C. Chủng WH320 và các chủng dẫn xuất của nó không sinh bào tử, sẽ chết trong môi trường thạch, giữ ở 4°C trong vòng 2 tuần, cần sử dụng ống gốc trong glycerol để trải mới 7-10 ngày. Chọn lọc các chủng mang pSTREP-HIS1525 có thể bổ sung tetracycline với nồng độ 10 µg/ml. So với các chủng

Bacillus khác *B. megaterium* có thuận lợi là không có các alkaline protease, do vậy các protein ngoại lai có thể biểu hiện với hiệu suất cao (130-150 lần) khi sử dụng operon xylose mà không bị phân huỷ (Rygus and Hillen, 1991). Chủng *B. megaterium* không có các nội độc tố trong thành tế bào. Plasmid sử dụng trong các thí nghiệm này mang trình tự để có thể tiết protein ngoại lai ra môi trường nuôi cấy.

Chúng tôi sử dụng khuẩn lạc số 1 và số 2 để biểu hiện trên môi trường LBA (NaCl 5 g; Trypton: 10 g; Beef extract: 5g/1lít). Sau khi khảo sát các điều kiện biểu hiện, chúng tôi nhận thấy rằng nuôi lắc thích hợp nhất cho sự biểu hiện là ở 37°C, 250 rpm, với thời gian thu mẫu sau 24 h. Sau khi nuôi đạt OD_{600nm}= 0.3 thì thu mẫu trước cảm ứng, lấy một lượng thể tích làm mẫu nuôi cùng và tiến hành cảm ứng bằng xylose 0.5 % và nuôi tiếp 24h thì lấy các mẫu ra và điện di SDS-PAGE để kiểm tra (hình 3.28).



Hình 3.28. Kết quả biểu hiện gen mã hóa kháng thể trong *B. megaterium WH320*

1, 4: Dịch nuôi tế bào trước khi cảm ứng với 0.5% xylose tương ứng với khuẩn lạc số 1 và 2

2, 5: Dịch nuôi tế bào không cảm ứng với 0.5% xylose tương ứng với khuẩn lạc số 1 và 2

3, 6: Dịch nuôi tế bào được cảm ứng với 0.5% xylose tương ứng với khuẩn lạc số 1 và 2

7: BenchMark™ Protein Ladder của Invitrogen.

Trên điện di đồ cho thấy xuất hiện băng protein đậm có kích thước khoảng 60 kDa ở các mẫu sau khi cảm ứng với xylose, trong khi đó ở các mẫu không cảm ứng xylose đều không xuất hiện băng có kích thước tương ứng.

Kết luận

Đã thiết kế thành công vectơ biểu hiện pSTREP-HIS1525 mang gen mã hóa cho kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên HER2. Gen mã hóa cho kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên HER2 có 3 phần với chức năng riêng biệt: Vùng biến đổi (V_H-V_L); vùng hằng định (CH_2-CH_3) và CBD (Chitin Binding Domain). Bước đầu biểu hiện thành công gen mã hóa cho kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên HER2 trong *B. megaterium.*

Biểu hiện gen mã hóa kháng thể kháng HER2, CD33 trong *P. pastoris*

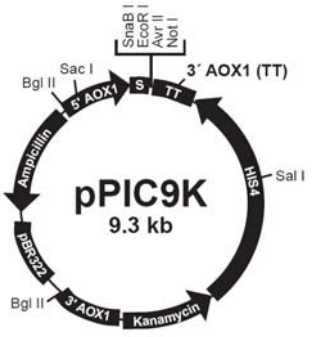
Pichia pastoris là hệ biểu hiện rất thành công đối với nhiều protein tái tổ hợp. Các yếu tố góp phần làm cho hệ biểu hiện này nhanh chóng được chấp thuận có thể tóm tắt như sau: (1) Promotor của gen alcohol oxidase I (AOXI) của *Pichia pastoris* rất phù hợp cho việc kiểm soát sự biểu hiện của các gen ngoại lai; (2) Các kỹ thuật thao tác di truyền ở mức độ phân tử đối với *P. pastoris* cũng tương tự như đối với chủng *Saccharomyces cerevisiae*; (3) Sự thích hợp đặc biệt của chủng *P. pastoris* trong nuôi cấy ưa khí, đặc điểm sinh lý then chốt của chủng này là dễ nuôi cấy để đạt mật độ cao trong lên men công nghiệp.

Vì là nấm men nên *P. pastoris* là cơ thể đơn bào nên dễ thao tác và nuôi cấy. Tuy nhiên, nó cũng là một cơ thể nhân thật nên có khả năng hiệu chỉnh các phân tử protein sau khi dịch mã giống như ở cơ thể bậc cao, đó là các quá trình thuỷ phân, hình thành cấu trúc cuộn không gian, tạo các cầu nối disulfide và glycosyl hoá. Vì vậy nhiều protein tái tổ hợp khi biểu hiện trong *E. coli* dưới dạng không hoà tan trong thể vùi không có hoạt tính nhưng khi biểu hiện ở *P. pastoris* được thể hiện ở dạng có hoạt tính. Hệ biểu hiện *P. pastoris* cũng được xem là hệ biểu hiện nhanh, đơn giản, ít tốn kém và thường có mức biểu hiện cao so với các hệ biểu hiện ở tế bào bậc cao như biểu hiện ở tế bào côn trùng, tế bào động vật.

Để nghiên cứu, xác định được hệ biểu hiện thích hợp cho gen mã hóa các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2, CD33 phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi đã nghiên cứu tạo vector biểu hiện các gen mã hóa kháng thể scFv đặc hiệu các kháng nguyên đích trong *P. pastoris.* Vector biểu hiện gen mã hóa kháng thể scFv đặc hiệu HER2 và CD33 được thiết kế trên cơ sở sử dụng các vector gốc pPIC9K và pAO815. Sơ đồ cấu tạo của các vector này được thể hiện trên hình 3.29 và hình 3.30.

Comments for pPIC9K:
9276 nucleotides

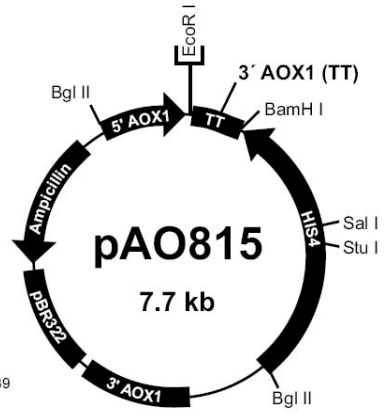
5´ *AOX1* promoter fragment: bases 1-948
5´ *AOX1* primer site: bases 855-875
α-Factor secretion signal(s): bases 949-1218
α-Factor primer site: bases 1152-1172
Multiple Cloning Site: bases 1216-1241
3´ *AOX1* primer site: bases 1327-1347
3´ *AOX1* transcription termination (TT): bases 1253-1586
HIS4 ORF: bases 4514-1980
Kanamycin resistance gene: bases 5743-4928
3´ *AOX1* fragment: bases 6122-6879
pBR322 origin: bases 7961-7288
Ampicillin resistance gene: bases 8966-8106



Hình 3.29. Sơ đồ cấu tạo vector pPIC9K

Comments for pAO815:
7709 nucleotides

5´ *AOX1* promoter fragment: bases 1-940
5´ *AOX1* primer site: bases 855-875
*Eco*R I Site: bases 943-948
3´ *AOX1* primer site: bases 1024-1044
3´ *AOX1* transcription termination (TT): bases 950-1277
HIS4 ORF: bases 4199-1665
3´ *AOX1* fragment: bases 4554-5310
pBR322 origin: bases 6394-5740
Ampicillin resistance gene: bases 7399-6539



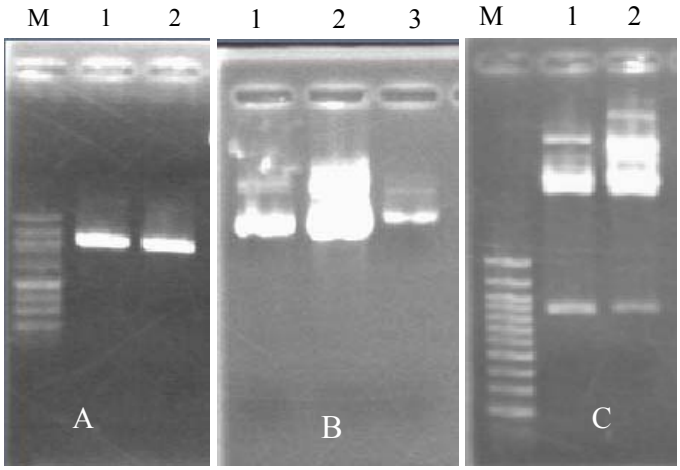
Hình 3.30. Sơ đồ cấu tạo của vector pAO815

Để thuận lợi cho việc trình bày kết quả nghiên cứu biểu hiện các gen mã hóa kháng thể scFv đặc hiệu các kháng nguyên đích trong nấm men *P. pastoris* và hơn nữa việc thiết kế vector biểu hiện và biểu hiện các kháng thể

đơn dòng đơn chuỗi scFv đặc hiệu HER2 và CD33 cùng được tiến hành song song và đồng thời, các kết quả điện di kiểm tra được tiến hành trên cùng bản điện di, do đó phần này chúng tôi trình bày gộp cả các kết quả thiết kế và biểu hiện gen mã hóa scFv đặc hiệu kháng nguyên ung thư máu CD33.

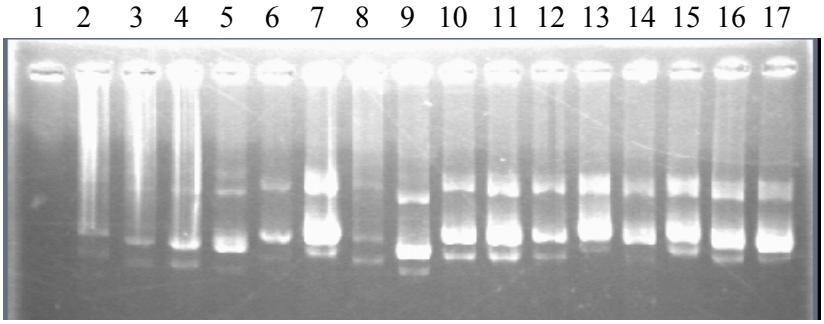
Kết quả tạo vector biểu hiện gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 và CD33

Các gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi scFv đặc hiệu HER2 và CD33 được gắn thêm các vị trí nhận biết của các enzyme cắt hạn chế bằng kỹ thuật PCR với khuôn là các vector tách dòng chứa các gen này (xem phần trên). Kết quả nhân bản PCR các gen này được trình bày trên hình 3.31



Hình 3.31. Kết quả nhân bản PCR gen scFv đặc hiệu HER2 và CD33
(A)-PCR-antiHer2 (giếng 1) và anti-CD33 (giếng 2) antibody; (B)-Plasmid mang gen mã hóa scFv đặc hiệu kháng nguyên HER2 (giếng 1, 2) và kháng nguyên CD33 (giếng 3), (C)-Cắt kiểm tra bằng enzyme NotI và BamHI đối với plasmid mang gen anti-HER2 (giếng 1) và anti-CD33 (giếng 2) antibody. M là marker 100 bp (Fermentas).

Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa scFv đặc hiệu kháng nguyên HER2 và CD33 được gắn vào vector gốc pAO815 và pPIC9K. Kết quả kiểm tra các vector mang gen scFv được trình bày trên hình 3.32.



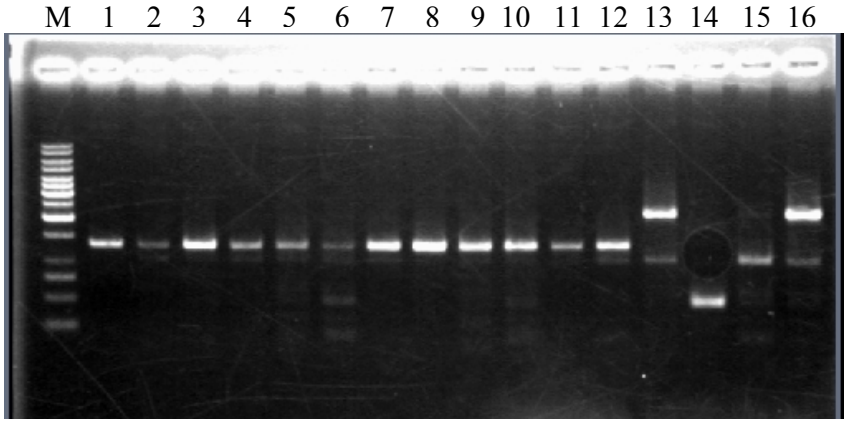
Hình 3.32. Kiểm tra các plasmids mang gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 và CD33

1-4: scFv đặc hiệu HER2 trong pAOX815 **13**: pPIC9K gốc

5: pAOX 815 gốc **9-12**: scFv đặc hiệu HER2 trong pPIC9K

6-8: scFv đặc hiệu CD33 trong pAOX815 **14-17**: scFv đặc hiệu CD33 trong pPIC9K

Để khẳng định việc gắn gen scFv đặc hiệu HER2 và CD33 trong các vector gốc pAO815 và vector pPIC9K, chúng tôi đã chọn một số vector tương ứng để kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với các mồi đặc hiệu. Kết quả kiểm tra PCR được trình bày trên hình 3.33 và kiểm tra bằng cắt với các enzyme



Hình 3.33. Kết quả gắn gen scFv trong vector pAO815 và pPIC9K

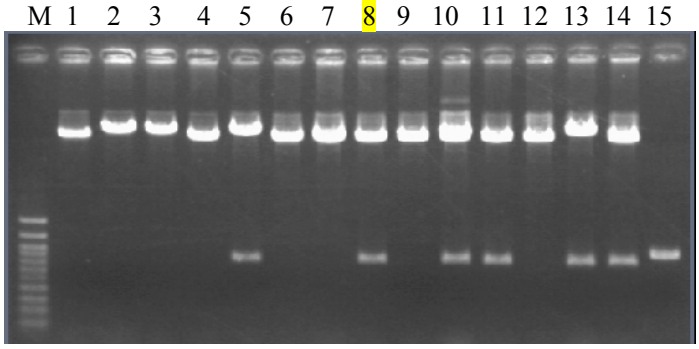
M- Marker 1kb (Fermentas)

1-6: scFv đặc hiệu HER2 trong pPIC9K chủng KM71 (His^+Mut^S) được PCR (**1-3** nhận được trên môi trường có nồng độ Geneticin 2mg/ml; 4-6 nồng độ kháng sinh là 1mg/mL)

7-12: scFv đặc hiệu CD33 trong pPIC9K chủng KM71 (His^+Mut^S) được PCR (**7-10** nhận được trên môi trường có nồng độ Geneticin 2mg/ml; 11 là 1mg/ml, 12 là nồng độ 0,5mg/ml)

13, 15, 16: Đối chứng (+) với gen Albumin trong pPIC 9K chủng GS115 (His^+Mut^S).

14: Đối chứng âm(-) nghĩa là pPIC9K trong KM71 không chứa insert scFv.

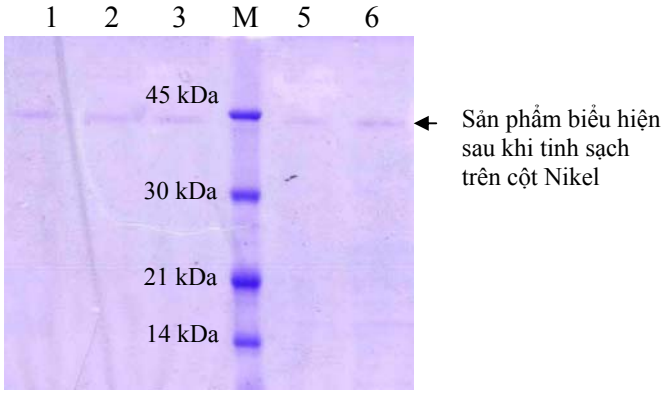


Hình 3.34. Kết quả kiểm tra bằng enzyme *Eco*RI và *Not*I
1-Marker 100bp
1-14: Các plasmid mang gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 (giếng 1 đến giếng 8) và scFv đặc hiệu CD33 (giếng 9 đến giếng 14) sau khi xử lý với các enzyme *EcoR*I và *Not*I. **15.** Sản phẩm PCR

Kết quả kiểm tra bằng enzyme cắt hạn chế và bằng kỹ thuật PCR đã cho phép chúng tôi khẳng định gen mã hóa scFv đặc hiệu kháng nguyên HER2 và kháng nguyên CD33 đã được gắn vào các vector biểu hiện trong nấm men *Pichia pastoris*.

Biểu hiện các gen mã hóa scFv trong nấm men *Pichia pastoris*

Kết quả biểu hiện các gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 và CD33 được trình bày trên hình 3.35.



Hình 3.35. Kết quả tinh sạch kháng thể trên cột sắc ký ái lực

1, 2, 3: *Các mẫu scFv đặc hiệu HER2*
5, 6: *Các mẫu scFv đặc hiệu HER2*
M: *Chỉ thị phân tử*

Kết quả điện di cho thấy các sản phẩm scFv được biểu hiện tốt trong nấm men *Pichia pastoris* và sau khi tinh sạch trên cột sắc ký ái lực là tương đối sạch (chỉ xuất hiện một băng sáng mờ trên bản điện di).

So sánh kháng thể đặc hiệu HER2 tiêu chuẩn của "The Merck Index"

Theo "The Merck Index"-2001 tr.1708, mục 9651 (**phụ lục 3**), **Trastuzumab** (Herceptin) là kháng thể đơn dòng liên kết trực tiếp với sản phẩm của gen ung thư HER2/*neu,* là thụ thể yếu tố phát triển biểu mô và biểu hiện quá mức trên các tế bào ung thư nhất định. Kháng thể này là sản phẩm của gen tái tổ hợp tạo ra bằng cách gắn gen mã hóa vùng liên kết với kháng nguyên có bản chất của kháng thể đơn dòng có nguồn gốc từ chuột với gen mã hóa vùng khung có nguồn gốc từ kháng thể người. Đây là sản phẩm của Hãng Genentech đã được đăng ký bản quyền (US Patent: WO 89 06692 và US 5677171; P. Carter et al*., Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 4285, 1992).

Theo đó trình tự amino acid của vùng biến đổi scFv kháng thể đặc hiệu HER2 mà đề tài đã thu được có độ tương đồng 100 % với trình tự scFv của kháng thể được sử dụng làm nguyên liệu chính trong HERCEPTIN (**phụ lục 1**). Trình tự amino acid của vùng hằng định CH2, CH3 có bản chất của của kháng thể người.

Như vậy, có thể kết luận rằng kháng thể đặc hiệu HER2 mà đề tài đã nhận được đạt được yêu cầu đã đăng ký trong phần thuyết minh và trong hợp đồng nghiên cứu khoa học và công nghệ với Ban chủ nhiệm chương trình KC-10/06-10 đó là kháng thể đã tạo ra có cấu trúc bậc 1 và thành phần amino acid tương đương với tiêu chí của kháng thể theo "The Mexrck Index"-2001.

3.1.5.5. Kết quả tạo kháng thể phage đặc hiệu HER2

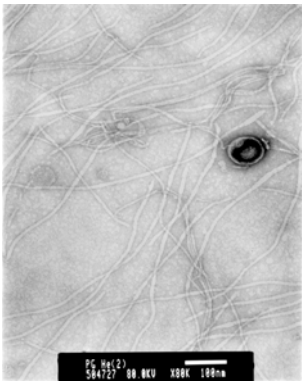
Để sử dụng kháng thể trong tạo KIT chẩn đoán kháng nguyên HER2 trong các mẫu huyết thanh, chúng tôi đã sử dụng kháng thể scFv biểu lộ trên phage. Kháng thể biểu lộ trên phage là một trong các dạng liên kết đặc biệt

giữa kiểu hình (kháng thể scFv biểu lộ trên bề mặt phage) và kiểu gen (gen mã hóa scFv được gắn vào hệ gen của phage). Vì vậy, phức hệ này vừa có thể sử dụng phần kiểu hình scFv để gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên HER2 trong huyết thanh và phần kiểu hình là gen mã hóa scFv được gắn trong hệ gen phage trong kỹ thuật real-time PCR (PCR định lượng).

Như vậy, sử dụng kháng thể phage được tạo ra (có nguồn gốc từ gà như đã trình bày ở trên) không chỉ giúp định tính mà còn cho phép định lượng kháng nguyên HER2 trong các mẫu phân tích. Đây là một trong các điểm mới, sáng tạo của đề tài.

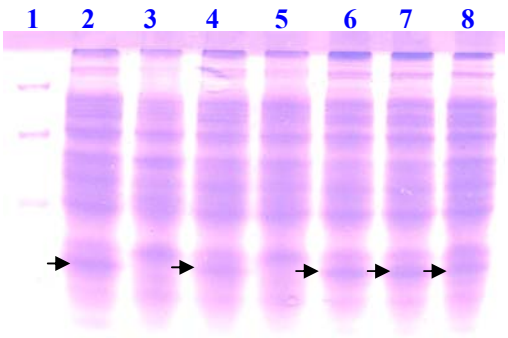
3.1.5.6. Tạo phage biểu hiện scFv trên bề mặt

Vi khuẩn *E. coli* chủng TG1 chứa phagemid pHEN2 đã được gắn gen mã hóa các vùng biến đổi của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 được ủ trong môi trường 2xTY (16g Typtone, 10g Yeast Extract và 5g NaCl trong 1 lít nước cất) chứa 2% glucose và 100 µg/ml ampicillin, và sau đó nuôi lắc (250 vòng/phút) ở 37°C cho tới khi đạt OD_{600} = 0,5 thì bổ sung helper phage M13K07 (10^9 p.f.u./ml, Amersham Pharmacia Biotech). Dịch nuôi được lắc nhẹ thêm 1 giờ ở 37°C. Ly tâm 4.000 vòng/phút, thời gian 5 phút để thu tế bào, hoà tế bào vào môi trường 2xTY chứa 100 µg/ml ampicillin và 50 µg/ml kanamycin. Nuôi lắc qua đêm ở 30°C để thu phage. Sau đó chuẩn phage để xác định CFU và xác định hình thái cấu trúc của phage biểu lộ scFv của kháng thể dưới kính hiển vi điện tử (hình 3.36).



Hình 3.36. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử các phage biểu lộ scFv đặc hiệu HER2.
Các phage có cấu trúc hình sợi dài với kích thước (6 nm x 1000 nm)

Sự biểu hiện các scFv trên bề mặt kháng thể còn được kiểm tra trong chủng biểu hiên không ức chế, *E. coli* HB2151 (hình 3.37).

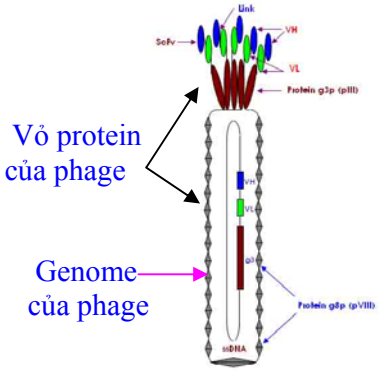


Hình 3.37. Kiểm tra sự biểu hiện của scFv trong chủng không ức chế *E. coli* HB2151

1: Chỉ thị phân tử
3, 5: Trước khi cảm ứng bởi IPTG
2, 4, 6, 7, 8: Sau khi cảm ứng bởi IPTG

Trên hình 3.307 ta thấy xuất hiện các băng đậm ở các giếng **2, 4, 6, 7, 8** là các giếng sau khi cảm ứng bởi IPTG. Kết quả này một lần nữa khẳng định kết quả lắp ghép gen mã hóa scFv của kháng thể đặc hiệu HER2 trong phagemid pHEN2 cũng như khả năng biểu lộ scFv đặc hiệu kháng nguyên HER2 trên bề mặt phage. Mô hình biểu lộ scFv của kháng thể trên bề mặt phage được thể hiện ở hình 3.38.

Một trong các ưu điểm của phương thức biểu lộ này là phân tử scFv được biểu hiện ở trạng thái cấu trúc thật, và vì vậy có thể sử dụng được ngay cho các phân tích mà không cần qua các bước tinh sạch. Hơn nữa, có thể sản xuất ở quy mô lớn đáp ứng đủ cho các yêu cầu tạo KIT chẩn đoán với giá thành rẻ.



Hình 3.38. Mô hình scFv biểu lộ trên bề mặt phage.
VH: Gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng
VL: Gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ
Linker: đoạn peptide liên kết VH-VL
g3p: Protein vỏ g3p của phage
ScFv: Kháng thể đơn cuỗi biểu lộ trên bề mặt phage

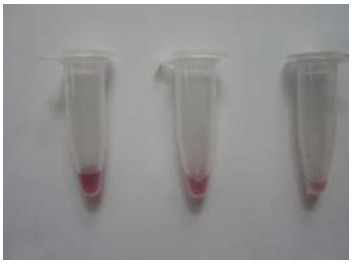
Như vậy, phage tạo ra có khả năng biểu lộ scFv trên bề mặt dưới dạng gắn kết với một số các loại protein của phage trong chủng ức chế *E. coli* TG1, và biểu hiện dưới dạng độc lập trong chủng không ức chế *E. coli* HB2151. Rõ ràng việc gắn kết giữa kiểu hình (scFv) và kiểu gen (gen mã hóa V_H-V_L) trong cùng một phage là sự liên kết kháng thể-DNA đặc trưng và là liên kết khá

bền. Sử dụng liên kết này là nét mới, đặc trưng để tạo KIT định lượng kháng nguyên trong các mẫu phân tích khi kết hợp với kỹ thuật real-time PCR.

3.1.6. Kết quả gắn kháng thể với hạt vàng để tạo Kit chẩn đoán

3.1.6.1. Kết quả xác định phổ hấp thụ của phức hệ kháng thể-vàng

Phức hệ scFv trên phage được gắn với các hạt nano vàng (các hạt vàng có đường kính 30 nm-40 nm) tạo ra theo quy trình mà đề tài đã thực hiện (xem phần phương pháp) được trình bày trên hình 3.39.

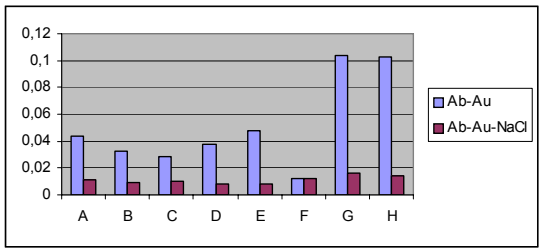


Hình 3.39. Phức hệ kháng thể phage-hạt nano vàng

Kết quả xác định phổ hấp thụ (hiệu số phổ hấp thụ 450 nm-650 nm) của phức hệ kháng thể biểu lộ trên phage với hạt vàng (theo quy trình ở phần phương pháp) được trình bày ở bảng 3.5 và hình 3.40.

Bảng 3.5. Kết quả xác định phổ hấp thụ của các phức hệ kháng thể-hạt vàng

	Ab-Au	Ab-Au-NaCl
A	0,0435	0,0115
B	0,0325	0,009
C	0,0285	0,0105
D	0,038	0,0085
E	0,048	0,008
F	0,0125	0,0125
G	0,104	0,016

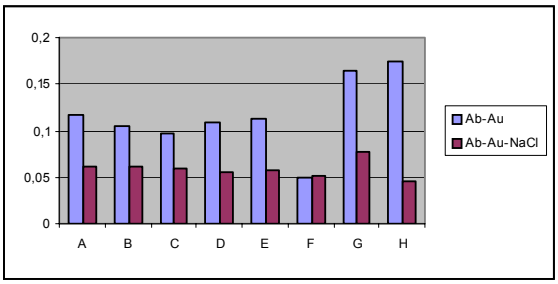


Hình 3.40. Kết quả xác định phổ hấp thụ của các phức hệ kháng thể-hạt vàng
A-E: Hỗn hợp với nồng độ khác nhau
F: Borate, H: Protein, G: Au
Cột 1-2: Phức hệ Ab-Au
Cột 3-4: Phức hệ Ab-Au-NaCl

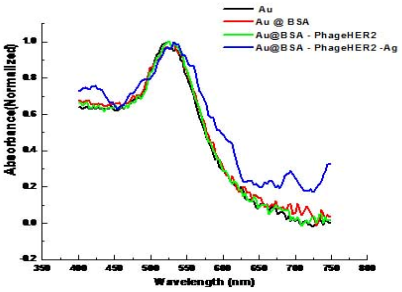
Khi xác định phổ hấp thụ của các phức hệ trên ở bước sóng đặc trưng cho Au (540 nm) thu được kết quả ở bảng 3.6 và hình 3.41 và hình 3.42

Bảng 3.6. Kết quả xác định phổ hấp thụ của phức hệ kháng thể-Au ở bước sóng 540 nm

	Ab-Au	Ab-Au-NaCl
A	0,1175	0,061
B	0,104	0,0605
C	0,097	0,06
D	0,109	0,055
E	0,1125	0,057
F	0,05	0,052
G	0,1645	0,0775

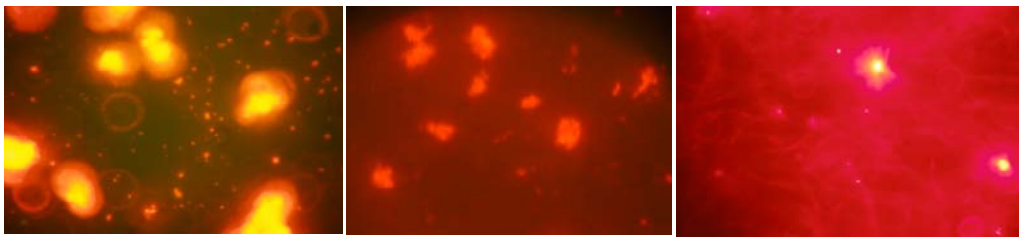


Hình 3.41. Sơ đồ kết quả xác định phổ hấp thụ của các phức hệ kháng thể-hạt vàng ở bước sóng 540 nm



Hình 3.42. Phổ hấp thụ của phức hệ scFv-Au

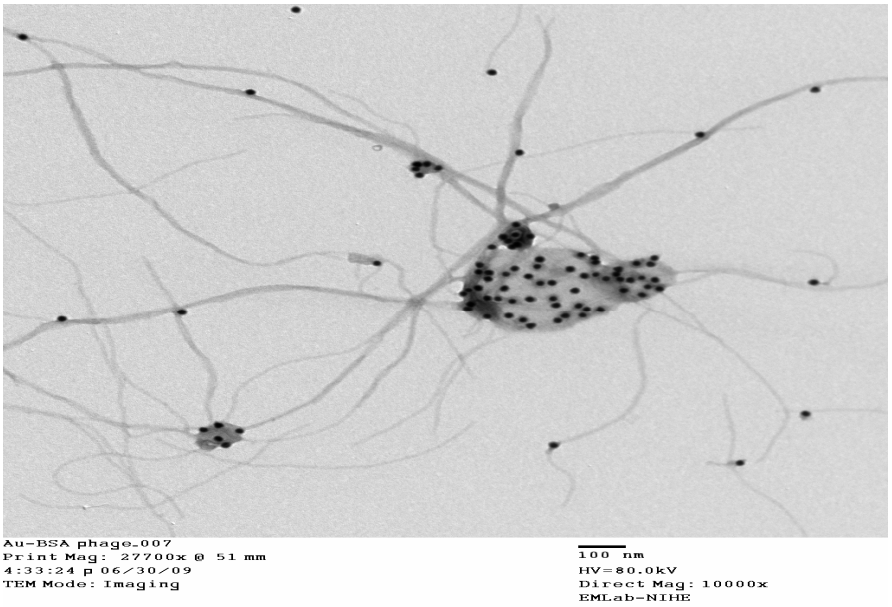
Kết quả xác định phổ hấp thụ của các phức hệ **kháng thể-vàng (Ab-Au)** được xác định ở các bước sóng (450 nm-650 nm) cũng như ở bước sóng 540 nm cho thấy phức hệ tạo ra có phổ hấp thụ nhỏ hơn phức hệ của kháng thể hoặc của dung dịch vàng độc lập. Hơn nữa, sự hấp thụ của phức hệ chịu sự tác động mạnh khi có mặt muối NaCl. Kết quả kiểm tra phức hệ kháng thể-vàng dưới kính hiển vi điện tử đã khẳng định quy trình gắn kháng thể với hạt vàng mà chúng tôi sử dụng đã tạo được phức hệ kháng thể-vàng (Ab-Au) và phức hệ này được thể hiện trên hình 3.43.



Hình 3.43. Kết quả xác định phức hệ kháng thể-vàng (Ab-Au) dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần. Điểm mầu vàng có kích thước lớn là tập hợp các phức hệ Ab-Au.

Phức hệ kháng thể-vàng được tạo ra là nguyên liệu cơ bản để tạo KIT định tính kháng nguyên đích (ở đây là kháng nguyên HER2 trong ung thư vú). Tuy nhiên, một trong các bước quan trọng là phải phủ phức hệ **Ab-Au** cũng như các thành phần khác (kháng thể đơn dòng không gắn vàng, kháng thể đa dòng khác loài) lên giá đỡ với nồng độ các phức hệ Ab-Au, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng khác loài là thích hợp.

Kiểm tra kết quả gắn hạt vàng lên kháng thể phage được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử (hình 3.44) cho thấy các hạt vàng được gắn chủ yếu vào đầu của phage, nghĩa là gắn chủ yếu vào phần kháng thể đặc hiệu HER2.



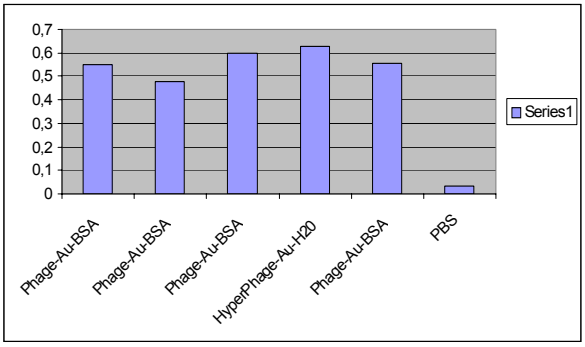
Hình 3.44. Kết quả xác định phức hệ kháng thể phage-hạt vàng bằng kính hiển vi điện tử. Các chấm đen là các hạt vàng; các sợi mảnh dài là các phage

Như vậy, kết quả chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử (hình 3.44) đã một lần nữa khẳng định kết quả gắn các hạt nano vàng (đường kích 30 nm-40 nm) với scFv biểu lộ trên phage (kháng thể biểu lộ trên phage). Đây là phức hệ chính trong tạo Kit chẩn đoán kháng nguyên HER2 trong mẫu phân tích.

Để kiểm tra khả năng sử dụng phức hệ scFv trên phage-hạt vàng làm nguyên liệu tạo KIT chuẩn đoán, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra khả năng

nhận biết và gắn kết đặc hiệu của phức hệ với kháng nguyên HER2 bằng phản ứng ELISA. Kết quả được trình bày trên hình 3.45.

Phage-Au-BSA	0,552
Phage-Au-BSA	0,477
Phage-Au-BSA	0,601
HyperPhage-Au	0,628
Phage-Au-BSA	0,555
PBS	0,034



Hình 3.45. Kết quả xác định khả năng nhận biết và gắn kết với HER2 của scFv-Au

Kết quả ELISA cho thấy hoạt tính nhận biết và gắn kết đặc hiệu của kháng thể phage (scFv biểu lộ trên phage) vẫn được bảo toàn sau khi gắn thêm các phân tử vàng. Điều này cũng có nghĩa rằng có thể sử dụng phức hệ scFv trên phage-hạt vàng làm nguyên liệu chính để tạo Kit định tính sự có mặt của kháng thể HER2 trong các mẫu phân tích.

Để có thể sử dụng phức hệ kháng thể phage và hạt nano vàng trong định tính kháng nguyên HER2 cũng như tạo Kit định tính khác cần phải sử dụng các thiết bị chuyên dụng để có thể gắn các kháng thể sau khi gắn với hạt nano vàng cũng như các thành phần khác của Kit chẩn đoán lên bề mặt giá đỡ (các tấm thử, hoặc que thử nhanh). Thiết bị này có giá thành quá đắt (khoảng gần 1 tỷ đồng VN) nên việc sử dụng các phức hệ Ab-Au mà đề tài đã tạo ra để tạo Kit định tính là chưa thể tiến hành ngay được. Để khắc phục vấn đề này và để nhanh chóng đưa sản phẩm của đề tài vào ứng dụng trong thực tiễn lâm sàng, chúng tôi đã xây dựng phương pháp định lượng kháng nguyên đích trong các

mẫu phân tích trên cơ sở các kháng thể phage đặc hiệu các kháng nguyên đích đã tạo được.

Sau đây chúng tôi trình bày chi tiết kỹ thuật định lượng kháng nguyên HER2 trong các mẫu huyết thanh, kỹ thuật này cũng được áp dụng để định lượng các kháng nguyên Cyfra 21-1 và CD33. Định lượng các kháng nguyên ung thư đặc biệt có ý nghĩa đối với các trường hợp ung thư xuất hiện do sự biểu hiện quá mức một thụ thể (ví dụ, HER2) hoặc một protein có chức năng quan trọng khác vì trong các trường hợp này việc định tính ít có giá trị trong chẩn đoán.

3.1.7. Kết quả tạo KIT định lượng kháng nguyên HER2

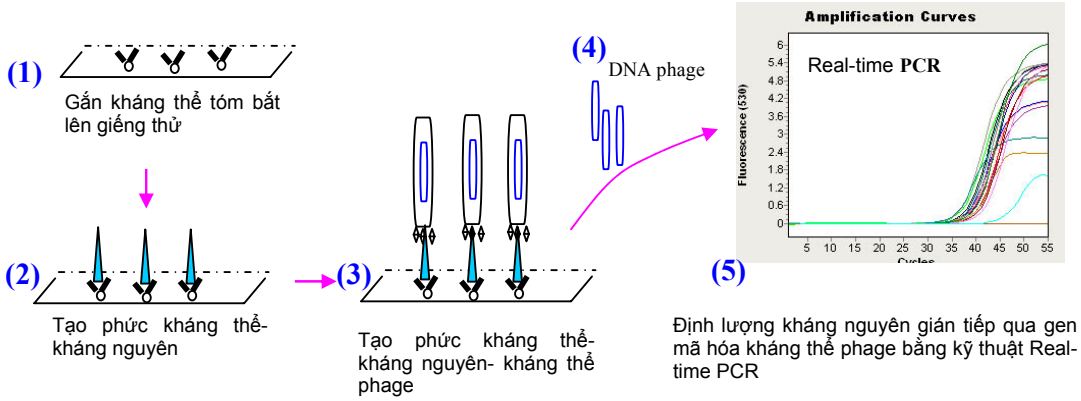
3.1.7.1. Các bước cơ bản trong định lượng kháng nguyên HER2

Kháng thể phage đặc hiệu kháng nguyên HER2 là một thành phần cơ bản của KIT định lượng kháng nguyên này trong các mẫu huyết thanh cần phân tích. Quy trình được thực hiện gồm các bước sau (sơ đồ hình 3.46):

1. Gắn kháng thể đặc hiệu HER2 lên đáy các giếng của khay thử 96 giếng.
2. Bổ sung kháng nguyên HER2 (kháng nguyên HER2 trong dung dịch chuẩn hoặc trong mẫu huyết thanh cần định lượng) vào các giếng của khay thử để tạo phức kháng thể-kháng nguyên.
3. Bổ sung các kháng thể phage đặc hiệu kháng nguyên HER2 vào các giếng thử có phức hệ kháng thể-kháng nguyên để tạo phức hệ kháng thể-kháng nguyên-kháng thể phage. Loại bỏ các kháng thể tự do không tạo phức hệ với kháng nguyên.
4. Thuỷ phân các kháng thể phage trong phức hệ đã nhận được sau khi rửa để tách DNA làm khuôn cho phản ứng định lượng real-time PCR.
5. Tiến hành định lượng kháng nguyên HER2 trong các mẫu phân tích bằng kỹ thuật **Real-time PCR** mà khuôn là DNA nhận được ở trên.

3.1.7.3. Chuẩn bị DNA khuôn để định lượng HER2

Dạng trực tiếp: Các giếng của khay thử (khay thử 96 giếng) được phủ qua đêm ở 4°C với 100 µl kháng nguyên HER2 pha trong đệm 0,05 M carbonate với các nồng độ khác nhau. ở đối chứng âm các giếng của khay thử được phủ với đệm carbonate không chứa kháng nguyên HER2. Sau khi phong toả các giếng với đệm TBS chứa 5% (w/v) sữa skim milk, thời gian 2 giờ ở 37°C, các giếng được rửa với TBS.



Hình 3.46. Sơ đồ các bước định lượng kháng nguyên trong mẫu phân tích bằng kỹ thuật PDRTI-PCR (Phage Display Real-time Immuno-PCR)

Bổ sung kháng thể phage (các phage biểu lộ scFv đặc hiệu HER2 đã tạo ra), ủ 2 giờ ở 37°C, sau đó được rửa với đệm TBS chứa 5 mM EDTA và 0,1% Tween-20 (TBSET) và nước cất để loại bỏ các kháng thể phage không gắn kết. Sau bước rửa, thêm vào mỗi giếng 50 µl nước cất, đặt khay thử trong bể nước nóng 95°C, thời gian 10 phút để thuỷ giải các phage thu dịch chứa DNA của phage (hệ gen phage).

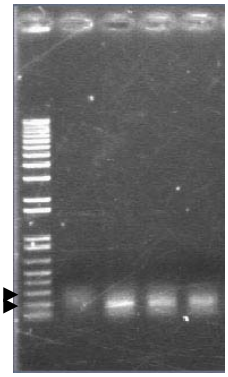
Dạng kẹp: Các giếng khay thử được phủ qua đêm ở 4°C với 100 µl kháng thể đơn chuỗi kháng HER2 (Hãng Gencript) pha trong đệm 0,05 M carbonate (pH = 9,6). Sau khi rửa bằng TBS và phong toả với TBSM, các giếng thử được bổ sung kháng nguyên HER2 với các nồng độ khác nhau. Các bước tiếp theo được thực hiện như đã trình bày ở trên.

3.1.7.4. Định lượng kháng nguyên HER2

Trước khi định lượng kháng nguyên HER2 bằng kỹ thuật real-time PCR kết hợp với kỹ thuật phage display, chúng tôi đã sử dụng dung dịch thủy giải để làm khuôn để kiểm tra sự có mặt của DNA mã hóa đoạn gen mã hóa kháng thể đặc hiệu HER2 trong phage bằng PCR thông thường.

Hỗn hợp PCR gồm: 5 µl dịch thuỷ giải phage; 1x PCR buffer; 0,2 mM mỗi loại mồi (mồi 1 là RTKTHER2F: 5'-accatttcatcattgcagcc-3'; mồi 2: RTKTHER2R:5'-accaaaccacctcctgattc-3'); 0.25 mM mỗi loại dNTP, 0.01% BSA, 2.5 U *Taq* DNA *polymerase* và nước cất đủ thể tích 50 µl.

Chu trình nhiệt của PCR gồm: 1 chu kỳ: 94°C thời gian 5 phút, sau đó 30 chu kỳ: 94°C thời gian 1 phút, 45^{0}C thời gian 45 giây, 72°C thời gian 1 phút, sau cùng là 1 chu kỳ 72°C thời gian 5 phút. PCR được thực hiện trên máy biến nhiệt "GeneAmp$^{\#}$PCR System 9700" (Applied Biosystems). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 3.47).



Hình 3.47. Điện di đồ kết quả PCR kháng nguyên HER2

1: Chỉ thị phân tử

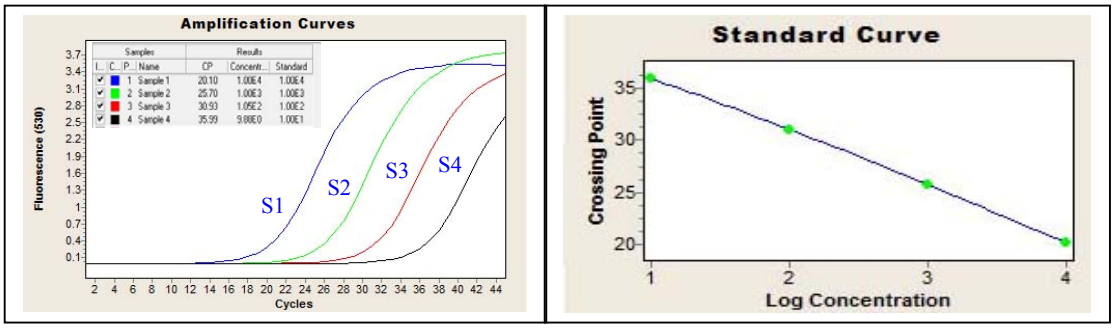
2-5: Sản phẩm PCR với khuôn là dịch thủy giải từ các giếng đã được phủ kháng nguyên HER2 với các nồng độ tương ứng: 1500 ng/giếng; 150 ng/giếng; 15 ng/giếng và 1,5 ng/giếng

Trên hình 3.47, ta thấy sản phẩm PCR đều xuất hiện băng sáng đậm có kích thước tương ứng với kích thước 230 bp là kích thước phù hợp theo tính toán. Hơn nữa, chỉ có một băng sáng xuất hiện trên bản điện di đồ nên có thể kết luận rằng các mồi sử dụng là đặc hiệu. Tuy nhiên, các sản phẩm PCR thu được khi sử dụng 5 µl dịch thủy giải từ các giếng phủ nồng độ kháng nguyên khác nhau đều có độ sáng đậm tương đương nhau, nghĩa là chỉ có thể định

tính sự có mặt của gen mã hóa scFv đặc hiệu HER2 trong mẫu phân tích. Hay nói đúng hơn, nếu sử dụng PCR thông thường trong trường hợp này ta chỉ có thể xác định sự có mặt của kháng nguyên trong các mẫu phân tích, không thể xác định được lượng kháng nguyên trong mẫu phân tích.

Để tiến hành phân tích định lượng kháng nguyên HER2 trong các mẫu phân tích, cần xây dựng đường chuẩn nồng độ. Đường chuẩn nồng độ có thể được sử dụng cho một số lần phân tích hoặc được xây dựng mới đối với mỗi lần phân tích. Quy trình định lượng được thực hiện với thành phần của Real-time PCR gồm: 25 µl 1x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix; 1 µl 0,2 mM mỗi loại mồi (mồi 1 là RTKTHER2F: 5'-accatttcatcattgcagcc-3', mồi 2 là RTKTHER2R: 5'-accaaaccacctcctgattc-3); 0.5 µl QuantiTect RT Mix, 5 µl DNA khuôn (dịch thuỷ giải phage); 1 µl Uracil-N-glycosylase, heat-labile, 17,5 µl RNase-free water. Mẫu đối chứng âm tính không chứa DNA khuôn.

Chu trình nhiệt của phản ứng gồm: 94°C trong 5 phút, sau đó 50 chu kỳ: 95°C thời gian 45 giây, 55°C thời gian 70 giây. Kết quả xây dựng đường chuẩn đối với kháng nguyên HER2 được thể hiện trên hình 3.48.

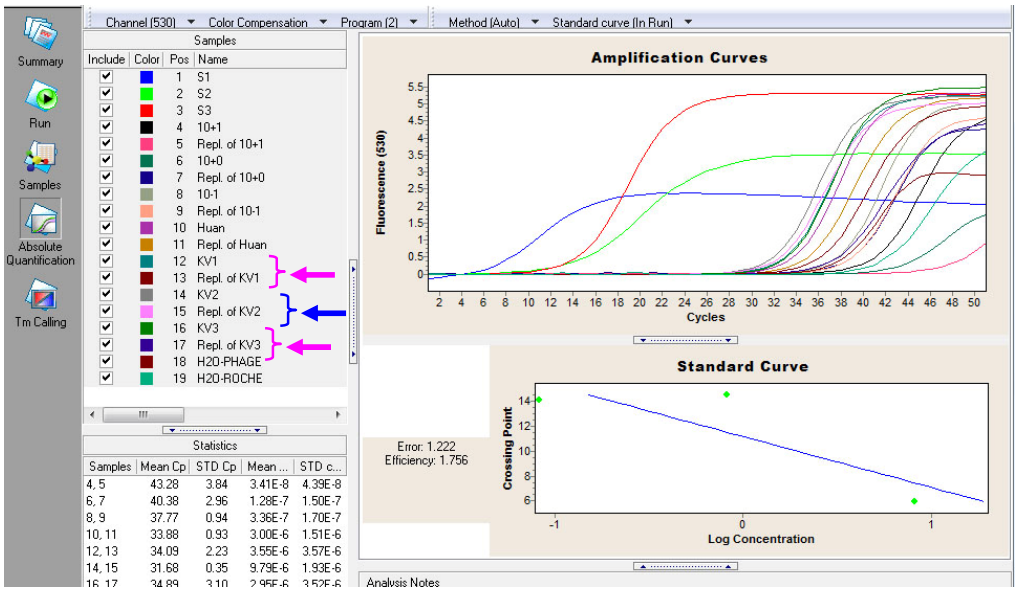


Hình 3.48. Đồ thị tín hiệu huỳnh quang và đồ thị đường chuẩn.

PCR định lượng với các mẫu đối chứng dương có giá trị Ct là S1≈20,1/ S2≈ 25,7/ S3≈ 30,9/ S4≈35,9 tương ứng với dịch thủy phân thu được ở các giếng của khay thử khi phủ kháng nguyên HER2/neu với hàm lượng: 1500 ng/giếng (S1); 150 ng/giếng (S2); 15 ng /giếng (S3) và 1,5 ng /giếng (S4)

3.1.7.5. Định lượng kháng nguyên HER2 trong các mẫu huyết thanh

Để kiểm nghiệm KIT định lượng kháng nguyên HER2 trong thực tiễn, chúng tôi đã bước đầu thử nghiệm sử dụng quy trình định lượng kháng nguyên thông qua phức hệ kháng thể-DNA đối với các mẫu huyết thanh đã được chẩn đoán là ung thư vú (mẫu do Bệnh viện K cung cấp). Kết quả định lượng được trình bày trên hình 3.49.



Hình 3.49. Kết quả định lượng kháng nguyên HER2 trong các mẫu huyết thanh

Kết quả định lượng:

- Mẫu KV1 có nồng độ Ag HER2 là 4,7 x 1,5 ng/ml = 7,05 ng/ml,
- Mẫu KV2 (1,13 x 15 ng/ml) = 16,95 ng/ml,
- Mẫu KV3 (3,94 x 1,5 ng/ml) = 5,91 ng/ml.

Như vậy: Mẫu KV1 và KV3 là dạng ung thư vú không phụ thuộc HER2 vì hàm lượng HER2 thấp hơn ngưỡng giới hạn (15 ng/ml), (Azambuja, 2008). Mẫu KV2 là ung thư vú có liên quan tới sự biểu hiện quá mức kháng nguyên HER2, vì lượng kháng nguyên HER2 trong huyết thanh (16,95 ng/ml) cao hơn ngưỡng giới hạn.

3.1.8. Kết quả xác định đặc tính của kháng thể đặc hiệu HER2

3.1.8.1. Kết quả xác định cấu trúc của kháng thể đặc hiệu HER2

Sử dụng kháng thể đặc hiệu HER2 đã tinh sạch trên cột Ni-NTA để phân tích cấu trúc bậc nhất bằng khối phổ. Trong quá trình phân tích protein (kháng thể) được xử lý với trypsin. Theo lý thuyết, trypsin sẽ cắt protein tại các vị trí axit amin R (Arginine) và K (Lysine). Kết quả phân tích thực tế chúng tôi nhận được đã chứng minh sản phẩm biểu hiện và tinh sạch có cấu trúc bậc nhất (trình tự amino axit) là phù hợp với tính toán lý thuyết. Khi so sánh với các dữ liệu trong Ngân hàng dữ liệu quốc tế thì sản phẩm mà chúng tôi nhận được chứa các đoạn peptide thuộc trình tự của kháng thể kháng HER2 (hoặc tên gọi khác là anti-Erbb2).

Kết quả nhận diện các đoạn peptide khi phân tích khối phổ được trình bày tại các bảng 3.7, bảng 3.8, bảng 3.9 và bảng 3.10.

Bảng 3.7. Đoạn peptide được nhận diện là **LLIYSASYR**

1. gi|22219205 **Mass:** 23797 **Total score:** 44 **Peptides matched:** 4
Chain L, Crystal Structure Of The Anti-Erbb2 Fab2c4

☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
11	543.51	1085.00	1084.59	0.41	0	(12)	7	LLIYSASYR
12	543.52	1085.02	1084.59	0.43	0	44	1	LLIYSASYR
13	543.52	1085.02	1084.59	0.43	0	(11)	2	LLIYSASYR
14	543.52	1085.03	1084.59	0.44	0	(7)	3	LLIYSASYR

Bảng 3.8. Đoạn peptide được nhận diện là **FTLSEIK**

2. gi|4502747 **Mass:** 43149 **Total score:** 43 **Peptides matched:** 3
cyclin-dependent kinase 9 [Homo sapiens]

☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
3	419.39	836.76	836.46	0.30	0	43	1	FTLSEIK
4	419.39	836.77	836.46	0.31	0	(22)	1	FTLSEIK
5	419.40	836.78	836.46	0.32	0	(23)	1	FTLSEIK

Bảng 3.9. Đoạn peptide được nhận diện là FTLSVDR

3. gi|22219206 **Mass:** 23925 **Total score:** 43 **Peptides matched:** 3
Chain H, Crystal Structure Of The Anti-Erbb2 Fab2c4

☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
3	419.39	836.76	836.44	0.32	0	43	1	FTLSVDR
4	419.39	836.77	836.44	0.33	0	(22)	1	FTLSVDR
5	419.40	836.78	836.44	0.34	0	(16)	5	FTLSVDR

Bảng 3.10. Đoạn peptide được nhận diện là **NTLYLQMDSLR**

4. gi|11137444 **Mass:** 10200 **Total score:** 39 **Peptides matched:** 1
immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]

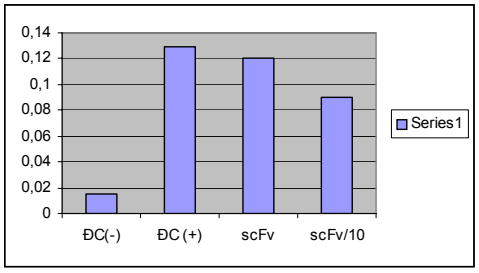
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
24	677.11	1352.20	1352.68	-0.48	0	39	1	NTLYLQMDSLR

3.1.8.2. Kết quả xác định tính đặc hiệu kháng thể đặc hiệu HER2

Để kiểm tra tính đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên HER2, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra bằng phản ứng ELISA. Kết quả ELISA được thể hiện trên bảng 3.11 và hình 3.50

Bảng 3.11. Kết quả so sánh khả năng gắn kết của scFv với kháng thể của hãng Genscrip

Mẫu	$OD_{450nm-650nm}$
ĐC(-)	0,015
ĐC (+)	0,129
scFv	0,12
scFv/10	0,09



Hình 3.50. Kết quả so sánh khả năng gắn kết của scFv với kháng thể của hãng Genscrip
1. Đối chứng âm là giếng không chứa sản phẩm scFv
2. Đối chứng dương là dung dịch kháng thể kháng HER2 (100 ng/ml) của Hãng **Genscrip**
3. scFv là dung dịch sau tinh sạch (100 ng/ml)
4. scFv/10 là dung dịch sau tinh sạch (10 ng/ml)

Kết quả ELISA cho thấy kháng thể sau tinh sạch có khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với kháng nguyên HER2 tương đương với đối chứng dương (kháng thể đặc hiệu HER2 của Hãng Genscrip). Kết quả này cho phép một lần nữa khẳng định kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 đã thu được

có khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với kháng nguyên HER2 tương đương với sản phẩm của hãng **Genscrip** khi kiểm tra bằng ELISA.

3.1.8.3. Kết quả xác định độc tính cấp của kháng thể trên chuột

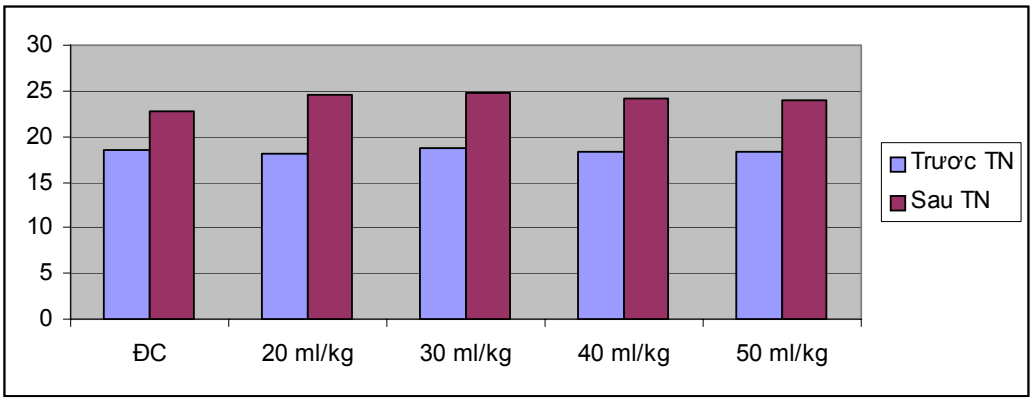
Trọng lượng cơ thể chuột: Chuột ở nhóm chứng và các nhóm thử đều tăng trọng lượng cơ thể trong thời gian theo dõi được trình bày trên bảng 3.12, hình 3.51.

Bảng 3.12. Kết quả trọng lượng cơ thể chuột sau khi uống kháng thể

STT	**Nhóm 1** (20,0 ml/kg chuột)		STT	**Nhóm 2** (30,0 ml/kg chuột)	
	Trước TN (g)	**Sau TN (g)**		**Trước TN (g)**	**Sau TN (g)**
1	18,0	23,5	11	18,5	25,5
2	18,0	23,5	12	18,5	24,0
3	18,5	24,0	13	18,5	23,5
4	18,0	25,0	14	19,0	24,0
5	18,0	24,5	15	19,0	24,5
6	18,5	26,0	16	19,0	25,5
7	19,0	25,5	17	19,0	25,0
8	18,0	24,5	18	18,5	24,5
9	18,0	25,0	19	18,5	26,5
10	18,0	24,0	20	18,0	25,0

STT	**Nhóm 3** (40,0 ml/kg chuột)		STT	**Nhóm 4** (50,0 ml / kg chuột)	
	Trước TN (g)	**Sau TN (g)**		**Trước TN (g)**	**Sau TN (g)**
21	18,0	25,0	31	18,5	24,0
22	18,0	24,5	32	18,0	25,0
23	18,0	24,0	33	18,0	23,5
24	18,5	25,0	34	18,5	23,0
25	18,0	25,5	35	18,0	24,5
26	18,5	24,5	36	19,0	24,0
27	18,0	23,5	37	18,5	23,5
28	19,0	23,0	38	18,0	25,0
29	18,5	24,0	39	18,0	24,0
30	18,0	23,5	40	18,5	23,0

STT	Nhóm chứng (1,0 ml NaCl 0,9%)		STT	Nhóm chứng (1,0 ml NaCl 0,9%)	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
41	18,0	25,5	46	18,5	27,0
42	18,5	25,0	47	19,0	26,5
43	18,5	23,5	48	19,0	25,0
44	18,0	24,5	49	18,5	24,5
45	18,5	26,0	50	19,0	23.5



Hình 3.51. Sự thay đổi trọng lượng chuột ở các lô uống thuốc

Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột

- Nhóm chứng: Hoạt động và ăn uống bình thường
- Các nhóm thử: Sau khi uống thuốc và trong 7 ngày theo dõi nhóm thử, không nhận thấy có biểu hiện gì khác thường so với nhóm chứng.

Quan sát dấu hiệu ngộ độc

- Không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc ở các nhóm thử trong thời gian theo dõi.
- Không có chuột chết trong quá trình thử nghiệm.

Kết luận

Mẫu thử AntiHer 2 antibody gửi tới yêu cầu thử độc tính cấp trên chuột nhắt trắng có kết quả như sau: Dùng nguyên mẫu thử tiêm vào tĩnh mạch đuôi chuột với các mức liều từ 10,0 ml – 50 ml mẫu thử/ kg chuột không nhận thấy biểu hiện gì khác thường, không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi. Tất cả chuột đều ăn uống, hoạt động bình thường. Không xác định được liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD_{50}) vì không tìm được liều gây chết chuột.

3.1.8.4. Kết quả xác định hoạt tính kháng thể trên dòng tế bào ung thư

Để thử nghiệm hoạt tính làm tan tế bào của kháng thể tái tổ hợp có gắn melittin (immunotoxin) trên các dòng tế bào ung thư có ký hiệu LU.

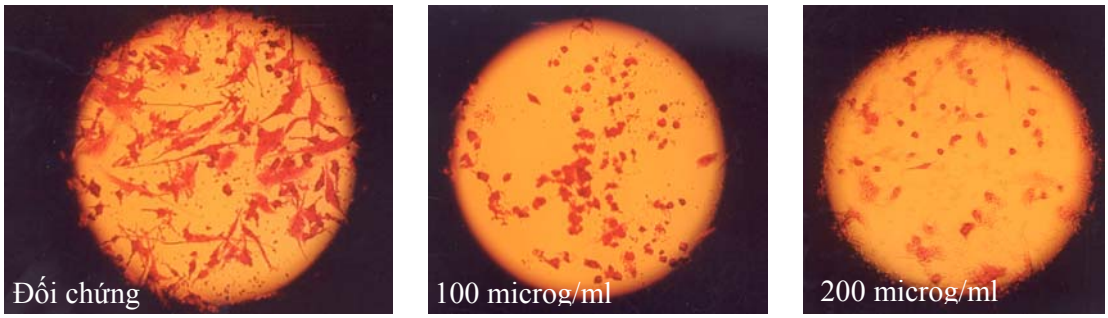
Các tế bào ung thư LU được nuôi cấy trên các đĩa môi trường DMEM, mỗi đĩa sử dụng 2 ml dịch tế bào. Lần lượt thêm vào các đĩa môi trường nuôi cấy tế bào 0,5 ml và 1ml dịch immunotoxin (nồng độ kháng thể tái tổ hợp là 200 µg/ml). Các đĩa đối chứng không được bổ sung immunotoxin. Kết quả sau hai ngày nuôi cấy, được trình bày ở bảng 3.13 và hình 3.52.

Bảng 3.13. Kết quả ức chế tế bào nuôi cấy khi bổ sung kháng thể tái tổ hợp

Dòng tế bào	Đĩa đối chứng	Số tế bào nguyên vẹn trong môi trường bổ sung 100 µg/ml kháng thể tái tổ hợp	Số tế bào nguyên vẹn trong môi trường bổ sung 200 µg/ml kháng thể tái tổ hợp
Tế bào ung thư LU	10^7 tế bào/mL	10^2 tế bào/mL	0

Từ kết quả trên cho thấy với các đĩa bổ sung 1ml dịch chứa kháng thể tái tổ hợp (immunotoxin), các tế bào bị phá vỡ hoàn toàn. Với các đĩa được bổ

sung 0,5 ml dịch chứa kháng thể tái tổ hợp, các tế bào bị phá vỡ trong khoảng từ 80 đến 90%.



Hình 3.52. Ảnh chụp kết quả thử nghiệm khả năng ức chế, làm tan tế bào ung thư của kháng thể đơn dòng dạng ghép trên dòng tế bào ung thư nuôi cấy.

3.1.9. Bàn luận và kết luận về thu nhận kháng thể đặc hiệu HER2

Phương pháp thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 mà đề tài đã thực hiện bao gồm việc thu nhận các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên có bản chất từ gà để tạo KIT chẩn đoán là một trong điểm mới, sáng tạo vì: kháng thể gà (IgY) có cấu tạo tương tự như kháng thể người (IgG). Hơn nữa, khi sử dụng gà để gây miễn dịch với các kháng thể có nguồn gốc từ người sẽ có đáp ứng miễn dịch mạnh hơn so với khi gây miễn dịch ở động vật có vú như chuột, thỏ, v.v.. do trong quá trình tiến hóa nhiều protein có tính bảo thủ cao. Đáp ứng miễn dịch ở gà đã gây miễn dịch với kháng nguyên HER2 là khá cao so với đối chứng (hình 3.13). Kết quả này cũng phù hợp với các kết quả mà Sapats và cộng sự (2002) đã gây miễn dịch ở gà với virus gây bệnh Gumboro hoặc Andris-Widhopf và cộng sự (2002) tiến hành nghiên cứu tạo các đoạn kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật phage ở gà.

Phương pháp thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên thông qua việc thu nhận các gen mã hóa kháng thể từ các tế bào tủy xương và tế bào lách của gà đã gây miễn dịch để tạo thư viện các phage biểu lộ các đoạn scFv trên bề

mặt là một trong các **phương pháp mới**, **hiện đại**, cho phép sàng lọc, thu nhận các kháng thể có ái lực cao đối với các kháng nguyên đích.

Một điểm cần được nghiên cứu sâu hơn là khả năng tích lũy các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đã gây miễn dịch trong gà. Nếu thu nhận được các kháng thể này ở trứng gà (vì theo lý thuyết các kháng thể gà (IgY) thường được tích lũy lượng lớn trong trứng gà) thì khả năng sử dụng các kháng thể này là rất lớn bởi khi đó việc bảo quản các kháng thể là rất đơn giản và đặc biệt là có thể sử dụng trực tiếp kháng thể trong trứng gà mà không cần phải tiến hành tách chiết và tinh chế kháng thể.

Theo nội dung đã đăng ký trong thuyết minh đề tài và trong hợp đồng nghiên cứu, thì đề tài chỉ cần xây dựng Kit định tính kháng nguyên HER2. Vì vậy, phương pháp định lượng kháng nguyên (KIT định lượng) mà đề tài đã xây dựng dựa trên nguyên tắc phản ứng đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể với sự phối hợp các kỹ thuật phage display và kỹ thuật real-time PCR là **một điểm mới, độc đáo** bởi phương pháp này có kết hợp các đặc tính ưu việt về độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật phage display, kỹ thuật miễn dịch và kỹ thuật định lượng real-time PCR. Sử dụng phương pháp định lượng (KIT định lượng) đã xây dựng trên cơ sở kháng thể phage đặc hiệu HER2 chúng tôi đã định lượng được nồng độ kháng nguyên HER2 trong các mẫu huyết thanh ở mức nồng độ nano gram với độ đặc hiệu 98,2% và đạt độ nhạy là 99%. Kết quả này cũng cho phép khẳng định việc sử dụng kháng thể phage và kỹ thuật real-time PCR không những có khả năng định tính mà còn cho phép định lượng kháng nguyên trong các mẫu phân tích. Kết quả này cũng phù hợp với các kết quả mà Andreas Fischer và cộng sự đã sử dụng các kỹ thuật real-time PCR và kháng thể phage để định lượng of staphylococcal enterotoxins; hoặc Sano và cộng sự (2002), Yong-Chao Guo và cộng sự (2006) đã sự dụng kỹ thuật real-tiem PCR với kháng thể phage (scFv biểu lộ trên phage) để định lượng protein gây bệnh bò điên (prion protein) trong các mẫu thực phẩm. Có

thể nhận thấy rằng đây là một trong những phương pháp định lượng protein nhanh, nhạy và có độ chính xác cao và hiện đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu nhằm tạo ra những bộ Kit định lượng chính xác các tác nhân gây bệnh trong đó có các protein kháng nguyên đặc hiệu ung thư.

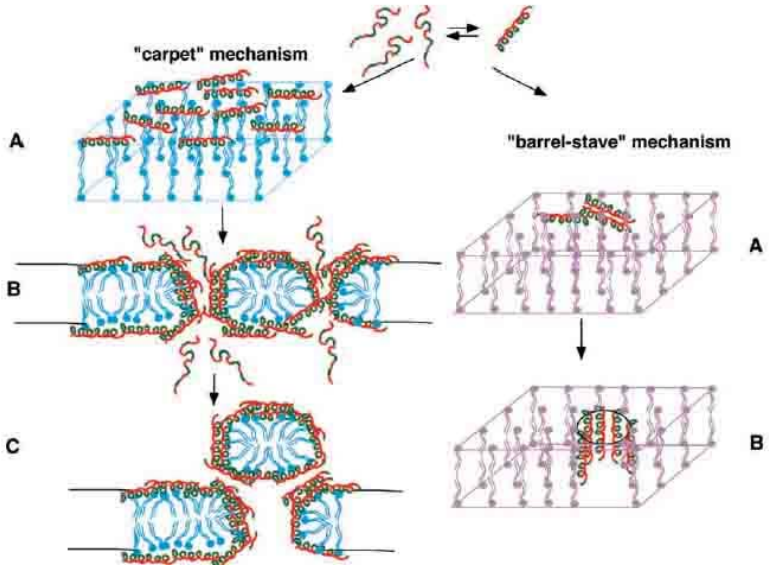
Một trong những điều nan giải của việc sản xuất các kháng thể tái tổ hợp là sử dụng hệ biểu hiện nào để thu nhận được các kháng thể tái tổ hợp có được hoạt tính mong muốn với số lượng đủ cho sản xuất thuốc điều trị. Vì hiện nay, hệ biểu hiện *E. coli,* mặc dù, có những lợi thế như đơn giản, nhanh nhưng khả năng nhận được các kháng thể có hoạt tính mong muốn là rất thấp do không có các quá trình hiệu chỉnh sau phiên mã, hơn nữa việc loại bỏ các nội độc tố, một thành phần của màng tế bào vi khuẩn gram âm là rất phức tạp. Chính vì vậy, các kháng thể tái tổ hợp được biểu hiện ở *E. coli* chỉ có ý nghĩa nghiên cứu khoa học và đánh giá khả năng biểu hiện của gen tái tổ hợp đã tạo ra. Còn đối với hệ biểu hiện sử dụng các vi khuẩn gram dương như biểu hiện ở *Bacillus* thì có lợi thế hơn so với ở *E. coli* là thành tế bào của vi khuẩn gram dương không chứa nội độc tố, nhưng cũng giống như ở *E. coli*, các kháng thể tái tổ hợp biểu hiện ở vi khuẩn gram dương cũng chưa được hiệu chỉnh hoàn toàn sau dịch mã. Trong khi đó biểu hiện kháng thể tái tổ hợp ở các tế bào bậc cao như ở nấm men, tảo thì hiệu quả biểu hiện còn thấp nên giá thành sản phẩm là quá lớn. Kết quả biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp scFv đặc hiệu HER2 và CD33 mà đề tài đã thực hiện cũng không nằm ngoài quy luật này. Mặc dù các sản phẩm đã được biểu hiện và tinh sạch trên cột sắc ký ái lực có độ tinh sạch cao nhưng để thu nhận được một lượng kháng thể đủ cho các thử nghiệm là rất tốn kém, chưa nói tới lượng cần cho tạo Kit chẩn đoán và nguyên liệu để tạo thuốc điều trị.

Vì vậy, việc nghiên cứu tìm ra một hệ biểu hiện hiệu quả các kháng thể tái tổ hợp đang là một trong các mục tiêu nghiên cứu của nhiều nhà khoa học, nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Việc sử dụng trực tiếp các kháng thể

scFv biểu lộ trên phage làm nguyên liệu để tạo Kit chẩn đoán mà đề tài đã thực hiện đã góp phần giải quyết vấn đề trên. Kết quả tạo Kit định lượng kháng nguyên HER2 với việc sử dụng trực tiếp các scFv biểu lộ trên phage đã khẳng định hướng nghiên cứu này là có hiệu quả. Còn việc sử dụng trực tiếp các kháng thể tái tổ hợp biểu lộ trên phage trực tiếp làm nguyên liệu thuốc điều trị cần được tiếp tục nghiên cứu.

Kết luận chung về thu nhận kháng thể đặc hiệu HER2

Quy trình thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 từ việc thu nhận kháng nguyên tái tổ hợp đến việc gây miễn dịch, thu nhận kháng thể đặc hiệu và sử dụng làm nguyên liệu tạo Kit chẩn đoán và nguyên liệu cho tạo chế phẩm thuốc điều trị mà đề tài đã xây dựng là đơn giản, hiệu quả và có thể áp dụng đối với các kháng nguyên khác. Kháng thể tạo được ở các dạng phù hợp cho các mục đích sử dụng khác nhau, ví dụ kháng thể scFv biểu lộ trên phage được sử dụng như một thành phần cơ bản trong bộ Kit chẩn đoán, còn khi được ghép với các vùng hằng định sẽ làm tăng tính bền của kháng thể để làm nguyên liệu cho việc bào chế thuốc điều trị.



Hình 3.53. Mô hình làm tan tế bào của melittin

Một trong số các sản phẩm của đề tài là Immunotoxin-HER2 sản phẩm của gen tái tổ hợp gồm phần gen mã hóa kháng thể scFv đặc hiệu kháng nguyên HER2 và phần gen mã hóa peptide melittin. Melittin là một peptide gồm 26 amino acid có khả năng làm tan tế bào theo 2 cơ chế khác nhau: "**Carpet**" và "**Balle-stave**" (hình 3. 53).

Đây cũng là một trong các kết quả mới của đề tài nhằm đa dạng hóa các dạng kháng thể đặc hiệu HER2 để tạo thuốc điều trị. Kết quả thử nghiệm hoạt tính làm tan tế bào nuôi cấy khi bổ sung Immunotoxin vào dịch nuôi cấy đã khẳng định hoạt tính của melittin khi được các kháng thể đưa tới các tế bào ung thư biểu hiện các kháng nguyên đích.

Quy trình thu nhận kháng thể trên đây có thể áp dụng đối với các kháng thể đặc hiệu với các kháng nguyên khác nhau.

Sau đây chúng tôi trình bày tóm tắt các nội dung nghiên cứu thu nhận kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1 trong ung thư phổi và kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 trong ung thư máu theo quy trình như đối với kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 trong ung thư vú.

3.2. TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU CYFRA 21-1

3.2.1. Tổng quan về ung thư phổi

Ung thư phổi còn được gọi là ung thư phế quản - phổi nguyên phát vì ung thư phổi thường phát triển từ tổ chức biểu mô phế quản, rất hiếm khi phát triển từ biểu mô phế nang. UTP thường là một khối rắn chắc, khi phát hiện được thường đã có đường kính từ 2-10 cm hoặc còn lớn hơn. Mặt ngoài khối u thường gồ ghề, nhiều múi, nhăn nhúm. Nếu sử dụng các phương pháp chẩn đoán thông thường thì việc phát hiện ung thư phổi ở giai đoạn khối u đã phát triển lớn thì điều trị sẽ kém hiệu quả. Chính vì vậy, các nhà khoa học đang nỗ lực tìm kiếm và tạo ra các phương pháp chẩn đoán phân tử nhằm đem lại kết quả vừa nhanh vừa chính xác giúp cho việc điều trị đạt hiệu quả cao nhất. Những người mắc UTP thường có triệu chứng:

- Ho không khỏi và ngày càng nặng hơn.
- Thường xuyên thấy đau ngực.
- Ho ra máu.
- Khó thở, ngạt mũi, khàn giọng.
- Viêm phổi và viêm phế quản tái đi tái lại.
- Phù nề vùng mặt và cổ.
- Mất cảm giác ngon miệng hoặc giảm cân.
- Mệt mỏi. Tuy nhiên, các triệu chứng này cũng có thể xuất hiện ở các bệnh khác về phổi, vì vậy muốn khẳng định chắc chắn bệnh nhân có mắc UTP hay không cần phải thực hiện các chẩn đoán y học đáng tin cậy. Theo nghiên cứu của Tổ chức Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (International Agency for Research on Cancer – IARC), đa số ung thư phổi xuất phát từ lớp biểu mô phế quản nên UTP còn được gọi chính xác hơn là *ung thư biểu mô phế quản.* UTP thường được chia làm hai loại chính: ***UTP tế bào nhỏ*** (small-cell carcinoma, SCC) ***và UTP tế bào không nhỏ*** (non small-cell carcinoma, NSCC), tuỳ thuộc

vào hình dạng tế bào dưới kính hiển vi. Mỗi loại ung thư phát triển và lan theo những cách khác nhau.

UTP tế bào nhỏ (SCC) chiếm khoảng 20% trong số các bệnh UTP, loại này thường phát triển ở phế quản - phổi (không ở ngoại vi phổi). Mặc dù tế bào ung thư là những tế bào nhỏ, nhưng chúng phát rất nhanh tạo thành những khối u lớn, lan rất xa trước khi có triệu chứng lâm sàng, nhiều trường hợp khi phát hiện không còn mổ được nữa, tử vong nhanh. Đây là loại ung thư có quan hệ mật thiết nhất đối với thuốc lá và cũng là loại ung thư ác tính nhất

UTP tế bào không nhỏ (NSCC) thường gặp (khoảng 80%) hơn UTP tế bào nhỏ và nó thường phát triển và lan chậm hơn. Có ba loại NSCC chủ yếu. Chúng được đặt tên theo loại tế bào từ đó ung thư phát triển:

1. *Ung thư tế bào tuyến* (adenocarcinoma, AC): xuất phát từ tế bào tuyến nhầy trong thành phế quản, chiếm tỷ lệ 35-40% các loại UTP. Đây là dạng UTP phổ biến nhất ở phụ nữ và những người không hút thuốc.
2. *Ung thư tế bào sừng* (squamous-cell carcinoma; SCC): hay xuất hiện ở phế quản lớn và làm chít hẹp lòng phế quản. Đây là dạng UTP phổ biến nhất ở nam giới, chiếm tỷ lệ khoảng 30-35% các loại UTP.
3. *Ung thư tế bào lớn* (large-cell carcinoma; LCC): hình thành gần bề mặt phổi, chiếm tỷ lệ khoảng 10-15% các loại UTP

Một nguyên nhân quan trọng và đáng kể nhất gây ra UTP là do thuốc lá, chính vì vậy mà đây là một căn bệnh toàn cầu, không chỉ có ở riêng quốc gia nào. Đáng chú ý là Việt Nam nằm trong số các nước có tỷ lệ hút thuốc rất cao, tỷ lệ UTP có lẽ còn cao hơn. Theo một thống kê về ung thư trong cộng đồng Việt Nam ở California, UTP là ung thư thường gặp ở đàn ông Việt Nam.

UTP chiếm ưu thế ở nam giới trong lứa tuổi 50-75. Đa số UTP xuất hiện ở những người đã hoặc đang hút thuốc lá (80%) cộng thêm 5% do hậu quả của sự tiếp xúc thụ động với khói thuốc lá. Liều lượng sinh ung thư tùy thuộc vào mức độ tiếp xúc với thuốc lá nặng hay nhẹ, vào số năm hút thuốc, số điếu hút

trong ngày và phần nhựa có trong điếu thuốc. 10-13% số người nghiện thuốc lá có nguy cơ ung thư phổi với một thời kỳ tiềm ẩn từ 30-40 năm (tính từ lúc mới bắt đầu hút thuốc lá cho đến khi bắt đầu xuất hiện UTP). Sau khi ngừng hút thuốc lá 10-15 năm, nguy cơ mắc UTP sẽ hạ thấp bằng với nguy cơ mắc ở những người không hút thuốc lá. Nguy cơ bị UTP cũng tăng với những người thường xuyên tiếp xúc với khói thuốc do những người nghiện thở ra.

Hiện nay, trên thế giới tỷ lệ mắc UTP trong tổng số các bệnh ung thư khoảng 13%, nhưng đây lại là căn bệnh gây tử vong cao nhất trong số các bệnh ung thư, chiếm đến 31% số người chết hàng năm do ung thư. UTP là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở Mỹ, tốc độ tử vong cao (sau năm năm mắc UTP chỉ có 14% sống sót).

Ở nước ta, UTP là một căn bệnh khá phổ biến. Theo Đỗ Bá Hiển (1979), UTP chiếm tỷ lệ 5,9% các loại ung thư ở nam giới. UTP đứng hàng thứ 5 sau ung thư vòm họng (14%), ung thư dạ dày (12,8%), ung thư dương vật (10%) và ung thư gan (9,3%). Trong một cuộc điều tra 2 năm (1982-1983) tại 18 bệnh viện ở Hà Nội, Nguyễn Công Thụy và cộng sự (1987) đã thu thập được kết quả của 2253 bệnh nhân ung thư, trong đó, đứng hàng đầu là ung thư dạ dày (15,5%), sau đó là UTP (14%).

Những thống kê gần đây của 4 bệnh viện khu vực Hà Nội (Bệnh viện Lao và bệnh Phổi, Bệnh viện Quân y 108, Bệnh viện 103, Bệnh viện Việt - Đức) đã phẫu thuật 769 ca UTP. UTP hay gặp ở nam hơn nữ, lứa tuổi hay gặp là 50-60 tuổi.

Như vậy, có thể thấy, qua thời gian thì tỷ lệ mắc UTP ở nước ta ngày càng cao, có lẽ liên quan đến việc mức sống của người dân đã tăng lên, kéo theo số người hút thuốc lá ngày càng nhiều, tạo điều kiện cho UTP ngày càng phát triển.

3.2.2. Ung thư phổi liên quan tới sự biểu hiện mạnh CYFRA 21-1

Hiện nay có khá nhiều chỉ thị sinh học liên quan đến ung thư phổi, trong đó các nhà khoa học đang rất quan tâm đến một chỉ thị mới, có độ nhạy cao với UTP là Cyfra 21-1. Cyfra 21-1 nằm trong nhóm chỉ thị cytokeratin, một cấu trúc trong bộ khung tế bào. Cytokeratin, thuộc họ sợi trung gian, đặc biệt hữu ích trong chẩn đoán ung thư. Chính vì tầm quan trọng của nó, các nhà ung thư học hiện nay đang tiến hành các nghiên cứu về cấu trúc và vai trò của cytokeratin nhằm chống lại sự hoành hành của căn bệnh ung thư.

Các cấu trúc sợi đã được quan sát trong nhân và tế bào chất từ lâu, nhưng chỉ gần đây, những kiến thức về chức năng thực sự của bộ khung tế bào mới tăng lên nhanh chóng. Trong tế bào nhân chuẩn, bộ khung tế bào được tạo thành từ 3 loại cấu trúc sợi, khác nhau về hình thái: vi sợi (microfilaments), sợi trung gian (intermidiate filaments) và vi ống (microtubules). Bộ khung tế bào hợp nhất được hình thành từ hệ thống 3 loại sợi là yếu tố then chốt trong một vài quá trình như phân bào, vận động và tương tác tế bào với tế bào.

Cytokeratin biểu mô (sợi trung gian nhóm I và II) được hình thành trong quá trình phát sinh và có liên quan gần gũi về mặt sinh hoá và miễn dịch. Ngày nay, hơn 20 loại cytokeratin khác nhau đã được biết đến và được chia thành các nhóm I và II dựa vào tính tương đồng trình tự. Các cytokeratin từ 1-8 tạo thành nhóm II (53-68 kDa, các thành phần protein trung tính đến bazơ), còn cytokeratin 9-20 tạo thành nhóm I (40-56 kDa, các protein axit), trong đó các cytokeratin 8, 18, 19 có nhiều nhất ở các tế bào biểu mô đơn giản.

Cytokeratin biểu hiện khác nhau ở các dạng tế bào biểu mô, ở quy mô phát triển và biệt hóa của các mô. Trong suốt quá trình biến đổi của tế bào từ bình thường thành tế bào ác tính, mô hình cytokeratin thường được duy trì và đặc tính này làm cytokeratin được ứng dụng như các chỉ thị khối u. Những biến đổi sau dịch mã của các vùng (domain) ở trung tâm rất hiếm thấy, nhưng những biến đổi này xuất hiện khá nhiều ở vùng đầu N và C, bao gồm sự

phosphoryl hoá, glycosyl hoá và sự chuyển glutamin hóa. Những biến đổi này làm tăng tính tan và gây ra sự sắp xếp lại các sợi.

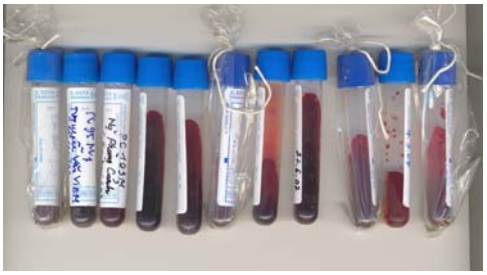
Giá trị y học của việc nhận biết các mảnh cytokeratin trong dịch cơ thể chính là việc phát hiện sớm và đánh giá nhanh hiệu quả điều trị đối với các khối u biểu mô ác tính. Ba chỉ thị cytokeratin được ứng dụng nhiều nhất trong y học là các kháng nguyên TPA (tissue polypeptide antigen), kháng nguyên TPS đặc hiệu mô (tissue polypeptide specific antigen) và Cyfra 21-1.

Cyfra 21-1 có độ nhạy cao đối với hầu hết các loại UTP và chỉ thị Cyfra 21-1 mang các đặc điểm của cytokeratin đó là: (1) Đặc trưng biểu mô; (2) Không thay đổi cấu trúc ở tế bào ung thư; (3) Biểu hiện thấp ở người khoẻ, cao ở người bệnh NSCLC. Chỉ thị này còn có ưu điểm của chỉ thị thể dịch đó là dễ kiểm tra. Đây cũng chính là lý do đề tài chọn kháng nguyên Cyfra 21-1 là đích để tạo kháng thể đặc hiệu làm nguyên liệu cho KIT chẩn đoán và chế phẩm điều trị UTP.

3.2.3. Kết quả thu nhận kháng nguyên CYFRA 21-1

3.2.3.1. Kết quả tách dòng gen mã hóa kháng nguyên CYFRA 21-1

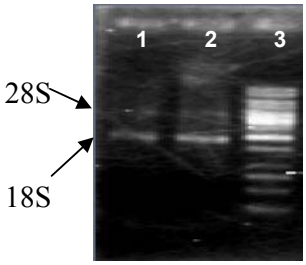
Mẫu máu của bệnh nhân (hình 3.54) đã chẩn đoán mắc bệnh ung thư phổi do bệnh viện A cung cấp được sử dụng làm nguyên liệu tách chiết RNA tổng số. Các mẫu máu của bệnh nhân ung thư phổi được bảo quản trong chất chống đông sau đó tách tế bào lympho làm nguyên liệu để tách RNA tổng số.



Hình 3.54. Mẫu bệnh phẩm

Các mẫu máu của bệnh nhân ung thư phổi được bảo quản trong ống chống đông trước khi tách RNA tổng số, các mẫu bệnh phẩm này do Bệnh viện A cung cấp.

RNA tổng số được tách chiết theo KIT tách RNA "S.N.A.P" của hãng **Invitrogen, sau đó** được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% (hình 3.55).



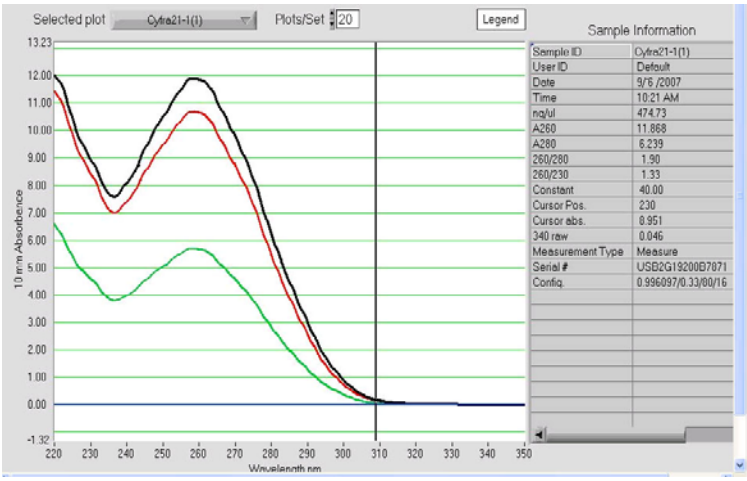
Hình 3.55. ***Ảnh điện di RNA tổng số trên gel agarose 1%***

Đường chạy 1, 2: RNA tổng số tách chiết từ máu các bệnh nhân ung thư phổi (kiểm tra 2/3 mẫu RNA đã tách).
Đường chạy số 3: Chỉ thị phân tử nucleic acid1kb

RNA tách được từ bệnh phẩm là khá nguyên vẹn bảo đảm cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết luận này còn được minh chứng bởi phổ hấp thụ khi đo trên máy Nanodrop-1000. Kết quả xác định được thể hiện trên bảng 3.12. và hình 3.56.

Bảng 3.14. Hàm lượng, độ tinh sạch của RNA tách từ máu bệnh nhân ung thư phổi

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
Cytra21-1(1)	Default	9/6/2007	10:21 AM	474.73	11.868	6.239	1.90	1.33	40.00	230	8.951	0.04
Cytra21-1(2)	Default	9/6/2007	10:21 AM	426.09	10.652	5.482	1.94	1.26	40.00	230	8.434	0.06
Cytra21-1(3)	Default	9/6/2007	10:22 AM	226.17	5.654	2.816	2.01	1.23	40.00	230	4.580	-0.28



Hình 3.56. Kết quả xác định hàm lượng và độ tinh sạch của các mẫu RNA. Phổ hấp thụ của các mẫu xác định trên máy đo NanoDrop-1000

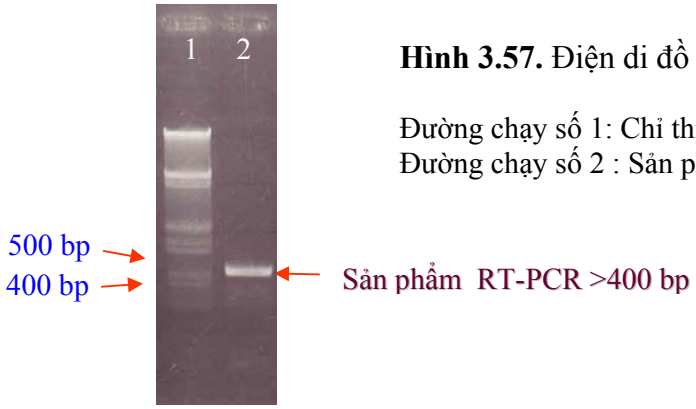
Kết quả xác định OD cho thấy hàm lượng RNA ở các mẫu đo là khá cao (từ 226,17 ng/µl đến 447,73 ng/µl) và có độ tinh sạch cần thiết (tỉ lệ của độ hấp thụ ở bước sóng 260/280 nằm trong khoảng từ 1,9 đến 2). Mặc dù, theo lý

thuyết mRNA chỉ chiếm tỉ lệ nhỏ (2-8%) trong RNA tổng số nhưng cũng đủ để làm khuôn nhân bản gen quan tâm khi sử dụng kỹ thuật RT-PCR.

Dựa vào các kết quả nêu trên, chúng tôi chọn mẫu số 2 có hàm lượng RNA tổng số là 426,09 ng/µl và độ tinh sạch là ($OD_{260/280}$ = 1,94) để làm khuôn nhân bản gen mã hóa Cyfra21.1 với cặp mồi đặc hiệu CYFRAF/CYFRAR bằng kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcription-PCR).

Kỹ thuật RT-PCR gồm hai giai đoạn chính: (1) Giai đoạn tổng hợp cDNA (complementary DNA) dưới tác dụng của enzyme phiên mã ngược và các mồi oligo (T) hoặc các mồi ngẫu nhiên; (2) Giai đoạn nhân bản gen quan tâm từ cDNA bằng PCR với các mồi đặc hiệu: CyfraF: 5'-gaaggatgctgaagcctggttc-3 và CyfraR: 5'-tacccagaagacac-cctccaaagg-3'.

Chu kỳ biến đổi nhiệt của toàn bộ phản ứng là: Bước 1: 50°C, 30 phút; Bước 2: 94°C, 2 phút; Bước 3: 94°C, 15 giây; Bước 4: 57°, 30 giây; Bước 5: 72°C, 1 phút 30 giây; Bước 6: lặp lại 30 chu kì từ bước 3 đến bước 5; Bước 7: 72°C, 8 phút; Sản phẩm giữ ở 4°C và điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

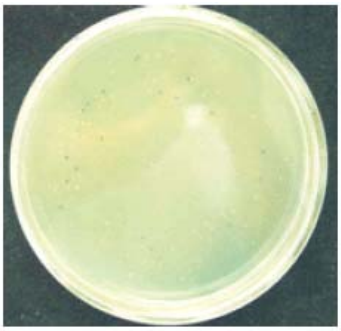


Hình 3.57. Điện di đồ kiểm tra sản phẩm RT-PCR

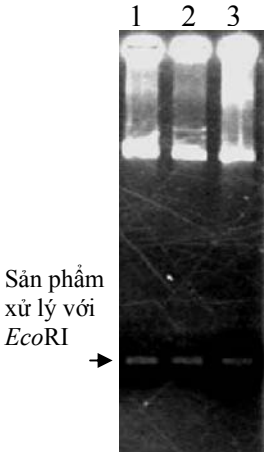
Đường chạy số 1: Chỉ thị phân tử
Đường chạy số 2 : Sản phẩm RT-PCR

Sau khi kiểm tra kết quả nhân bản gen kháng nguyên Cyfra21-1 trên gel agarose 1% (hình 3.57), sản phẩm RT-PCR được gắn vào vector tách dòng để nhân bản trong *E. coli* chủng DH5α. Sau đó, DNA plasmid (vector) chứa sản phẩm RT-PCR được tách chiết từ chủng vi khuẩn tách dòng và kiểm tra kết quả gắn sản phẩm RT-PCR vào vector tách dòng pCR-2.1 (Invitrogen). Kiểm

tra kết quả gắn gen vào vector tách dòng bằng enzyme *Eco*RI được trình bày trên hình 3.58 và hình 3.59.



Hình 3.58. Đĩa nuôi cấy chọn lọc các khuẩn lạc mang các plasmid có gắn sản phẩm RT-PCR



Hình 3.59. Kết quả gắn sản phẩm RT-PCR vào vector tách dòng
1-3: Sản phẩm cắt của các dòng plasmid 1-3 với enzyme *Eco*RI.

Trên hình 3.59 ta thấy ở các đường chạy số 1, 2 và 3 đều xuất hiện một băng sáng sau khi cắt kiểm tra vector tách dòng với enzyme *Eco*RI. Như vậy, có thể nhận xét rằng sản phẩm RT-PCR đã được gắn vào vector tách dòng với hiệu suất cao (3/3 dòng chứa vector mang sản phẩm RT-PCR). Tuy nhiên, để khẳng định kết quả này cần xác định trình tự nucleotide của sản phẩm RT-PCR đã gắn vào vector PCR^{TM}2.1-Topo (Invitrogen).

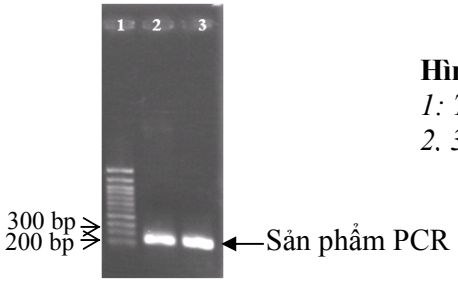
Kết quả xác định trình tự nucleotide của sản phẩm PCR (**xem phụ lục 4**) đã khẳng định đoạn gen nhân bản là một trong các đoạn chứa epitope của kháng nguyên Cyfra 21-1. Khi so sánh bằng phần mền FASTA thì trình tự amino axit suy diễn của đoạn gen đã nhân bản có sự trùng hợp 100% so trình tự amino axít của kháng nguyên Cyfra 21-1 đã được công bố trong Ngân hàng dữ liệu quốc tế có mã số: K1C19-HUMAN P08727.

Nghiên cứu Cyfra 21-1 với vai trò là kháng nguyên đặc hiệu UTP, chúng tôi quan tâm chủ yếu đến phần quyết định kháng nguyên (epitope) của phân tử này. Theo một kết quả nghiên cứu, sử dụng các phân tử kháng thể để nhận ra vùng quyết định kháng nguyên của cytokeratin, người ta nhận thấy, vùng

quyết định kháng nguyên của Cyfra 21-1 nằm trong khoảng axit amin từ 311 đến 368 trên phân tử cytokeratin 19 (Tigbrand T., 1998). Kết quả này cũng được khẳng định trong một phép thử sử dụng hai kháng thể đơn dòng: Ks 19.1 (kháng thể nhận biết các amino acid từ vị trí 311 đến 335 trên cytokeratin 19) và BM19-21 (kháng thể nhận biết các amino acid từ vị trí 346 đến 367) (Kazutaka Dohmoto, 2000).

Trên cơ sở trình tự gen mã hóa Cyfra 21-1 đã được xác định cũng như vị trí vùng quyết định kháng nguyên (epitope) đã được xác định, chúng tôi thiết kế cặp mồi để nhân bản và biểu hiện đoạn gen chứa vùng epitope. Các mồi đặc hiệu có chứa các enzyme cắt hạn chế *Nde*I và *Xho*I để gắn gen Cyfra 21-1 vào các vị trí tương ứng của vector biểu hiện pET-21a(+). Cặp mồi biểu hiện được thiết kế cụ thể như sau: ExpcyF: 5'– ***catatg***ggcaggtcc-3' ExpcyR: 5'– ***ctcgag***gtccatgagccgctggtac–3'.

Thành phần của phản ứng gồm: DNA khuôn, dNTPs, mồi EXPCYF và EXPCYR, enzyme *Taq*-DNA polymerase, dung dịch đệm, dung dịch $MgCl_2$, nước với tỷ lệ thích hợp trong tổng thể tích 25 µl. Chu trình nhiệt: 1 chu kỳ 94°C thời gian 4 phút; 25 chu kỳ (94°C thời gian 30 giây, 54°C thời gian 30 giây, 72°C thời gian 60 giây); 72°C thời gian 5 phút và lưu ở 4°C. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 0,8% được trình bày trên hình 3.60.



Hình 3.60. Kiểm tra kết quả PCR trên gel agarose
1: Thang DNA chuẩn 100 bp
2, 3: Sản phẩm PCR

Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy trên đường chạy số 2 và 3 có một băng sáng đậm với kích thước gần 300 bp. Kích thước này phù hợp với tính toán lý thuyết.

Sản phẩm PCR này có thể xử lý trực tiếp với các enzyme cắt giới hạn để gắn trực tiếp vào vector pET-21a(+), tuy nhiên, để đạt hiệu quả cao hơn chúng tôi đã tiến hành tách dòng phụ, nghĩa là sản phẩm PCR với vị trí nhận biết của các enzyme giới hạn ở 2 đầu được gắn lại vào vector pCR-2.1-TOPO, sau đó biến nạp vào *E. coli* chủng TOP-10 để nhân nhiều DNA plasmid.

Gen mã hóa vùng quyết định kháng nguyên của Cyfra 21-1 (gọi tắt là gen Cyfra 21-1) được chuyển từ vector tách dòng sang vector biểu hiện gốc pET-21a(+) nhờ các enzyme giới hạn *Nde*I và *Xho*I và enzyme T4-DNA ligase. Vector pET-21a(+) mang gen mã hóa Cyfra21-1 được chuyển vào *E. coli* DH5α.

Chọn ngẫu nhiên các chủng biến nạp để tách chiết DNA plasmid mang sản phẩm PCR, kiểm tra các DNA plasmid bằng các enzyme giới hạn, chúng tôi đã chọn được các plasmid mang mang gen Cyfra 21-1 khi kiểm tra bằng các enzyme giới hạn *Nde*I và *Xho*I (hình 3.61).

Hình 3.61. Kết quả cắt kiểm tra DNA plasmit bằng *Nde*I và *Xho*I
Đường chạy 1-4: DNA plasmit của khuẩn lạc khác nhau đã xử lý bằng *Nde*I và *Xho*I

Trên ảnh điện di ta thấy các plasmid đã lựa chọn khi cắt với các enzyme *Nde*I và *Xho*I đều xuất hiện băng có kích thước thích hợp. Như vậy, có thể khẳng định các plasmid đã chọn được đều mang gen Cyfra 21-1. Tuy nhiên, cần kiểm tra khung đọc và các đột biến có thể xuất hiện trong quá trình thao tác chúng tôi đã tiến hành xác định trình tự nucleotide gen Cyfra 21-1 sau khi gắn vào vector biểu hiện pET-21a(+). Kết quả xác định trình tự nucleotide đã

khẳng định thành công việc thiết kế vector biểu hiện gen Cyfra 21-1, trình tự nucleotide và trình tự amino axit suy diễn cụ thể :

```
CATATGGGCAGGTCCGAGGTTACTGACCTGCGGCGCACCCTTCAGGGTCTTGAGATTGAGCTGCAGTCACAGCTG  70
 H  M  G  R  S  E  V  T  D  L  R  R  T  L  Q  G  L  E  I  E  L  Q  S  Q  L

AGCATGAAAGCTGCCTTGGAAGACACACTGGCAGAAACGGAGGCGCGCTTTGGAGCCCAGCTGGCGCATATCCAG  140
 S  M  K  A  A  L  E  D  T  L  A  E  T  E  A  R  F  G  A  Q  L  A  H  I  Q

GCGCTGATCAGCGGTATTGAAGCCCAGCTGGGCGATGTGCGAGCTGATAGTGAGCGGCAGAATCAGGAGTACCAG  210
 A  L  I  S  G  I  E  A  Q  L  G  D  V  R  A  D  S  E  R  Q  N  Q  E  Y  Q

CGGCTCATGGACCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA                                       249
 R  L  M  D  L  E  H  H  H  H  H  H  *
```

Kết quả phân tích trình tự amino acid cho thấy đoạn gen đã gắn vào vector biểu hiện có khung đọc và chiều đúng theo tính toán lý thuyết. Hơn nữa, sản phẩm còn được gắn thêm đuôi *His-tag* giúp cho việc tinh sạch sản phẩm trên cột ái lực Ni-NTA ở bước tiếp theo được dễ dàng.

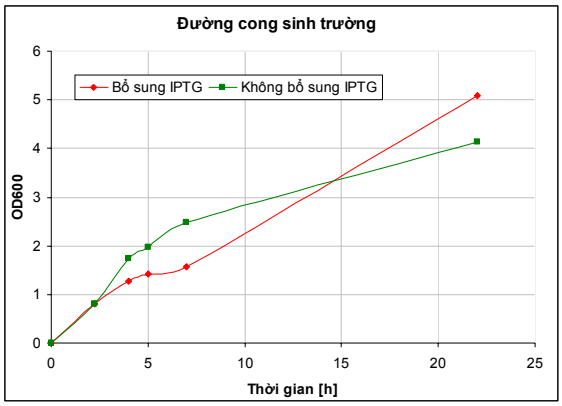
3.2.3.2. Kết quả biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên CYFRA 21-1

Vector biểu hiện pET-21a(+) mang gen mã hoá vùng quyết định kháng nguyên Cyfra21-1 được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) để biểu hiện. Chủng *E. coli* BL21(DE3) được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng chứa 100 μ/ml Ampicillin.

Tế bào được nuôi qua đêm ở điều kiện lắc nhẹ 200 vòng/phút, 37°C. Bổ sung 1% dịch nuôi qua đêm vào môi trường mới và nuôi tiếp cho đến khi đạt OD_{600} = 0,6. Thu một phần dịch nuôi để làm mẫu trước cảm ứng, phần còn lại cảm ứng bằng IPTG với nồng độ 1 mM.

Mẫu không cảm ứng và cảm ứng được nuôi lắc trong cùng điều kiện, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C, thu mẫu để phân tích sau thời gian nuôi lần lượt là 2 h, 3 h, 5 h và 20 h. Tốc độ sinh trưởng của tế bào chứa vector tái tổ hợp dưới tác động của chất cảm ứng được thể hiện ở hình 3.62 và bảng 3.15.

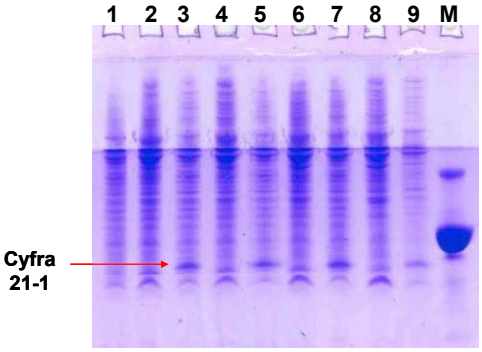
Bảng 3. 15. Kết quả OD_{600} dịch nuôi biểu hiện



OD_{600}		Thời gian Sau khi bổ Sung IPTG (h)
Không bổ sung IPTG	Bổ sung IPTG (1mM)	
0.8	0.8	0
1.74	1.28	2
1.97	1.42	3
2.48	1.57	5
4.14	5.09	22

Hình 3.62. Đường cong sinh trưởng của *E.coli* chứa vector tái tổ hợp.

Lượng tế bào của mẫu có cảm ứng tăng lên nhanh chóng so với mẫu không cảm ứng sau thời gian nuôi thích hợp. Tế bào thu tại các thời điểm khác nhau được xử lý để kiểm tra trên gel polyacrylamide theo phương pháp của Laemmli (hình 3.63).

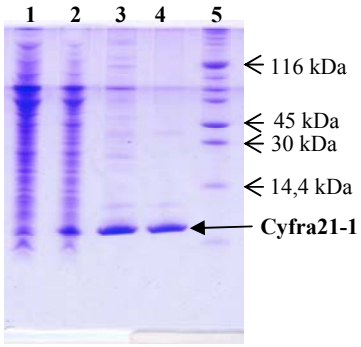


Hình 3.63. Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp

1: *Mẫu trước cảm ứng*
2, 4, 6, 8: *Mẫu trước cảm ứng sau 2h, 3h, 5h và 20h*
3, 5, 7, 9: *Mẫu cảm ứng bằng IPTG sau 2 h, 3 h, 5 h và 20 h*
M: *lysozyme, 14 kDa*

Theo tính toán, đoạn Cyfra 21-1 mà chúng tôi thu nhận có kích thước hơn 8 kDa, sẽ có băng thấp hơn Lysozyme (14 kDa). Trên bản điện di, trừ đường chạy số 1 là mẫu trước cảm ứng, còn các mẫu không cảm ứng và có cảm ứng được xếp theo cặp cùng thời gian thu mẫu (2 h, 3 h, 5 h, 20 h). Từ ảnh điện di ta thấy: tất cả các mẫu được cảm ứng bằng IPTG đều xuất hiện một băng thấp hơn lysozyme rất đậm so với mẫu không cảm ứng. Tuy nhiên, để khẳng định băng protein mới xuất hiện sau khi cảm ứng IPTG có phải là

sản phẩm Cyfra 21-1 hay không, chúng tôi đã tiến hành tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột Ni-NTA agarose. Kết quả tinh sạch được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide (hinh 3.64).



Hình 3.64. Kiểm tra sản phẩm sau tinh sạch
1, 2: sản phẩm trước khi tinh sạch
3. Sản phẩm được tinh sạch trên cột Ni-NTA lần thứ nhất
4. Sản phẩm được tinh sạch trên cột Ni-NTA lần thứ hai.
5. Chỉ thị phân tử protein

Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm sau khi tinh sạch lần thứ hai trên cột Ni-NTA xuất hiện một băng với kích thước phân tử lớn hơn 8 kDa. Như vậy, sản phẩm được biểu hiện sau khi cảm ứng bằng IPTG là sản phẩm của gen vùng quyết định kháng nguyên Cyfra21-1 cần thu nhận. Kết luận này cũng được ủng hộ bởi kết quả phân tích khối phổ.

Trong quá trình phân tích khối phổ, sản phẩm sẽ được xử lý bởi trypsin. Như vậy, nếu sản phẩm sau tinh sạch trên cột sắc ký Ni-NTA mà chúng tôi thu được là quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1 thì khi xử lý với trypsin sẽ được cắt thành các mảnh có kích thước khác nhau.

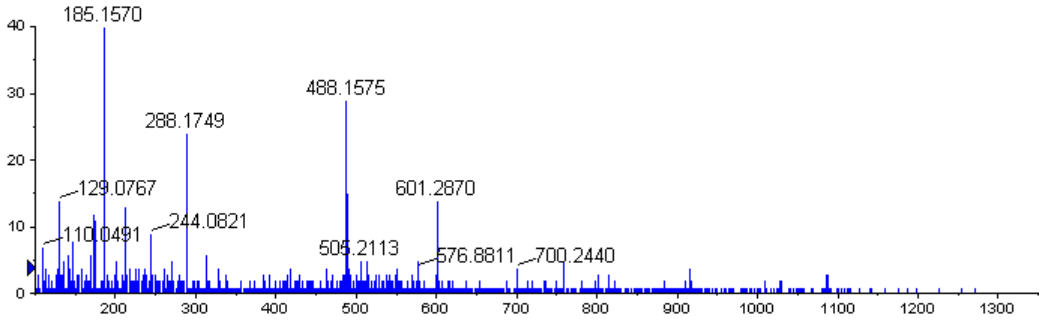
Theo lý thuyết, trypsin sẽ cắt protein tại các vị trí sau axit amin Arginine (R) và Lysine (K). Như vậy, nếu protein nhận được trong thí nghiệm biểu hiện ở trên thật sự là đoạn quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1 với trình tự các amino acid:

MGRSEVTDLRRTLQGLEIELQSQLSMKAALEDTLAETEARFGAQLAHI QALISGIEAQLGDVRADSERQNQEYQRLMDLEHHHHHH thì khi xử lý với Trypsin nhận được các mảnh peptide với khối lượng tương ứng (bảng 3.16) như sau:

Bảng 3.16. Kết quả xử lý đoạn Cyfra 21-1 bằng trypsin theo tính toán lý thuyết

Vị trí cắt	Các mảnh peptide nhận được	Số amino acid	Khối lượng (kDa)
3	MGR	3	362.447
10	SEVTDLR	7	818.882
11	R	1	174.203
27	TLQGLEIELQSQLSMK	16	1818.115
40	AALEDTLAETEAR	13	1389.482
63	FGAQLAHIQALISGIEAQLGDVR	23	2407.755
68	ADSER	5	576.564
75	QNQEYQR	7	964.990
86	LMDLEHHHHHH	11	1442.577

Kết quả thực nhận được sau khi phân tích khối phổ (hình 3.65 và bảng 3.17) cho thấy các mảnh phân tử (các đoạn peptide) được nhận diện trùng lặp hoàn toàn với tính toán lý thuyết.



Hình 3.65. Kết quả phân tích khối phổ của sản phẩm gen biểu hiện trong *E. coli*.

Bảng 3.17. Kết quả thực tế nhận được sau khi phân tích khối phổ

Vị trí vắt	Tên enzyme sử dụng	Trình tự peptide nhận được theo lý thuyết	Chiều dài	Khối lượng peptide [Da]
3	Trypsin	MGR	3	362.447
10	Trypsin	SEVTDLR	7	818.882
11	Trypsin	R	1	174.203
27	Trypsin	TLQGLEIELQSQLSMK	16	1818.115
40	Trypsin	AALEDTLAETEAR	13	1389.482
63	Trypsin	FGAQLAHIQALISGIEAQLGDVR	23	2407.755
68	Trypsin	ADSER	5	576.564
75	Trypsin	QNQEYQR	7	964.990
86		LMDLEHHHHHH	11	1442.577

Như vậy, Sản phẩm gen tái tổ hợp được biểu hiện và tinh sạch chính là quyết định kháng nguyên ung thư phổi Cyfra 21-1. Kháng nguyên nhận được sau sắc ký trên cột Ni-NTA đảm bảo độ tinh sạch cần thiết cho các nghiên cứu gây miễn dịch cho gà và tiến hành các thí nghiệm miễn dịch tiếp theo.

3.2.4. Kết quả gây miễn dịch gà thí nghiệm bằng CYFRA 21-1

Quy trình gây miễn dịch ở gà được tiến hành như sau: 3 con gà được gây miễn dịch theo phương pháp của Nader S. và William A.F., (1998) với kháng nguyên tái tổ hợp Cyfra 21-1.

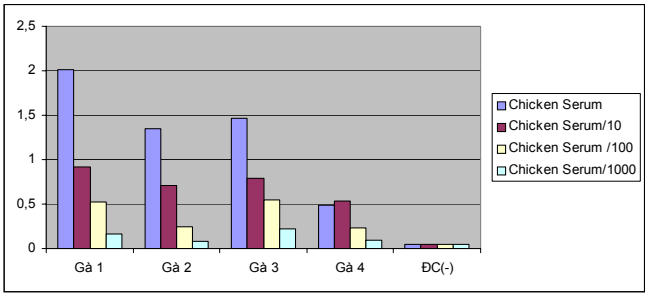
Quyết định kháng nguyên Cyfra21-1 đã tinh sạch được trộn với tá dược (lần đầu dung dịch kháng nguyên được trộn với complete Freund's adjuvant và các lần sau với incomplete Freund's adjuvant theo tỉ lệ 1:1) và tiêm dưới da 4 lần, cách nhau 1 tuần. Trước khi giết gà để lấy tuỷ và lách tách RNA, các mẫu huyết thanh gà được kiểm tra đáp ứng miễn dịch bằng kỹ thuật ELISA.

Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà đã gây miễn dịch với quyết định kháng nguyên Cyfra21-1 trình bày trên hình 3.66; hình 3.67; bảng 3.18; bảng 3.19

Bảng 3.18. Kết quả đáp ứng miễn dịch ở gà trước khi gây miễn dịch lần thứ 4

	1	**2**	**3**	**4**	**5**
A	2,015	1,35	1,461	0,484	0,044
B	0,913	0,705	0,789	0,531	0,046
C	0,525	0,247	0,544	0,228	0,046
D	0,168	0,081	0,226	0,097	0,045

1, 2,3*: Các giếng chứa huyết thanh của từng con gà đã gây miễn dịch trước khi gây miễn dịch thứ 4.* ***4****: Giếng chứa mẫu huyết thanh gà không gây miễn dich với kháng nguyên Cyfra 21-1.* ***5****: Giếng không có huyết thanh gà.* ***A****: huyết thanh không pha loãng.* ***B*** *huyết thanh pha loãng 10 lần;* ***C****: huyết thanh pha loãng 100 lần và* ***D****: huyết thanh pha loãng 1000 lần.*

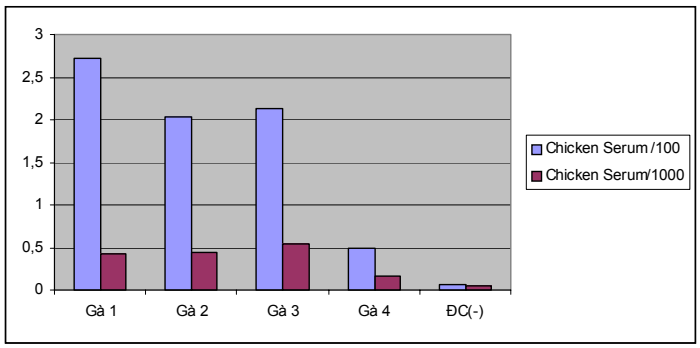


Hình 3.66. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà bằng ELISA trước khi gây miễn dịch lần thứ 4

Bảng 3.19. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà bằng ELISA trước khi lấy tuỷ xương và lách

	1	2	3	4	5
C	2,714	2,029	2,133	0,5	0,059
D	0,433	0,438	0,544	0,162	0,057

1, 2, 3*: Các giếng chứa huyết thanh của từng con gà đã gây miễn dịch trước khi lấy tuỷ xương và lách để tách RNA.* ***4****: Giếng chứa mẫu huyết thanh gà không gây miễn dich với quyết định kháng nguyên Cyfra21-1.* ***5****: Giếng không có huyết thanh gà.* ***C****: huyết thanh pha loãng 100 lần và* ***D****: huyết thanh pha loãng 1000 lần.*



Hình 3.67. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà bằng ELISA trước khi lấy tuỷ xương và lách

Kết quả ở các hình 3.66; hình 3.67; bảng 3.18; bảng 3.19 cho thấy các gà sau khi gây miễn dịch với quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1 có sự đáp ứng miễn dịch tốt, đặc biệt sau lần gây miễn dịch thứ 4.

Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch (hình 3.66 và bảng 3.19) cho thấy các gà gây miễn dịch bằng quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1 sau lần thứ 4 là rất cao. Mẫu huyết thanh pha loãng 1000 lần vẫn cho kết quả khác biệt rõ rệt với mẫu đối chứng. Điều đó có nghĩa là phản ứng đáp ứng miễn dịch ở gà khi gây miễn dịch với quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1 là rất tốt.

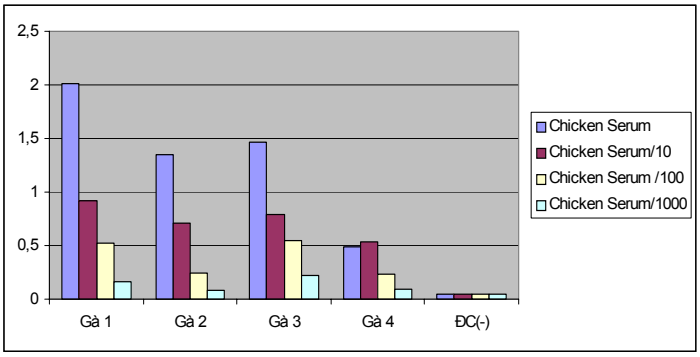
Như vậy, gây miễn dịch gà với protein (peptide) có nguồn gốc từ động vậy có vú sẽ cho đáp ứng miễn dịch cao. Kết quả gây miễn dịch gà với các kháng nguyên khác như kháng nguyên HER2, kháng nguyên CD33 có bản chất từ người cũng cho các kết quả tương tự. Kết quả của chúng tôi thu được phù hợp với kết quả mà Jos Raats và cộng sự (2003) khi gây miễn dịch gà trực tiếp bằng các haptens để tạo kháng thể đơn dòng có bản chất từ gà hoặc Jennifer và cộng sự (2000) đã gây miễn dịch gà trực tiếp bằng các peptide để tạo thư viện các kháng thể có bản chất từ gà.

Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà đã gây miễn dịch với quyết định kháng nguyên Cyfra21-1 trình bày trên hình 3.68; hình 3.69 và bảng 3.20; bảng 3.21.

Bảng 3.20. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà trước khi gây miễn dịch lần thứ 4

	1	**2**	**3**	**4**	**5**
A	2,015	1,35	1,461	0,484	0,044
B	0,913	0,705	0,789	0,531	0,046
C	0,525	0,247	0,544	0,228	0,046
D	0,168	0,081	0,226	0,097	0,045

1, 2,3*: Các giếng chứa huyết thanh của từng con gà đã gây miễn dịch trước khi gây miễn dịch thứ 4.* ***4****: Giếng chứa mẫu huyết thanh gà không gây miễn dich với kháng nguyên Cyfra21-1.* ***5****: Giếng không có huyết thanh gà.* ***A****: huyết thanh không pha loãng.* ***B*** *huyết thanh pha loãng 10 lần;* ***C****: huyết thanh pha loãng 100 lần và* ***D****: huyết thanh pha loãng 1000 lần.*

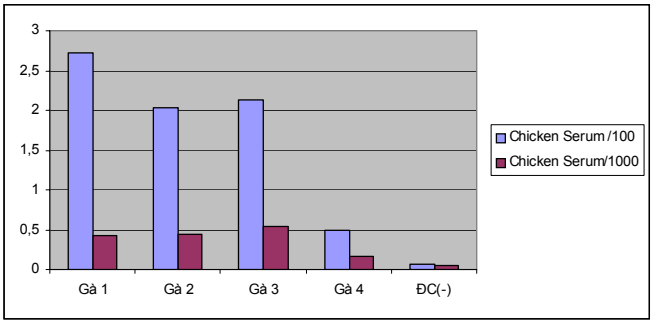


Hình 3.68. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà trước khi gây miễn dịch lần thứ 4

Bảng 3.21. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà bằng ELISA

	1	2	3	4	5
C	2,714	2,029	2,133	0,5	0,059
D	0,433	0,438	0,544	0,162	0,057

1, 2, 3*: Các giếng chứa huyết thanh của từng con gà đã gây miễn dịch trước khi lấy tuỷ xương và lách để tách RNA.* ***4****: Giếng chứa mẫu huyết thanh gà không gây miễn dich với quyết định kháng nguyên Cyfra21-1.* ***5****: Giếng không có huyết thanh gà.* ***C****: huyết thanh pha loãng 100 lần và* ***D****: huyết thanh pha loãng 1000 lần.*



Hình 3.69. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch của gà trước khi lấy tuỷ xương và lách

Kết quả ở các hình 3.61; hình 3.62 và các bảng 3.20; bảng 3.21 cho thấy các gà sau khi gây miễn dịch với quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1 có sự đáp ứng miễn dịch tốt, đặc biệt sau lần gây miễn dịch thứ 4.

Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch (hình 3.62 và bảng 3.21) cho thấy các gà gây miễn dịch bằng quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1 sau lần thứ 4 là rất cao. Mẫu huyết thanh pha loãng 1000 lần vẫn cho kết quả khác biệt rõ rệt với mẫu đối chứng. Điều đó có nghĩa là phản ứng đáp ứng miễn dịch ở gà khi gây miễn dịch với quyết định kháng nguyên Cyfra21-1 là rất tốt.

Kết quả gây miễn dịch gà với các kháng nguyên khác như kháng nguyên HER2, kháng nguyên CD33 có bản chất từ người cũng cho các kết quả tương tự. Kết quả của chúng tôi thu được phù hợp với kết quả mà Jos Raats và cộng sự (2003) khi gây miễn dịch gà trực tiếp bằng các haptens để tạo kháng thể đơn dòng có bản chất từ gà hoặc Jennifer và cộng sự (2000) đã gây miễn dịch gà trực tiếp bằng các peptide để tạo thư viện các kháng thể có bản chất từ gà.

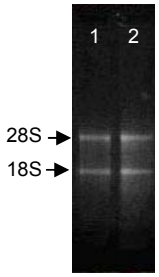
3.2.5. Kết quả thu kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CYFRA 21-1

Để thu nhận kháng thể đặc hiệu epitope kháng nguyên Cyfra21-1, chúng tôi đã tách dòng gen mã hóa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đã gây miễn dịch từ tế bào tủy xương và tế bào lách của gà. Tạo thư viện các scFv của kháng thể gà, sàng lọc, chọn lựa các kháng thể gà có ái lực cao với kháng nguyên đã gây miễn dịch, xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa kháng thể đặ hiệu kháng nguyên. Thiết kế vectơ biểu hiện kháng thể ở *E. coli*, tinh sạch và xác định cấu trúc và đặc tính của kháng thể. Các quy trình thực hiện những nội dung nghiên cứu trên như trình bày ở phần phương pháp.

3.2.5.1. Kết quả tách dòng gen mã hóa kháng thể đặc hiệu CYFRA 21-1

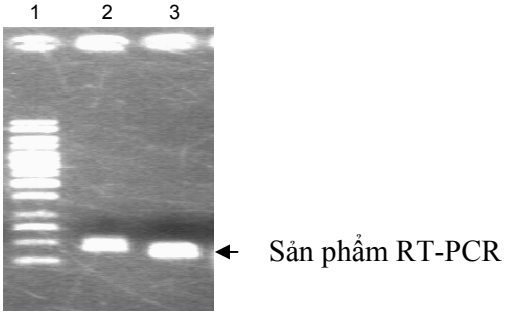
Tách RNA và nhân bản gen mã hóa kháng thể gà đặc hiệu Cyfra21-1: Tuỷ xương và lách của gà sau khi gây miễn dịch với kháng nguyên Cyfra 21-1 được sử dụng làm nguyên liệu tách chiết RNA tổng số (hình 3.70). Sử dụng 20 µg RNA với primer oligo(dT) để tạo cDNA.

Kết quả nhân bản các đoạn gen mã hoá vùng biến đổi của kháng thể gà đặc hiệu epitope kháng nguyên tái tổ hợp Cyfra 21-1 bằng kỹ thuật RT-PCR được trình bày trên hình 3.71.



Hình 3.70. Điện di đồ RNA tổng số

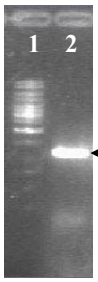
1. RNA tách từ tuỷ xương gà đã gây miễn dịch với Cyfra 21-1
2. RNA tách từ lách gà đã gây miễn dịch với Cyfra 21-1



Hình 3.71. Kiểm tra sản phẩm RT-PCR

1: Chỉ thị phân tử DNA 1 kb (Fermentas)
2: Gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H)
3: Gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L)

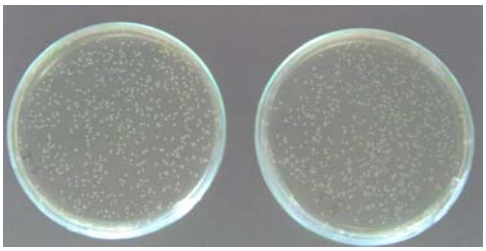
Kết quả nối ghép gen mã hóa vùng biến đổi V_H với V_L bằng phản ứng PCR tạo gen tái tổ hợp scFv được trình bày trên hình 3.72.



Hình 3.72. Điện di đồ sản phẩm nối ghép V_H-V_L bằng PCR để tạo scFv

1. Chỉ thị phân tử
2. Sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR nối ghép V_H-V_L được gắn vào vector pHEN2 tại vị trí nhận biết của enzyme cắt hạn chế *Sfi*I (ggccnnnnnggcc). Vector nhận được mang gen mã hóa vùng biến đổi của kháng thể gà (V_H-V_L) được biến nạp vào *E. coli* chủng TG1 để nhân và thu nhận lượng lớn DNA-phagemid. Kết quả thu nhận các dòng tế bào *E. coli* chủng TG1 mang vector chứa gen mã hóa vùng biến đổi của kháng thể gà (V_H-V_L) được trình bày trên hình 3.73.



Hình 3.73. Đĩa nuôi cấy các dòng tế bào mang vector chứa gen mã hóa vùng biến đổi của kháng thể gà (VH-VL).

Tạo phage biểu lộ kháng thể scFv (kháng thể phage)

Thu nhận ngẫu nhiên 24 dòng (khuẩn lạc) tế bào *E. coli* TG1 từ các đĩa biến nạp ở trên và nuôi trong 100 µl môi trường 2xTY (gồm 16g Typtone, 10g Yeast Extract và 5g NaCl trong 1 lit nước) chứa 100 µg/ml ampicillin và 1% glucose. Nuôi lắc ở 37°C qua đêm, sau đó bổ sung 100 ml môi trường 2xTY chứa 100 µg/ml Ampicillin và 1% glucose và nuôi cho tới khi đạt OD_{600} = 0,5 (khoảng 2 giờ).

Gây nhiễm các tế bào *E. coli* trong dịch nuôi cấy với helper phage M13-K07 (BioLab) theo tỷ lệ 1:20 (số tế bào vi khuẩn: số hạt helper phage, với ước lượng 1 OD_{600} = 8 x 10^8 tế bào/ml).

Tiếp tục nuôi không lắc trong bể nước ở 37°C với thời gian khoảng 30 phút. Ly tâm 3.300 g trong 10 phút. Cặn ly tâm được hòa trong 50 ml môi trường 2xTY chứa 100 µg/ml Ampicillin và 25 µg/ml Kanamycin và nuôi ủ lắc qua đêm ở 37°C. Ly tâm 10.800 x g trong 10 phút hoặc 3.300 x g trong 30 phút. Thêm 1/5 thể tích PEG/NaCl (20% Polyethylene glycol 6.000 và 2,5 M NaCl) vào phần dịch ly tâm. Trộn đều và để tủa ở 4°C, thời gian 1 giờ. Ly tâm 10 800 g trong 10 phút hoặc 3.300 g trong 30 phút. Loại bỏ dịch ly tâm, ly tâm nhanh và loại bỏ hoàn toàn dịch ly tâm.

Hòa cặn ly tâm trong 2 ml PBS và ly tâm 11.600 g trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn xác tế bào. Dịch ly tâm thu được là dịch phage biểu lộ scFv trên bề mặt. Tuy nhiên, để thu nhận kháng thể phage đặc hiệu có khả năng nhận biết và gắn kết với quyết định kháng nguyên, cần tiến hành kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA.

Sàng lọc các kháng thể phage có ái lực cao với kháng nguyên đích

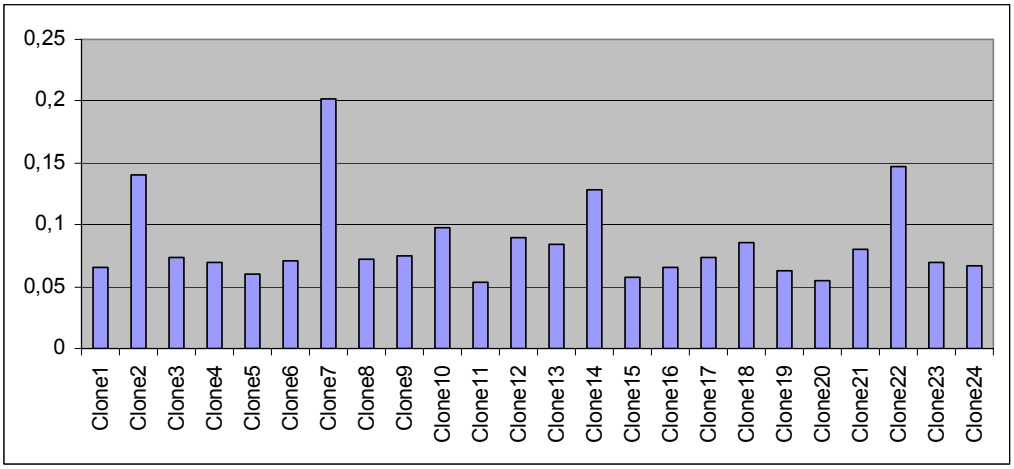
Sử dụng 100 µl dịch kháng nguyên (trong trường hợp này là quyết định kháng nguyên Cyfra 21-1) tái tổ hợp (100 ng) cho vào mỗi giếng của khay thử 96 giếng, phủ khay qua đêm ở nhiệt độ phòng. Rửa khay 5 lần với PBS, làm khô trên giấy thấm. Bổ sung vào mỗi giếng 300 µl MPBS, ủ 2 giờ ở 37°C, rửa 5 lần với PBS, làm khô.

Thêm 100 µl kháng thể phage vào mỗi giếng, ủ 90 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa 5 lần với T-PBS (PBS, Tween 20), 5 lần với PBS. Bổ sung 100 µl kháng thể cộng hợp anti-M13, để 90 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa 5 lần với T-PBS, 5 lần với PBS. Bổ sung vào mỗi giếng 100 µl TMB, để 10 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 50 µl H_2SO_4 nồng độ 1 N. Xác định độ hấp thụ tại bước

sóng 450 nm để chọn các phage mang kháng thể đặc hiệu mong muốn. Kết quả sàng lọc một số dòng tế bào biểu lộ kháng thể phage được trình bày trên hình 3.74 và bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả sàng lọc các dòng biểu lộ kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1

Các dòng biểu lộ kháng thể	OD (450-650)	Các dòng biểu lộ kháng thể	OD (450-650)
Clone1	0,066	Clone13	0,084
Clone2	0,141	Clone14	0,128
Clone3	0,074	Clone15	0,058
Clone4	0,069	Clone16	0,065
Clone5	0,06	Clone17	0,074
Clone6	0,071	Clone18	0,085
Clone7	0,202	Clone19	0,063
Clone8	0,072	Clone20	0,055
Clone9	0,075	Clone21	0,08
Clone10	0,098	Clone22	0,147
Clone11	0,054	Clone23	0,069
Clone12	0,089	Clone24	0,067



Hình 3.74. Kết quả chọn các dòng mang kháng thể đặc hiệu Cyfra21-1

Kết quả ở bảng 3.22 và hình 3.74 cho dòng mang kháng thể số 7 (clone 7) có ái lực cao nhất trong số các dòng đã sàng lọc. Vì vậy, dòng số 7 được chọn lựa cho việc xác định trình tự cũng như các thí nghiệm tiếp theo.

Xác định trình tự gen mã hóa kháng thể đặc hiệu epitope của Cyfra 21-1

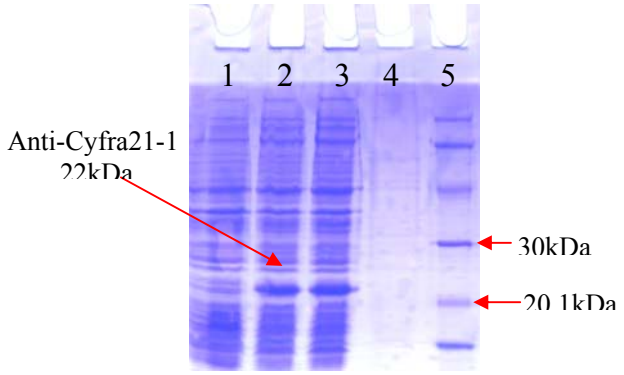
Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa scFv kháng thể đặc hiệu epitope kháng nguyên Cyfra 21-1 (thực hiện như quy trình đã trình bày ở phần phương pháp) được trình bày trên hình 3.75 (**xem Phụ lục 4**)

```
GGTGTCAGCGAACCCGGGAGAACCGTCGAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGTAGCAGCAAC  60
 G  V  S  E  P  G  R  T  V  E  I  T  C  S  G  G  G  S  S  N
TACTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCTGGCAGTGCCCCTGTCAGTCTGATCTATGCT 120
 Y  Y  G  W  Y  Q  Q  K  A  P  G  S  A  P  V  S  L  I  Y  A
AACACCAACAGACCCTCAAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCTGGATCCGGCTCCACA 180
 N  T  N  R  P  S  N  I  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  S  T
AACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGT 240
 N  T  L  T  I  T  G  V  Q  A  D  D  E  A  V  Y  F  C  G  S
GGAGACGGCAGTTATTCTGGTATATTTGGGGCCGGGACAACCCCGACCGTCCTAGGTCAG 300
 G  D  G  S  Y  S  G  I  F  G  A  G  T  T  P  T  V  L  G  Q
TCCTCTAGATCTTCCGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCAGA 360
 S  S  R  S  S  A  V  T  L  D  E  S  G  G  G  L  Q  T  P  R
GGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCACCTTCAGTGACCGTGGCATGTTC 420
 G  A  L  S  L  V  C  K  A  S  G  F  T  F  S  D  R  G  M  F
TGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTTCGTCGCTGAAATTACCAAGGATGGT 480
 W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  F  V  A  E  I  T  K  D  G
GGTGGCACATGGTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGG 540
 G  G  T  W  Y  G  S  A  V  K  G  R  A  T  I  S  R  D  N  G
CAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATCTACTGC 600
 Q  S  T  V  R  L  Q  L  N  N  L  R  A  E  D  T  G  I  Y  C
TGCGCCAAACCTGCTGGTTATTGTTGGTATGGTGATTGTGGTGGTTGGATCGACGCATGG 660
 C  A  K  P  A  G  Y  C  W  Y  G  D  C  G  G  W  I  D  A  W
GGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCACTAGTGGCCAGGCCAGACCAGATCCTCAT 720
 G  H  G  T  E  V  I  V  S  S  T  S  G  Q  A  R  P  D  P  H
```

Hình 3.75. Trình tự nucleotde và trình tự amino acid suy diễn của scFv đặc hiệu epitope Cyfra 21-1

3.2.5.2. Kết quả biểu hiện và tinh sạch kháng thể đặc hiệu CYFRA 21-1

Kết quả biểu hiện gen mã hóa kháng thể đặc hiệu epitope của kháng nguyên Cyfra21-1 được trình bày trên hình 3.76. Kết quả điện di cho thấy ở mẫu sau khi cảm ứng bằng IPTG có xuất hiện một băng khác biệt so với mẫu trước khi cảm ứng và có kích thước khoảng 20 kDa.

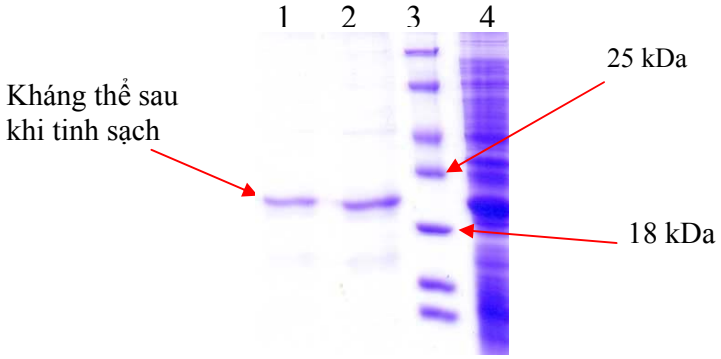


Hình 3.76. Kết quả kiểm tra điện di sự biểu hiện gen mã hóa kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1

1: Không cảm ứng; **2,3**: Cảm ứng với nồng độ IPTG 0,6mM

5: Protein ladders

Sản phẩm sau khi biểu hiện được tinh sạch trên cột sắc ký ái lực (cột Ni-NTA). Quá trình tinh sạch được thực hiện theo quy trình đã miêu tả ở phần phương pháp. Kết quả tinh sạch cho thấy sau khi sắc ký, thì trên bản điện di chỉ xuất hiện băng có kích thước trên 20 kDa (hình 3.77).



Hình 3.77. Kiểm tra kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1 sau tinh sạch

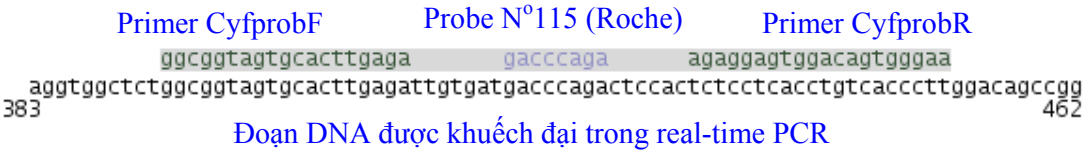
1, 2: Mẫu sau khi tinh sạch trên cột Ni-NTA;
3: Protein ladders; **4:** Mẫu trước khi tinh sạch trên cột sắc ký Ni-NTA

Các đường chạy số 1 và số 2 trên hình 3.77 là tương ứng với các phân đoạn trong sắc ký ái lực trên cột Ni-NTA. Như vậy, có thể khẳng định việc tinh sạch kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1 trên cột Ni-NTA đạt kết quả tốt, chỉ xuất hiện một băng đậm trên điện di đồ.

3.2.6. Kết quả tạo KIT định lượng kháng nguyên CYFRA 21-1

KIT định lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 trong ung thư phổi cũng được thực hiện như đối với trường hợp tạo KIT định lượng kháng nguyên HER2 trong ung thư vú. Các bước thực hiện bao gồm: (i) tạo các phage biểu lộ scFv của kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1; (ii) gắn kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1 lên các giếng khay thử; (iii) Bổ sung các phage biểu lộ scFv đặc hiệu Cyfra 21-1 để tạo phức hợp kháng thể-kháng nguyên-scFv trên phage; (iv) Thủy giải các DNA-phage để làm khuôn để định lượng bằng real-time PCR

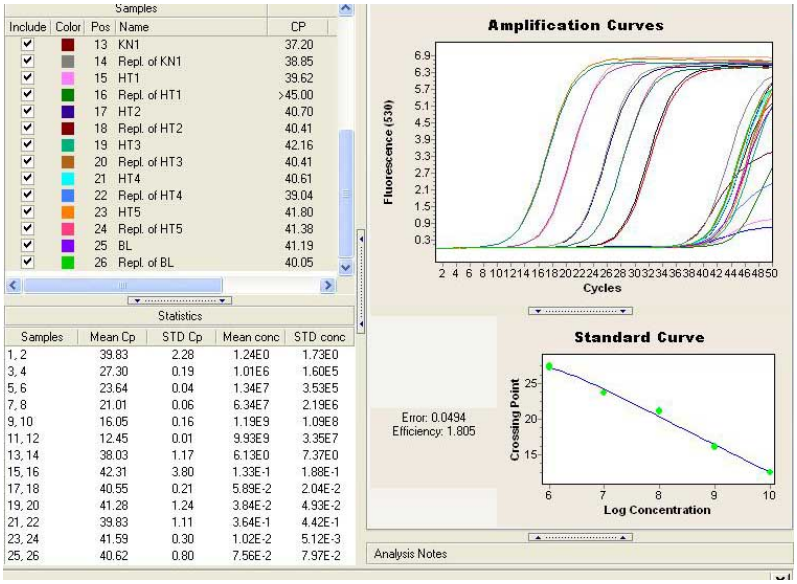
Để tiến hành phân tích định lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 trong các mẫu phân tích, cần xây dựng đường chuẩn nồng độ. Để đánh giá độ đặc hiệu của phản ứng so với việc sử dụng SYBR green I, chúng tôi sử dụng probe N°115 của Hãng Roche để thực hiện Real-time PCR. Cụ thể chúng tôi đã sử dụng cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại đoạn mã hóa scFv của kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1 và probe No115 (trình tự của proble gacccaga và trình tự mồi là: `CyfprobF:5'-ggcggtagtgcacttgaga-3'` `CyfprobR:5'-aagggtgacaggtgaggaga-3'` được sử dụng để khuếch đại đoạn DNA mã hóa cho scFv đã gắn trong hệ gen của phage (hình 3.78) và các thành phần phản ứng còn có 0.5 µl QuantiTect RT Mix, 5 µl DNA khuôn (dịch thuỷ giải phage); 1 µl Uracil-N-glycosylase, heat-labile, 17,5 µl RNase-free water. Mẫu đối chứng âm tính không chứa DNA khuôn.



Hình 3.78. *Sơ đồ mồi, probe và đoạn DNA được khuếch đại trong phản ứng định lượng kháng nguyên Cyfra 21-1*

Chu trình nhiệt của phản ứng gồm: 94°C trong 5 phút, sau đó 50 chu kỳ: 95°C thời gian 45 giây, 55°C thời gian 70 giây. Mỗi mẫu được lặp lại 2 lần,

các mẫu có ký hiệu S1, S2, S3, S 4, S5 là các mẫu chuẩn có nồng độ kháng nguyên xác định. Các mẫu còn lại là các mẫu huyết thanh của bệnh nhân đã được pha loãng (pha loãng 100 lần). Kết quả định lượng Cyfra 21-1 được trình bày trên hình 3.79 và bảng 3.23



Hình 3.79. Kết quả định lượng Cyfra 21-1 trong các mẫu huyết thanh

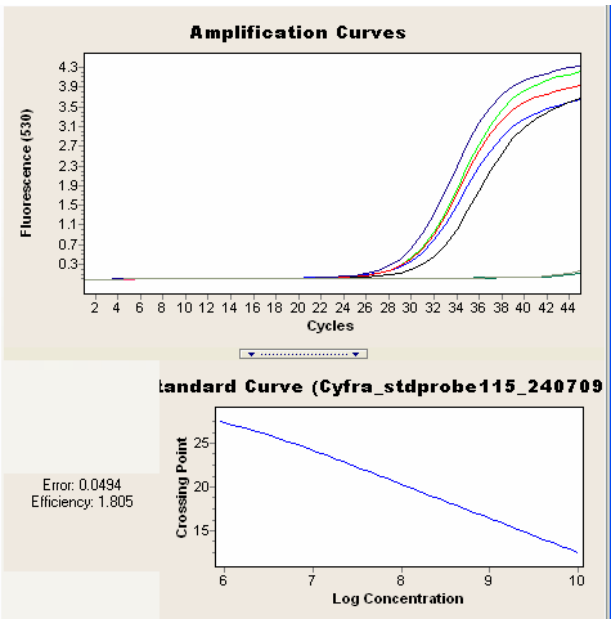
Bảng 3.23. Kết quả định lượng Cyfra 21-1 trong các mẫu huyết thanh

Mẫu	Giá trị CP	Nồng độ kháng nguyên Cyfra 21-1
KN1	38,03	6,13 E^{0}
HT1	42,31	1,33 E^{-1}
HT2	40,55	5,89 E^{-2}
HT3	41,28	3,84 E^{-2}
HT4	39,83	3,64 E^{-1}
HT5	41,59	1,02 E^{-2}
BL	40,62	7,56 E^{-2}

Kỹ thuật real-time PCR với probe N°115 của Hãng Roche (hình 3.78) là rất đặc hiệu, cho phép định lượng chính xác hàm lượng cyfra 21-1 trong các

mẫu huyết thanh đã phân tích. Để kiểm nghiệm độ nhạy và độ đặc hiệu của Kit định lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm trên các mẫu huyết thanh bệnh nhân đã xác định là ung thư phổi (mẫu do Bệnh Viện A cung cấp ngày 16 tháng 8 năm 2009). Kết quả được trình bày trên hình 3.80.

Samples				Results	
Inc...	Color	P...	N...	CP	Concentration
✔		1	HT1	29.72	[1.11E5]
✔		2	HT2	29.61	[1.24E5]
✔		3	HT3	29.58	[1.28E5]
✔		4	HT4	30.97	[3.07E4]
✔		5	HT5	>40.00	[>1.44E-1]
✔		6	PBS	>40.00	[>1.44E-1]
✔		7	KN	28.80	[2.67E5]
✔		8	H2O	>40.00	>1.44E-1



Kết quả định lượng Cyfra 21-1

HT1: 1,11 E5 (83 ng/ml)
HT2: 1,24 E5 (92,9 ng/ml)
HT3: 1,28 E5 (95,9 ng/ml)
HT4: 3,07 E4 (22,9 ng/ml)
HT5: 1,44 E-1 (> 1,2 ng/ml)

Hình 3.80. Kết quả định lượng Cyfra 21-1 trong các mẫu huyết thanh 16/8/2009

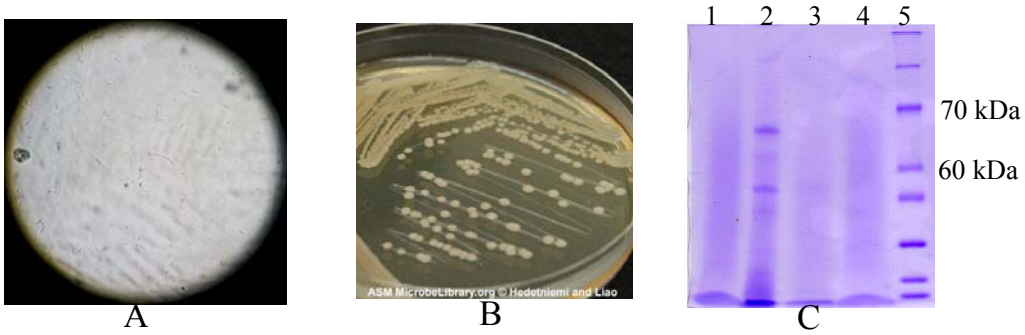
Các mẫu HT1, HT2, HT3, HT4 đều có lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 cao hơn ngưỡng (2,3 ng/ml) rất nhiều. Trong khi đó mẫu huyết thanh HT5 (mẫu huyết thanh của người khỏe không bị bệnh) có lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 rất thấp (dưới ngưỡng)

3.2.7. Kết quả tạo gen kháng thể dạng ghép đặc hiệu CYFRA 21-1

Gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp mã hóa cho kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên Cyfra 21-1 cũng được thiết kế theo mô hình giống như đã thiết kế gen mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên HER2 trong ung thư vú. Tuy nhiên, chỉ có khác biệt là thay vì sử dụng đoạn gen mã hóa scFv đặc hiệu kháng nguyên HER2 thì trong trường hợp này sử dụng đoạn

gen mã hóa scFv đặc hiệu cho một trong các epitope của kháng nguyên Cyfra 21-1 để gắn với gen mã hóa cho các vùng hằng định CH2-CH3 của kháng thể có bản chất của người, tiếp theo là gen mã hóa cho vùng hCBD cũng có bản chất từ người. Gen tái tổ hợp sau khi tạo ra được lắp ráp vào vectơ biểu hiện và biểu hiện trong *Bacillus megaterium*.

Kết quả biểu hiện và tinh sạch kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên Cyfra 21-1 được trình bày trên hình 3.81.



Hình 3.81. Biểu hiện kháng thể dạng ghép đặc hiệu Cyfra 21-1 trong *B. megaterium*
A. Tạo protoplast để chuyển gen; B. Các tế bào đã biến nạp nuôi cấy trên môi trường chọn lọc; C. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của gen tái tổ hợp dạng ghép đặc hiệu Cyfra 21-1. Các đường chạy số 1-4 trên hình 3.81. C là sự biểu hiện của gen ở các điều kiện khác nhau.

Kết quả ở hình 3.81 cho thấy chúng tôi đã tạo được protoplast (hình 3.81 A) và thu được các tế bào biến nạp (hình 3.81 B). Trên hình 3.81. C chỉ có đường chạy số 2 xuất hiện băng sáng, trong đó có một băng với kích thước > 60 kDA tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết và một băng có kích thước nhỏ hơn 60 kDa. Băng này xuất hiện có thể do sự phân cắt của một protease. Để khẳng định điều này còn cần có các nghiên cứu sâu hơn. Như vậy, gen mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu Cyfra 21-1 được biểu hiện trong *Bacillus megaterium WH320* khi nuôi lắc 250 rpm ở 37°C trong môi trường chứa NaCl 5g/lít; Trypton 10g/lít; Beef extract 5g/1lít sau 24 giờ có bổ sung 0.5 % xylose. (trên đường chạy số 2). Tuy nhiên, việc xuất hiện 2 băng

trên đường chạy số 2 với các kích thước khác nhau đã đặt ra vấn đề cần nghiên cứu thêm để khẳng định phải chăng đây là 2 protein khác nhau hay do protein (kháng thể dạng ghép) bị phân cắt do protease. Tuy nhiên khi tinh sạch trên cột sắc ký ái lực chúng tôi chỉ nhận được một sản phẩm có kích thước lớn hơn 60 kDa.

3.2.8. Kết quả thử độc tố cấp của kháng thể đặc hiệu CYFRA 21-1

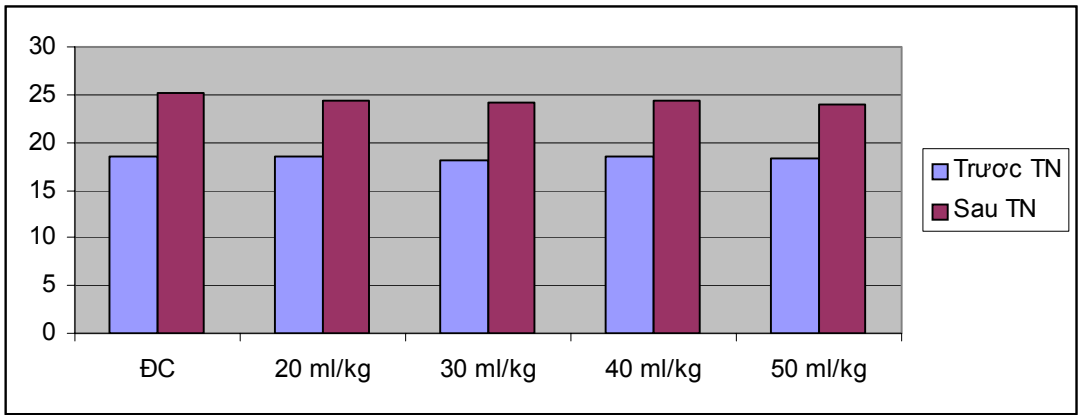
Trọng lượng cơ thể chuột ở nhóm chứng và các nhóm thử đều tăng trọng lượng cơ thể trong thời gian theo dõi (bảng 3.24 và hình 3.82).

Bảng 3.24. Sự thay đổi trọng lượng chuột khi uống kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1

STT	**Nhóm 1** (20 ml/kg)		STT	**Nhóm 2** (30 ml/kg)	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
1	18,5	26,0	11	18,5	23,5
2	18,5	24,5	12	18,0	24,5
3	18,5	24,0	13	18,0	23,5
4	18,0	25,5	14	18,0	24,0
5	18,5	24,5	15	18,0	25,0
6	19,0	23,5	16	18,0	25,5
7	19,0	23,0	17	18,0	24,5
8	18,5	24,0	18	18,5	24,0
9	19,0	25,5	19	18,0	23,5
10	18,5	23,5	20	18,0	24,0

STT	**Nhóm 3** (40 ml/kg)		STT	**Nhóm 4** (50 ml/kg)	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
21	18,5	25,0	31	18,0	23,5
22	18,0	24,5	32	18,5	24,5
23	18,5	23,5	33	18,5	23,0
24	19,0	24,0	34	19,0	24,0
25	18,5	25,0	35	18,5	25,0
26	18,0	24,5	36	18,0	24,5
27	18,0	24,0	37	18,0	23,5
28	18,5	23,5	38	18,0	23,5
29	19,0	24,0	39	18,5	24,0
30	18,5	25,5	40	18,5	23,5

STT	**Nhóm chứng**		STT	**Nhóm chứng**	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
41	18,0	25,5	46	18,5	27,0
42	18,5	25,0	47	19,0	26,5
43	18,5	23,5	48	19,0	25,0
44	18,0	24,5	49	18,5	24,5
45	18,5	26,0	50	19,0	23,5



Hình 3.82. Sự thay đổi trọng lượng chuột sau khi uống kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1

Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột

- Nhóm chứng: Hoạt động và ăn uống bình thường
- Các nhóm thử: Sau khi uống thuốc và trong 7 ngày theo dõi nhóm thử, không nhận thấy có biểu hiện gì khác thường so với nhóm chứng.

Quan sát dấu hiệu ngộ độc

- Không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc ở các nhóm thử trong thời gian theo dõi.
- Không có chuột chết trong quá trình thử nghiệm.

Kết luận

Mẫu thử Anticyfra 21-1 thử độc tính cấp trên chuột nhắt trắng có kết quả như sau: Dùng nguyên mẫu thử tiêm vào tĩnh mạch đuôi chuột với các mức liều từ 10,0 ml – 50 ml mẫu thử/ kg chuột không nhận thấy biểu hiện gì khác thường, không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi. Tất cả chuột đều ăn uống, hoạt động bình thường. Không xác định được liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD_{50}) vì không tìm được liều gây chết chuột.

3.2.9. Kết luận về nội dung tạo kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1

Nội dung nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên Cyfra21-1 đã được thực hiện thành công với các nội dung đã thực hiện từ việc tác dòng và xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa kháng nguyên, biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên, xác định cấu trúc bậc nhất của kháng nguyên Cyfra 21-1 cho tới việc sử dụng kháng nguyên để gây miễn dịch ở gà. Các gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể gà đặc hiệu Cyfra 21-1 được thu nhận từ tủy xương và tế bào lách gà đã gây miễn dịch để tạo thư viện scFv (kháng thể đơn chuỗi). Thư viện kháng thể đoan chuỗi được sử dụng để sàng lọc thu nhu nhận các dòng có ái lực cao với kháng nguyên đích.

Kháng thể đơn chuỗi scFv biểu lộ trên phage đặc hiệu Cyfra 21-1 được sử dụng như một thành phần cơ bản của Kit định lượng kháng nguyên ung thư phổi Cyfra 21-1 trong các mẫu huyết thanh khi sử dụng kỹ thuật real-time PCR. Như vậy, cũng như đối với trường hợp kháng nguyên HER2 trong ung thư vú, sử dụng kỹ thuật phage display và kỹ thuật real-time PCR cho phép định lượng chính xác kháng nguyên Cyfra 21-1 trong huyết thanh, một trong các chỉ thị quan trọng để chẩn đoán ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ. Hàm lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 trong các mẫu huyết thanh được định lượng chính xác ở mức nano gram. Trong đó đối với các mẫu có nồng độ Cyfra 21-1 bằng hoặc dưới mức 3,3 ng/ml được xem là bình thường (như trường hợp đối với mẫu HT5, có hàm lượng 1,2 ng/ml), nếu hàm lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 trong huyết thanh cao hơn ngưỡng 3,3 ng/ml được xem là có sự biểu hiện quá mức của kháng nguyên này (như đối với các trường hợp HT1 là 83 ng/ml; HT2 là 92,9 ng/ml; HT3 95,9 ng/ml; HT4 là 22,9 ng/ml). Những trường hợp hàm lượng Cyfra 21-1 cao cần có những xét nghiệm bổ sung để khẳng định có ung thư phổi hay không? hoặc một ung thư khác có liên quan tới hàm lượng Cyfra 21-1 cao, như ung thư thực quản (Esophageal Cancer) (Jens, 2000).

Kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1 không gây độc tính cho chuột thí nghiệm. Để có thể sử dụng kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1 làm nguyên liệu thuốc điều trị cần có những nghiên cứu tiếp theo về tác dụng dược lý trước khi xin phép để thử nghiệm lâm sàng.

Như vậy, nội dung nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ung thư phổi Cyfra 21-1 đã được hoàn thành xuất sắc. Hơn nữa, khi được biểu lộ trên phage kháng thể này được sử dụng làm Kit định lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 trong các mẫu huyết thanh.

3.3. TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU CD33 TRONG UNG THƯ MÁU

3.3.1 Tổng quan về ung thư máu và phân loại

Ung thư máu là sự tăng sinh của các tế bào máu không bình thường, các tế bào này thường là các tế bào bạch cầu và các tế bào gốc tạo máu. Quá trình tạo máu trải qua rất nhiều giai đoạn với rất nhiều loại tế bào trung gian được hình thành và chúng thường khu trú ở nhiều cơ quan khác nhau trước khi chín thành các tế bào có chức năng riêng biệt, do vậy rất nhiều loại ung thư máu.

Hiện nay, người ta chia ung thư máu ra làm ba nhóm lớn là ***Lymphoma***, ***Leukemia*** và ***Myeloma***, trong đó mỗi loại bệnh ung thư lại phân chia thành các phân nhóm nhỏ hơn ví dụ như: Lymphoma bao gồm Hodgkin và non-Hodgkin. Leukemia bao gồm: ung thư tế bào lympho cấp tính (Acute Lymphocytic Leukemia-ALL), ung thư tế bào lympho mạn tính (Chronic Lymphocytic Leukemia-CLL), ung thư tế bào hạt và đơn nhân cấp tính (Acute myelogenous Leukemia-AML), ung thư tế bào hạt và đơn nhân mạn tính (Chronic Myelogenous leukemia-CLL) …

Bệnh bạch cầu tủy bào cấp là sự tăng sinh quá mức các tế bào tuỷ non trong tuỷ xương và lan toả khắp cơ thể, đến mức bạch cầu được sinh ra cả ở các cơ quan ngoài tuỷ. Ở thể này, bệnh ung thư có thể sinh ra những bạch cầu đã biệt hoá một phần như leukemia bạch cầu hạt trung tính, bạch cầu ưa acid và bạch cầu đơn nhân. Song, các tế bào leukemia thường dị dạng không biệt hoá và không giống với các loại bạch cầu khác. Khi tế bào kém biệt hoá, bệnh càng cấp tính và dẫn đến tử vong nhanh và ngược lại, khi tế bào được biệt hoá thì thường là mạn tính.

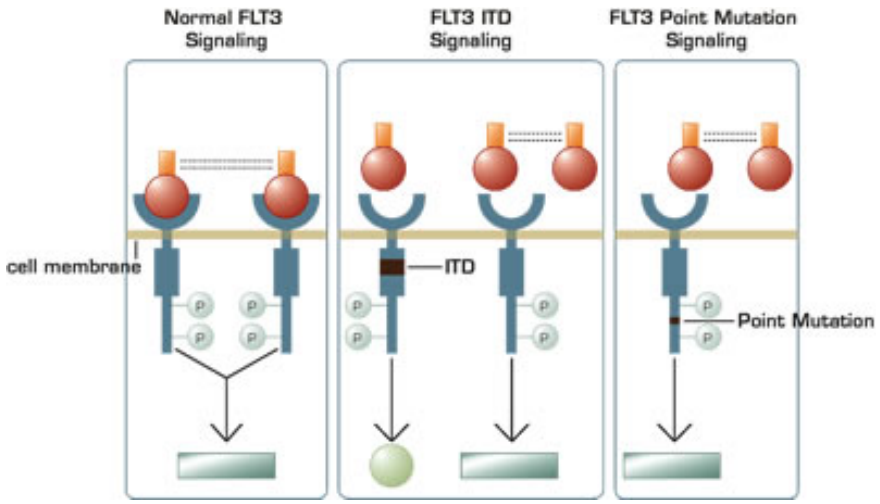
Đối với ung thư tế bào hạt và đơn nhân cấp tính (Acute myelogenous Leukemia-AML), các tế bào gốc tạo máu bị chuyển dạng. Những tế bào này lan rộng và tăng sinh trong máu, trong các xương trưởng thành và lấn át các tế bào tạo máu bình thường. Người ta đã tìm thấy tế bào đặc trưng cho AML đó

là các tế bào bạch cầu bị phình to (hình dạng của tế bào bạch cầu non thiếu giai đoạn biệt hoá cuối cùng).

Hầu hết những trường hợp ung thư máu tiền tuỷ cấp đều do sự chuyển đổi vị trí giữa nhiễm sắc thể 15 và 17 t(15,17). Tế bào t(15,17) có sự dung hợp giữa gen mã hoá thụ thể axit retinoic (RAR)α và gen *PML*. Retinoic acid có vai trò quan trọng trong sự trưởng thành của hệ miễn dịch. Protein xuất hiện trong t(15-17) sẽ ức chế mạnh mạnh hoạt tính của (RAR)α và do vậy sẽ ngăn cản sự trưởng thành của các tế bào dòng tuỷ. Một ví dụ phổ biến khác về dạng chuyển đổi nhiễm sắc thể khác là t(8,21) và đảo đoạn nhiễm sắc thể 16. T(8,21) là kết quả của sự kết hợp giữa gen AML1 (gen mã hoá cho tiểu đơn vị α của yếu tố liên kết lõi) trên nhiễm sắc thể 21 (NST 21) với gen ETO trên NST số 8. Sản phẩm tạo ra do sự chuyển đổi này có tác động tới hình dạng của các tế bào ung thư bạch cầu.

Ngoài nguyên nhân chuyển đoạn NST, các đột biến proto-oncogenne cũng dẫn tới sự hình thành bệnh AML. Gen FLT3 mã hoá cho thụ thể bề mặt tyrosine kinase, liên quan đến quá trình điều hoà phân bào, biệt hoá tế bào apoptosis của các tế bào gốc tạo máu. Nhưng ở khoảng 30-40% bệnh nhân AML người ta đã xác định được sự nhân đôi của gen FLT3 (hình 3. 83) . Điều đó có nghĩa rằng sự tăng sản phẩm của gen FLT3 có liên quan tới ung thư AML. Ngoài ra, các đột biến điểm và biểu hiện quá mức gen FLT3 cũng là nguyên nhân của bệnh AML.

Ngoài các đột biến gen nói trên, các nghiên cứu khác cho thấy sự sắp xếp lại ở một tiểu phần nhỏ của gen MLL trên NST 11q23 ở bệnh nhân AML Sự tái sắp xếp này chiếm 5-12% bệnh nhân AML, nó là hậu quả sự nhân đôi một phần gen MLL (từ exon 5 đến 11 hoặc 12). Đột biến ở gen mã hóa cho protein α (một protein liên kết với trình tự tăng cường CCAAT (CEBPA) giúp cho sự biệt hoá bình thường của các tế bào tuỷ tạo máu) cũng gây ra bệnh 5-14% bệnh AML, phổ biến là loại M1 và M2.



Hình 3.83. Các dạng đột biến gen FLT3 trong AML

Phân loại AML

Có nhiều cách phân loại AML theo các chỉ tiêu khác nhau. Theo hệ thống phân loại FAB, AML được phân chia thành 8 thể, từ thể M0 đến 7 (bảng 3.25).

Bảng 3.25. Phân loại các thể AML

Thể AML	Hình thái	Hoá học tế bào			Miễn dịch	Di truyền
		Peoxy sudan	PAS	Esterase KĐH		
M0:AML chưa biệt hoá(<3%)	Tế bào non chưa biệt hoá, không có hạt đặc hiệu	<3% (+)	(-)	(-)	CD 13,33,34	
M1:AML biệt hoá ít(<10%)	Hạt đặc hiệu, thể Auer xuất hiện trên một số ít tế bào non	>3% (+)	(-)	(-)	CD 13,33 HLA-DR	
M2:AML biệt hoá(>10%)	Hạt đặc hiệu, thể Auer có trên khoảng 30% tế bào non	(+++)	(-)	(-)	CD 13,33 HLA-DR	t(8;21)
M3: Lơxêmi cấp tiền tuỷ bào	Tiền tuỷ bào tăng hạt đặc hiệu và thể Auer. M3v: ít hạt đặc hiệu hoặc hạt nhỏ.	(+++)	(-)	(-)	CD 13,15,33	t(15;17)

M4: Lơxêmi cấp tuỷ-mono	Hỗn hợp tế bào non dòng hạt và dòng mono, tỷ lệ nguyên bào và tiền mono chiếm >20% M4Eo: Tăng các tế bào bất thường thuộc dòng bạch cầu ưa acid	(+/-)	(-)	(+) ức chế bởi sodium flourid	CD 11b,13,14 ,15,33. HLA-DR	M4Eo: inv(16)
M5: Lơxêmi cấp dòng mono	M5a: nguyên bào mono kém biệt hoá. M5b: nguyên bào mono biệt hoá. Các tế bào thuộc dòng mono chiếm>80% các tế bào tuỷ	(-)	(-)	(+) ức chế bởi sodium flourid	CD 11b,13,14 ,15,33. HLA-DR	
M6: Lơxêmi cấp dòng hồng cầu	Hồng cầu non chiếm >50% tế bào có nhân trong tuỷ. Tế bào non dòng hạt >30% các tế bào không thuộc dòng hồng cầu.	(+/-)	(+)	(-)	CD 33, HLA-DR	
M7: Lơxêmi cấp dòng tiểu cầu	Nguyên mẫu tiểu cầu >30% tế bào có nhân trong tuỷ.	(-)	(-)	(-)	CD 33, 41,61	

Điều trị bệnh bạch cầu tuỷ bào cấp (AML)

Điều trị bệnh bạch cầu tuỷ bào cấp (AML) phụ thuộc vào tuổi và dạng phụ của bệnh. Nói chung, phương pháp điều trị thường chia thành 2 giai đoạn:

(1) Điều trị làm thuyên giảm: Mục đích của giai đoạn điều trị này là giết các tế bào bạch cầu bên trong máu và trong tuỷ xương. Tuy nhiên, không thể giết hoàn toàn các tế bào bạch cầu bệnh, vì vậy cần phải điều trị kéo dài để ngăn chặn bệnh tái phát.

(2) Điều trị củng cố: Mục đích của giai đoạn điều trị này là tiêu diệt các tế bào bạch cầu bệnh còn lại bằng cách duy trì hoặc tăng liều điều trị nhằm hạn chế tối đa nguy cơ tái phát của bệnh.

Các biện pháp điều trị sử dụng trong các giai đoạn này bao gồm:

Hoá trị liệu: Hoá trị liệu là dạng điều trị làm thuyên giảm lượng tế bào bệnh chủ yếu. Hai hoá chất chủ yếu thường được sử dụng trong hoá trị liệu là cytarabine (Cytosar-U), được truyền tĩnh mạch liên tục trong 7 ngày và thuốc anthracycline chẳng hạn daunorubicin (Cerubidine) hoặc idarubicin (Idamycin) sử dụng trong 3 ngày, cần lưu ý rằng các loại thuốc này cũng phá huỷ rất nhiều tế bào máu bình thường. Những loại thuốc này có thể gây ra thiếu máu (anemia), viêm nhiễm và chảy máu. Nếu sau lần điều trị thứ nhất không làm thuyên giảm cần phải điều trị lặp lại một vài lần, đôi khi có thể điều trị kết hợp các loại thuốc phụ thuộc vào trạng thái sức khoẻ, và những vấn đề khác có liên quan tới tim, gan, thận. Hoá trị cũng có thể sử dụng trong giai đoạn điều trị củng cố.

Các dạng thuốc điều trị khác: Arsenic trioxide và all-trans retinoic acid (ATRA) là các thuốc chống ung thư có thể sử dụng độc lập hoặc kết hợp hoá trị liệu để làm thuyên giảm một dạng phụ của AML gọi là tiền bệnh bạch cầu tuỷ bào (promyelocytic leukemia). Những loại thuốc này làm cho các tế bào bạch cầu bệnh mang các đột biến gen đặc biệt được trưởng thành và chết. Bạch cầu tuỷ bào cấp dạng M3 đặc biệt hay gặp tình trạng rối loạn đông máu nặng, nhạy cảm với hoá trị nhất là All-trans retinoid acid. Về di truyền đây là bệnh do sự chuyển đổi nhiễm sắc thể t(15;17), chẩn đoán chính xác các dạng bạch cầu tuỷ cấp sẽ làm tăng hiệu quả điều trị, tăng cơ hội chữa trị khỏi bệnh

Điều trị miễn dịch: Là sử dụng các chất giúp cho hệ miễn dịch chống lại các tế bào ung thư. Các kháng thể đơn dòng là một trong số chất được sử dụng trong dạng điều trị này. Các kháng thể đơn dòng được tạo ra trong các phòng thí nghiệm nhưng chúng giống với các protein (các kháng thể) được tìm thấy trên các tế bào bạch cầu trong cơ thể chống lại các chất ngoại lai (các kháng nguyên).

Các thụ thể trên bề mặt tế bào là các glycoprotein được gắn với màng tế bào plasma, hướng ra ngoài môi trường và có vị trí gắn kết cho các ligand đặc hiệu (cytokines, hormones, growthfactors, neurotransmitters,...). Ligand gắn với các thụ thể tế bào tạo ra các tín hiệu sinh học và nó được lan truyền từ ngoài vào trong tế bào làm xuất hiện các phản ứng của tế bào như tăng sinh, biệt hoá, chết theo chương trình, tiêu hạt,... Các thụ thể trên bề mặt tế bào truyền các tín hiệu ligand rất khác nhau chẳng hạn các nhóm thụ thể, hoạt hoá một enzyme, mở một kênh ion.

Tạo kháng thể đặc hiệu với các thụ thể trên bề mặt tế bào là một thách thức lớn vì hầu hết chúng có số lượng quá ít không đủ để gây miễn dịch, ngoại trừ việc biểu hiện các gen tái tổ hợp. Nhiều thụ thể xuyên qua màng tế bào vài lần theo dạng hình sin (chẳng hạn, các thụ thể gắn kết với protein-G) và không thể biểu hiện như những đoạn tái tổ hợp hoà tan. Mô hình liên kết giữa thụ thể và kháng thể là yếu tố quan trọng nhất trong việc xác định hiệu ứng sinh học của kháng thể, nghĩa là liệu chúng có phong toả, trung hoà, hoạt hoá hoặc không ảnh hưởng gì tới chức năng của thụ thể. Kháng thể đơn dòng là công cụ hữu hiệu nhất để dò tìm, xác định sự biểu hiện và xác định chức năng của các thụ thể trên bề mặt tế bào.

Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) là một kháng thể đơn dòng gắn với một độc tố hoá học, ***calicheamicin,*** được sử dụng để điều trị những bệnh nhân lớn tuổi mắc bệnh AML, những người không có phản ứng với các điều trị ban đầu hoặc những bệnh nhân tái phát sau khi điều trị ban đầu đã có hiệu quả.

3.3.2. Ung thư máu liên quan tới sự biểu hiện mạnh CD33

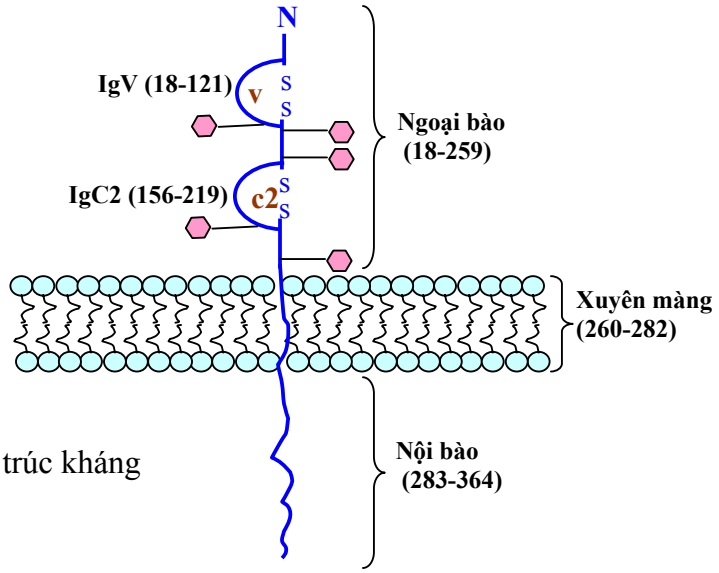
Kháng nguyên cụm biệt hoá (Cluster of Differentiation, CD) là những chỉ thị trên bề mặt tế bào lympho, chúng được sử dụng để phân biệt các dòng tế bào, các trạng thái phát triển và các cụm chức năng, chúng chỉ có thể nhận diện bằng các kháng thể đơn dòng và được đánh số, chẳng hạn CD1, CD2,

CD3, ... Quá trình hình thành các dấu ấn (marker) gắn liền với quá trình phát triển của tế bào máu và sự biệt hoá thành các dòng tế bào có chức năng riêng.

CD33 biểu hiện trên các tế bào gốc tạo máu, các tế bào hạt, tế bào tiền thân của đại thực bào và tế bào hồng cầu. Các tế bào gốc tạo máu chưa biệt hoá ở giai đoạn sớm nhất có khả năng tái tạo không biểu hiện CD33 trên bề mặt. CD33 được xác định có sự biểu hiện quá mức ở 90% các tế bào leukemic blast của bệnh nhân mắc AML, nhưng không biểu hiện trên các tế bào gốc tạo máu bình thường cũng như các tế bào của các mô không tạo máu. Như vậy, CD33 được xem là một chỉ thị quan trọng trong chẩn đoán bệnh bạch cầu cấp tính, nó cho phép phân biệt giữa các tế bào tủy xương cấp tính với các tế bào gốc bình thường.

Các lectin giống immunoglobulin (Ig) gắn với axit sialic (***siglecs***) đã được xác định là họ các thụ thể kết dính phụ thuộc vào axit sialic được biểu hiện dồi dào trong các tế bào tạo máu. Mỗi dạng tế bào máu phân biệt được các glucoprotein và các glucolipid có đuôi gắn với axit sialic. Ở người, có 7 dạng *siglec*, trong đó siglec 3 (CD33) có khối lượng phân tử nhỏ nhất. Ngoài ra trên vùng ngoại bào của tất cả các dạng siglecs, ở đầu N đều chứa vùng biến đổi (V) giống như Ig và tiếp theo là vùng hằng định C2 (Hình 3.84). Trên cùng một dạng tế bào có thể biểu hiện cùng lúc một số dạng *siglecs*. Các gốc gắn kết với axit sialic ở vùng biến đổi (V) của tất cả các siglecs chứa 2 gốc amino axit nhân thơm và một gốc Arginin. Sự gắn kết với ligand của các siglecs có thể xảy ra ở dạng *Cis*- và dạng *Trans*-và các dạng gắn kết này thể hiện các chức năng sinh học khác nhau. Vùng đuôi của các siglecs (ngoại trừ siglec 1), phần nằm trong nguyên sinh chất có một hoặc một số trình tự kiểu ức chế thụ thể miễn dịch tyrosine (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIM sequences). Vì vậy, các siglec được xem như các thụ thể ức chế, tham gia điều hòa chức năng miễn dịch.

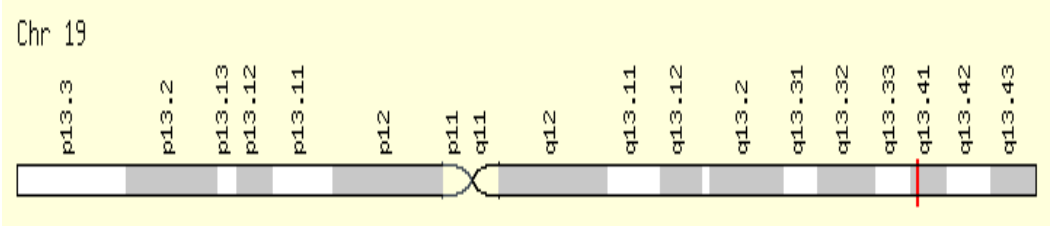
Vùng ngoại bào của CD33 (*siglec-3*), thành viên nhỏ nhất của họ *siglecs,* giống với cấu trúc của Immunoglobulin (Ig) và 2 trình tự kiểu ITIM ở nội bào (sơ đồ cấu trúc của CD33). Sau khi phosphorine hoá, CD33 có khả năng kết hợp với protein-tyrosine phosphatase, SHP-1 và SHP-2 và có thể hoạt động như một thụ thể ức chế khi kết hợp với CD64 trên các tế bào tuỷ xương. Các kháng thể kháng CD33 ngăn cản việc tạo ra các tế bào tua (dendritic cells) từ các tiền thân của bạch cầu đơn nhân (monocyte) và các tế bào tuỷ CD34 bằng cách tạo ra apoptosis.



Hình 3.84. Sơ đồ cấu trúc kháng nguyên CD33

Cấu trúc và sự biểu hiện của CD33

Gen mã hoá cho CD33 nằm trên nhiễm sắc thể 19 (hình 3.85 Các sản phẩm PCR được khuếch đại từ tất cả các dòng tế bào biểu hiện CD33 ở chuột cho thấy CD33 tồn tại ở hai dạng: CD33M kích thước 1358 bp và CD33m kích thước 976 bp. Trong đó cDNA của CD33m tương đồng tới 99% so với CD33 ở người (hCD33) ngoại trừ đoạn nucleotit từ vị trí 50 tới vị trí 430. Theo các nghiên cứu, vùng nucleotit này hoàn toàn thuộc về exon 2 gen CD33. Các phân tích cũng cho thấy dạng CD33m có thể là kết quả của quá trình cắt bỏ đoạn giữa exon 1 và exon 3.



Hình 3.85. Sơ đồ phân bố CD33 trên NST số 19

CD33 là một polypeptit gồm 364 amino acid, khối lượng phân tử 67 kDa. CD33 có các vùng chức năng như sau: chuỗi peptit tín hiệu (từ acid amin 1 đến 17); vùng ngoại bào có 241 amino acid gồm một vùng biến đổi V_2 (từ acid amin 18 đến 121) và một vùng hằng định C_2 (từ acid amin 156 đến 219); vùng xuyên màng (từ amino acid 260 đến 282); vùng đầu cacboxyl nằm trong tế bào chất. Dạng CD33m thiếu vùng V. Hai dạng CD33M và CD33m mã hoá cho hai protein có khối lượng tương ứng là 67 kDa và 40 kDa.

Sự khác biệt giữa hai protein này là 5 vị trí glycozyl hoá đầu N liên kết với asparagine. CD33M và CD33m dường như biểu hiện ngẫu nhiên trong cùng loại tế bào. CD33 biểu hiện ở tế bào dòng lympho có trình tự giống như CD33 dòng tuỷ. Do đó, những khác nhau về trọng lượng phân tử của hai dạng protein ở hai dòng này có thể là kết quả của quá trình sửa đổi sau dịch mã trong các loại tế bào khác nhau. CD33m mất vùng V không ảnh hưởng đến sự biểu hiện và tiết của protein tương ứng. Ngược lại, các cầu disulfide của phần nằm trong tế bào chất đóng vai trò quan trọng là tạo cấu hình không gian có hoạt tính. CD33 biểu hiện mạnh ở các tế bào đơn nhân, các đại thực bào, các tế bào Langerhan, các tế bào mast nhưng biểu hiện thấp ở các tế bào hạt. CD33 cũng được biểu hiện trên các tiểu phần của tế bào giết tự nhiên và tế bào lympho T. Kết quả nghiên cứu cho thấy CD33 là một chỉ thị đặc hiệu cho 70-90% tế bào blast của ung thư máu dạng AML.

Chức năng của CD33

Phần lớn các thụ thể thuộc họ siglecs được xác định là thụ thể ức chế, do sự có mặt của ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) nằm trong tế bào chất và bởi khả năng ức chế hoạt động của tế bào hoặc khả năng tương tác với các phosphatase. Protein tyrosine kinase sau khi được hoạt hoá bởi hệ thống thụ thể chứa ITAM (immunoreceptor tyrosine-based active motifs) sẽ phosphoryl hoá ITIM của thụ thể ức chế. Tyrosine bị phosphoryl hoá đóng vai trò như vị trí bám cho SHP-1, SHP-2 và SIP. Các enzyme này sau đó sẽ khử gốc phosphate của cơ chất nằm trong tương bào hoặc liên quan đến quá trình hoạt hoá tế bào. Hai trình tự giống ITIM trong tế bào chất của CD33 khiến nó được xem là thành viên trong họ thụ thể ức chế.

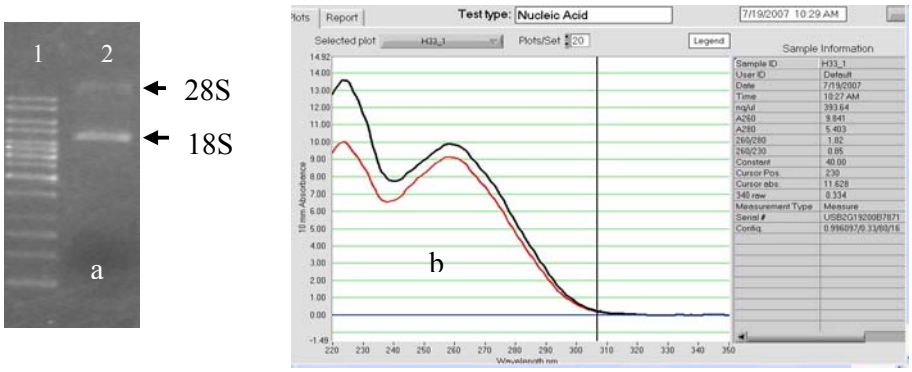
Nhiều tế bào biểu hiện CD33 cũng biểu hiện mạnh thụ thể có ái lực cao với IgG CD64. Hầu hết các thụ thể ức chế đều ức chế rất hiệu quả các tín hiệu sinh ra bởi hệ thống thụ thể chứa ITAM. Vì vậy, CD33 khi đồng liên kết có thể ức chế tín hiệu CD64, và từ đó nó cũng ức chế rất hiệu quả các quá trình hoạt hoá mà có sự tham gia của CD64. Cơ chế này sẽ khiến cho các tế bào biểu hiện CD33 không đáp ứng với các tín hiệu hoạt hoá tế bào đơn nhân. Khi các tế bào dòng tuỷ phát triển và CD33 không được biểu hiện, tế bào sẽ trở nên rất mẫn cảm với các kích thích thông qua thụ thể hoạt hoá CD64. Sự có mặt của CD33 đã phần nào làm giảm hoạt động dung giải của những tế bào giết tự nhiên khi phân tích hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể đối với các dòng tế bào p815 và K562.

3.3.3. Kết quả thu nhận kháng nguyên CD33

3.3.3.1. Kết quả tách dòng gen mã hóa kháng nguyên CD33

Mẫu tủy của bệnh nhân ung thư máu được thu và tách chiết RNA tổng số. Kết quả chiết tách được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% (hình 3.86 a).

Kết quả điện di cho thấy chúng tôi đã tách được RNA tổng số từ mẫu bệnh phẩm với độ nguyên vẹn và có độ tinh sạch cần thiết. Trên hình 3.86 a ta thấy xuất hiện 2 băng sáng tương ứng với các loại rRNA dạng 28S, 18S. Hàm lượng và độ tinh sạch của mẫu RNA còn được kiểm tra phổ hấp thụ trên máy NanoDrop-1000 (hình 3.86 b và bảng 3.26). Kết quả trên cho phép sử dụng RNA tách chiết được cho phản ứng tạo cDNA tiếp theo.



Hình 3.86. Kết quả kiểm tra RNA tổng số. (a) điện di, (b)- đo phổ hấp thụ

1 2: Các mẫu RNA được tách từ các mẫu tủy xương

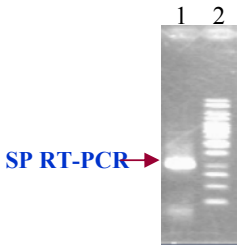
Bảng 3.26. Kết quả xác định hàm lượng và độ tinh sạch của các mẫu RNA

Plots | Report | Test type: Nucleic Acid | 7/19/2007 10:29 AM

Report Name | Max Buffer Size 200 | Buffer Mode Save Report & Clear

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
H33_1	Default	7/19/2007	10:27 AM	393.64	9.841	5.403	1.82	0.85	40.00	230	11.628	0.334
CD33_1	Default	7/19/2007	10:27 AM	362.65	9.066	4.780	1.90	1.06	40.00	230	8.591	-0.026

Gen mã hóa kháng nguyên CD33 được khuếch đại từ mẫu RNA với cặp mồi đặc hiệu Hu33F: 5'-tctgctcacacaggaagc-3'Hu33R: 5'-gtgttaaatctccaagaatcagcc-3'. Kết quả khuếch đại gen mã hóa CD33 được kiểm tra trên gel agarose (hình 3.78).



Hình 3.87. Kiểm tra kết quả tạo cDNA mã hóa CD33
1: Sản phẩm cDNA
2: Chỉ thị phân tử

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa kháng nguyên CD33 (**phụ lục 6**). Trình tự amino acid suy diễn từ sản phẩm đã tách dòng cụ thể như sau:

```
LLTQEALEAA SSDMPLLLLL PLLWAGALAM DPNFWLQVQE SVTVQEGLCV 50
LVPCTFFHPI PYYDKNSPVH GYWFREGAII SRDSPVATNK LDQEVQEETQ 100
GRFRLLGDPS RNNCSLSIVD ARRRDNGSYF FRMERGSTKY SYKSPQLSVH 150
VTDLTHRPKI LIPGTLEPGH SKNLTCSVSW ACEQGTPPIF SWLSAAPTSL 200
GPRTTHSSVL IITPRPQDHG TNLTCQVKFA GAGVTTERTI QLNVTYVPQN 250
PTTGIFPGDG SGKQETRAGV VHGAIGGAGV TALLALCLCL IFFIVKTHRR 300
KAARTAVGRN DTHPTTGSAS PKHQKKSKLH GPTETSSCSG AAPTVEMDEE 350
LHYASLNFHG MNPSKDTSTE YSEVRTQ                          377
```

3.3.3.2. Kết quả biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên CD33

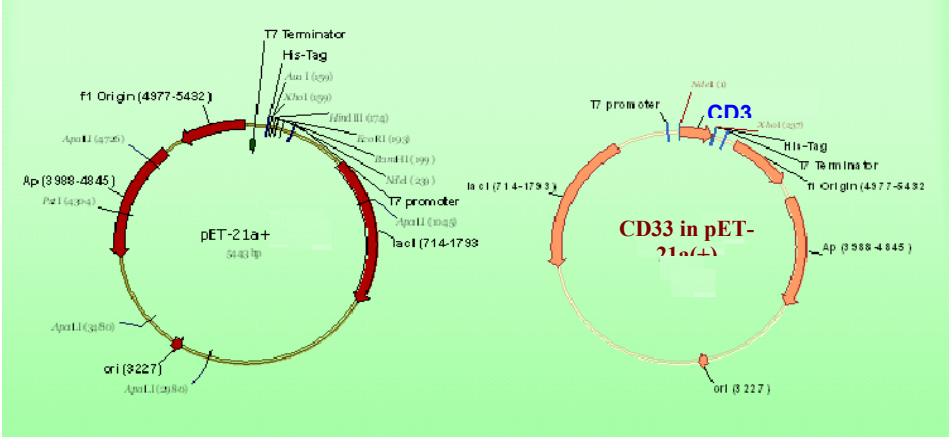
Gen mã hóa kháng nguyên CD33 sau khi được xác định và so sánh với các trình tự gen đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế được gắn chuyển vào vector biểu hiện pET 21 a(+) để biểu hiện trong *E. coli* BL21.

Cặp mồi để nhân và chuyển đoạn gen mã hóa kháng nguyên CD33 được gắn trình tự nhận biết của các enzyme *Nde*I và *Xho*I cụ thể trình tự mồi như sau:

Ex33F: 5'-tggcgcctcATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCC-3',

Ex33R: 5'-AGCCGGCCTGGGTCCTGACCTCTGAGTATTCG-3'.

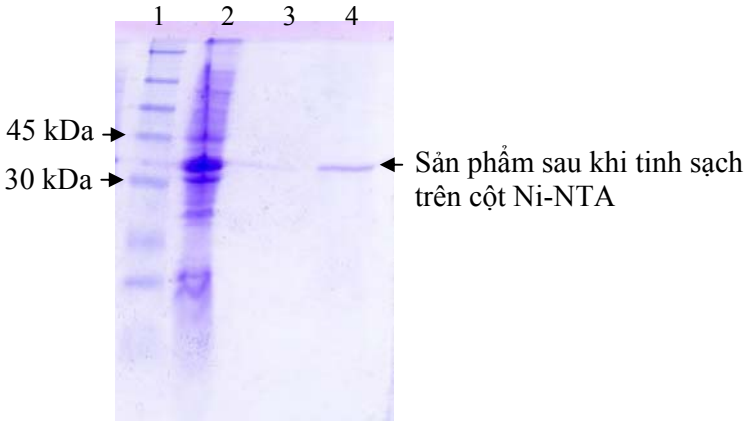
Đoạn gen mã hóa kháng nguyên CD33 được gắn vào vector biểu hiện pET 21a(+) theo sơ đồ trên hình 3.88



Hình 3.88. Sơ đồ gắn gen mã hóa CD33 trong vector pET-21a(+)

Kết quả gắn gen mã hóa CD33 vào vector biểu hiện pET-21a(+) được kiểm tra bằng xác định trình tự nucleotide, sau đó được chuyển nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để biểu hiện. Kết quả biểu hiện được thể hiện trên hình 3.89.

Như vậy, việc biểu hiện và tinh sạch sản phẩm trên cột sắc ký ái lực Ni-NTA đạt kết quả tốt. Sử dụng sản phẩm đã tinh sạch để gây miễn dịch ở gà. Các bước gây miễn dịch và tách dòng gen mã hóa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 cũng được thực hiện theo quy trình như đã thực hiện với các kháng nguyên HER2 và Cyfra 21-1.



Hình 3.89. Điện di kiểm tra sự biểu hiện gen mã hóa CD33 trong *E.coli* BL21

1: Marker protein

2: Mẫu biểu hiện sau khi cảm ứng với IPTG

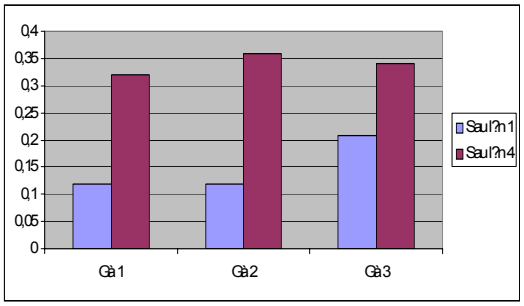
3-4: Các mẫu sau khi tinh sạch trên cột sắc ký ái lực Ni-NTA

3.3.4. Kết quả gây miễn dịch động vật thí nghiệm bằng CD33

Gà sau khi gây miễn dịch một tuần với kháng nguyên CD33, và sau khi gây miễn dịch lần thứ 4 được lấy huyết thanh để kiểm tra đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên CD33. Kết quả đáp ứng miễn dịch khi kiểm tra bằng phản ứng ELISA được trình bày trên bảng 3.27 và hình 3.90.

Bảng 3.27. Kết quả xác định đáp ứng miễn dịch ở gà sau khi gây miễn dịch với CD33.

Thời gian lấy mẫu	Gà 1	Gà 2	Gà 3
Sau khi gây miễn dịch lần 1	0,119	0,118	0,207
Sau khi gây miễn dịch lần thứ 4	0,319	0,358	0,341



Hình 3.90. Kết quả kiểm tra đáp ứng miễn dịch ở gà sau khi gây miễn dịch bằng CD33

Như vậy, cũng như đối với trường hợp gây miễn dịch gà bằng kháng nguyên HER2 và kháng nguyên Cyffra 21-1, gây miễn dịch gà bằng kháng nguyên CD33 có nguồn gốc từ người cũng cho đáp ứng miễn dịch cao. Đây là cơ sở đảm bảo cho việc tách dòng gen mã hóa các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 đã gây miễn dịch.

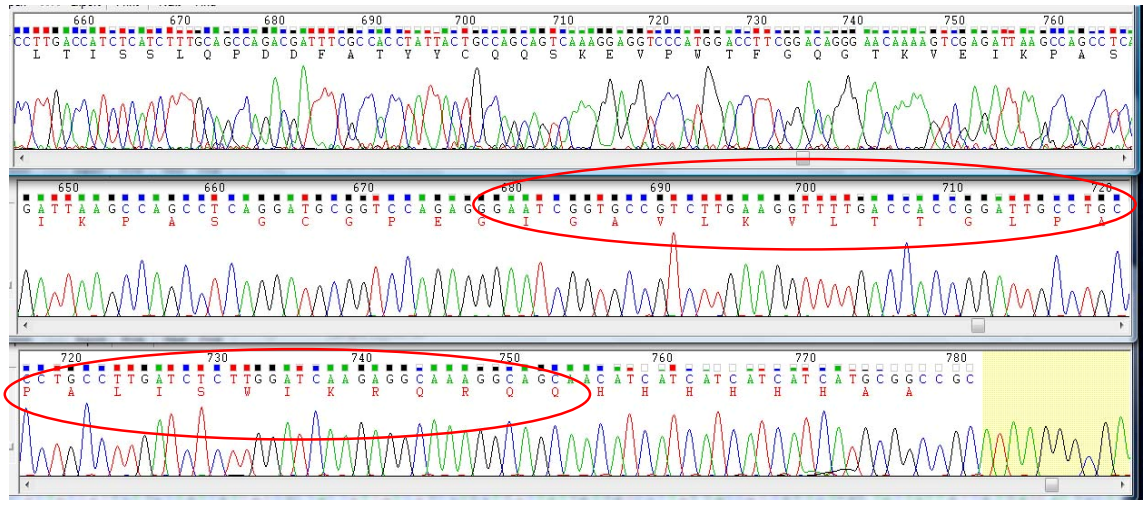
3.3.5. Kết quả thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33

3.3.5.1. Kết quả tách dòng gen mã hóa kháng thể đặc hiệu CD33

Kết quả tách dòng gen mã hóa kháng thể đặc hiệu CD33 cũng được thực hiện như đối với các gen mã hóa kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên HER2

và Cyfra 21-1. Gen mã hóa kháng thể scFv đặc hiệu kháng nguyên CD33 cũng được gắn kết với peptide melittin để tạo immunotoxin-CD33. Kết quả xác định trình tự gen mã hóa Immunotoxin-CD33 (ảnh chromas được trình bày ở **phụ lục 6)** có trình tự gồm 259 amino acid (phần trình tự melittin được gạch chân) (hình 3.91)

```
KVSCKASGYT FTDYNMHWVR QAPGQGLEWI GYIYPYNGGT GYNQKFKSKA 50
TITADESTNT AYMELSSLRS EDTAVYYCAR GRPAMDYWGQ GTLVTVSSGG 100
GGSGGGGSDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASEDNYGI SFMNWFQQKP 150
GKAPKLLIYA ASNQGSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP DDFATYYCQQ 200
SKEVPWTFGQ GTKVEIKPAS GCGPEGIGAV LKVLTTGLPA LISWIKRQRQ 250
QHHHHHHAA                                              259
```



Hình 3.91. Ảnh Chromas trình tự gen mã hóa immunotoxin-CD33 đăc hiệu CD33

Khi so sánh trình tự gen mã hóa phần kháng thể (trong immunotoxin-CD33) đặc hiệu CD33 đã nhận được với các trình tự gen đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế chúng tôi nhận được sự tương đồng 100% với các trình tự có ký hiệu I79103; AAB44430; ABE 26107,...

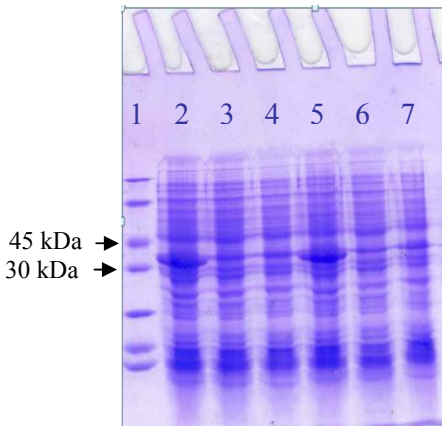
Trình tự gen mã hóa Immunotoxin-CD33 đã được đăng ký trong nhân hàng gen quốc tế với mã số AM 402974

3.3.5.2. Kết quả biểu hiện và tinh sạch kháng thể đặc hiệu CD33

Sau khi đã tạo được vector biểu hiện, chúng tôi biến nạp vector này vào tế bào khả biến *E. coli* chủng BL21 (DE3) Star, dịch biến nạp được trải trên môi trường LB đặc có chứa Ampicillin. Đĩa cấy trải được ủ ở 37°C qua đêm.

Chúng tôi chọn một khuẩn lạc ra nuôi trong môi trường LB lỏng chứa 100 µg/ml Amp. Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C, qua đêm. Sau đó nuôi hoạt hóa 2% dịch nuôi qua đêm, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C cho đến khi đạt OD_{600} = 0,6. Thu một phần dịch nuôi để làm mẫu trước cảm ứng, phần còn lại cảm ứng bằng IPTG với nồng độ 0,6 mM có bổ sung glucose 1,5 %. Mẫu trước cảm ứng và cảm ứng được nuôi lắc trong cùng điều kiện, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C và 28°C và thu mẫu sau 4 giờ. Các mẫu sau khi xử lý sẽ được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamid.

Vector mà chúng tôi sử dụng để biểu hiện gen kháng thể đặc hiệu CD33 là pET-21a(+), vector này có chứa promotor Lac, bình thường promotor này sẽ bị ức chế bởi một protein ức chế, do đó mặc dù gen anti-CD33 được gắn vào vector biểu hiện nhưng không biểu hiện được hoặc biểu hiện được nhưng với lượng cực thấp. Khi môi trường có chất cảm ứng (IPTG), chất này sẽ liên kết với protein ức chế làm cho protein này không có khả năng liên kết và làm bất hoạt promotor nữa, do đó protein tái tổ hợp sẽ được tạo ra với lượng lớn. Chính vì vậy chúng tôi đã dùng IPTG để cảm ứng và thu mẫu trước và sau khi cảm ứng để so sánh và xác định protein tái tổ hợp có được tạo ra hay không. Để xác định điều đó, chúng tôi tiến hành chạy điện di biến tính trên gel polyacrylamid. Các mẫu trước và sau cảm ứng được ly tâm thu tế bào, tế bào này sẽ được xử lý với dung dịch đệm màu SDS sau đó biến tính ở 100°C trong 10 phút. Sau khi xử lý, các mẫu được tra vào bản gel polyacrylamid đã được chuẩn bị sẵn, chạy điện di với cường độ dòng điện 30 mA. Nhuộm bằng dung dịch nhuộm. Kết quả điện di được thể hiện trên hình 3.92.



Hình 3.92 : Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp

1: Marker protein

2, 5: Mẫu sau cảm ứng nuôi lắc ở 37°C và 28°C

3, 6: Mẫu không cảm ứng với IPTG

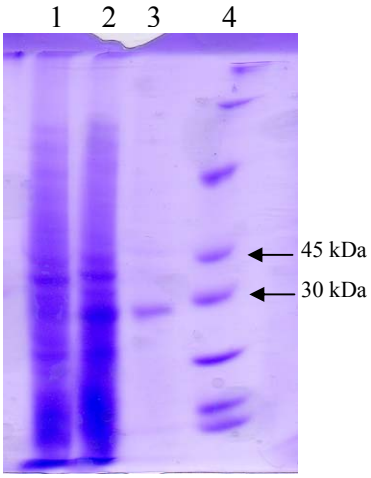
4, 7: Mẫu trước cảm ứng

Từ kết quả điện di có thể thấy các mẫu trước cảm ứng và sau cảm ứng bằng IPTG có sự khác biệt rõ rệt. Các mẫu sau cảm ứng xuất hiện một băng đậm có kích thước xấp sỉ 34 kDa, trong khi các mẫu trước cảm ứng không xuất hiện băng này. Kích thước của băng protein là hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Như vậy rất có thể protein tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công. Lượng biểu hiện cho thấy không có sự khác nhau rõ rệt giữa các mẫu cảm ứng ở nhiệt độ 37°C và 28°C. Tuy nhiên để xác định xem đó có phải là protein tái tổ hợp mong muốn hay không chúng tôi tiến hành biểu hiện lượng lớn và tinh sạch trên cột Ni-NTA.

Để tinh sạch protein này, chúng tôi sử dụng 900 µl dịch phá tế bào (thực hiện phá tế bào tương tự như bước điện di protein), bổ sung vào đó 240 µl dung dịch chứa hạt Ni-NTA Magnetic Agarose 5%. Hỗn hợp này được ủ lắc 1 giờ nhằm tạo điều kiện cho các protein chứa đuôi His-tag liên kết với hạt Ni-NTA, sau đó hỗn hợp được đưa lên giá từ trong 1 phút rồi loại dịch nổi. Cặn thu được chính là phức protein-hạt Ni-NTA, để loại bỏ hoàn toàn protein không đặc hiệu (không liên kết với hạt Ni-NTA), rửa cặn thêm vài lần bằng đệm rửa (Wash Buffer), loại dịch nổi. Sau đó bổ sung đệm tách (Elution Buffer), đảo đều, ủ trên giá từ rồi thu dịch nổi. Dịch nổi chính là dung dịch

protein cần tinh sạch, do đệm giải hấp có tác dụng phá vỡ liên kết giữa protein và hạt Ni-NTA.

Dịch protein sau khi tinh sạch được đem chạy điện di trên gel polyarylamide Tricine-SDS-Page cùng với mẫu chưa tinh sạch (hình 3.93).



Hình 3.93. Kết quả tinh sạch protein tái tổ hợp

1: Mẫu trước cảm ứng

2: Mẫu sau cảm ứng

3: Mẫu sau khi tinh sạch trên cột Ni-NTA

4: Marker protein

Trên ảnh điện di có thể thấy, ở đường chạy số 3 xuất hiện một băng protein rõ nét, có kích thước tương tự với băng cảm ứng ở đường chạy 2, điều đó có nghĩa là protein nhận được sau tinh sạch có đuôi *His-tag*, và kích thước tương tự với kích thước của sản phẩm protein nhận được sau cảm ứng và protein nhận được có độ tinh sạch cao. Tuy nhiên, để khẳng định sản phẩm thu được chính là kháng thể đặc hiệu CD33 chúng tôi đã tiến hành phân tích cấu trúc bậc nhất của sản phẩm bằng khối phổ.

Xác định cấu trúc của kháng thể đơn dòng tái tổ hợp đặc hiệu CD33

Để khẳng định sản phẩm thu được sau tinh sạch chính là sản phẩm theo thiết kế, nghĩa là sản phẩm sau tinh sạch chính là kháng thể đơn dòng tái tổ hợp đặc hiệu CD33, chúng tôi đã tiến hành phân tích trình tự amino acid của sản phẩm thu được sau khi tinh sạch bằng khối phổ.

Trong quá trình phân tích khối phổ protein được xử lý với trypsin. Theo lý thuyết, trypsin sẽ cắt protein tại các vị trí axit amin R (Arginine) và K

(Lysine), như vậy với trình tự axit amin suy diễn ở trên khi xử lý với trypsin sẽ nhận được các đoạn peptide xác định như trên bảng 3.28

Bảng 3.28. Các peptide thu được khi xử lý kháng thể đặc hiệu CD33 bằng trypsin

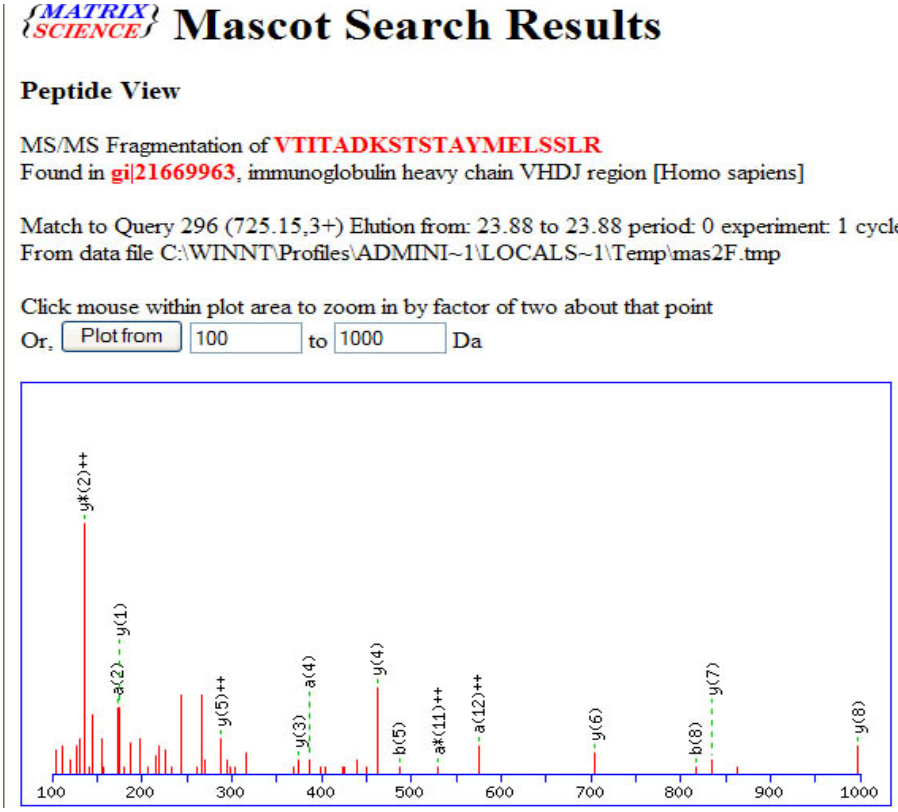
Vị trí cắt	Enzyme cắt	Đoạn peptide nhận được	Số axit amin nhận được
18	Trypsin	DIQMTQSPSSLSASVGDR	18
24	Trypsin	VTITCR	6
41	Trypsin	ASEDNYGISFMNWFQQ	16
44	Trypsin	K	1
47	Trypsin	PGK	3
50	Trypsin	APK	3
63	Trypsin	LLIYAASNQGSGVPSR	16
94	Trypsin	FSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSK	31
105	Trypsin	EVPWTFGQGTK	11
109	Trypsin	VEIK	4
139	Trypsin	PASGCGPEGSGGGGSGGGGSLEDMGCPYGP	30
140	Trypsin	K	1
141	Trypsin	K	1
142	Trypsin	K	1
143	Trypsin	R	1
144	Trypsin	K	1
159	Trypsin	VGGQVQLVQSGAEVK	15
160	Trypsin	K	1
166	Trypsin	PGSSVK	6
170	Trypsin	VSCK	4
185	Trypsin	ASGYTFTDYNMHWVR	15
210	Trypsin	QAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQK	25

212	Trypsin	FK	2
214	Trypsin	SK	2
234	Trypsin	ATITADESTNTAYMELSSLR	20
245	Trypsin	SEDTAVYYCAR	11
247	Trypsin	GR	2
end	Trypsin	PAMDYWGQGTLVTVSSHHHHHHAA	24

Kết quả phân tích khối phổ của kháng thể đặc hiệu CD33 được trình trên bảng 3.29 và hình 3.94

Bảng 3.29. Kết quả các đoạn peptide nhận được sau khi phân tích khối phổ

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
295	725.15	2172.42	2172.10	0.32	0	(15)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
296	725.15	2172.43	2172.10	0.34	0	(32)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
297	725.15	2172.44	2172.10	0.34	0	(13)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
298	725.16	2172.45	2172.10	0.35	0	(16)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
299	725.16	2172.47	2172.10	0.37	0	(11)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
300	725.16	2172.47	2172.10	0.37	0	(17)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
301	725.17	2172.48	2172.10	0.38	0	(10)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
302	725.17	2172.49	2172.10	0.39	0	(8)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
303	725.17	2172.49	2172.10	0.39	0	46	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR
304	725.17	2172.50	2172.10	0.40	0	(15)	1	ATITADVSTSTVYMELSSLR



Hình 3.94. Phổ phân tích kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33

Như vậy, kết quả phân tích khối khổ cho phép khẳng định kháng thể nhận được sau tinh sạch chính là kháng thể đặc hiệu kháng nguyên cần thu nhận theo thiết kế.

Phân tích cấu trúc không gian của kháng thể đặc hiệu CD33 nhận được

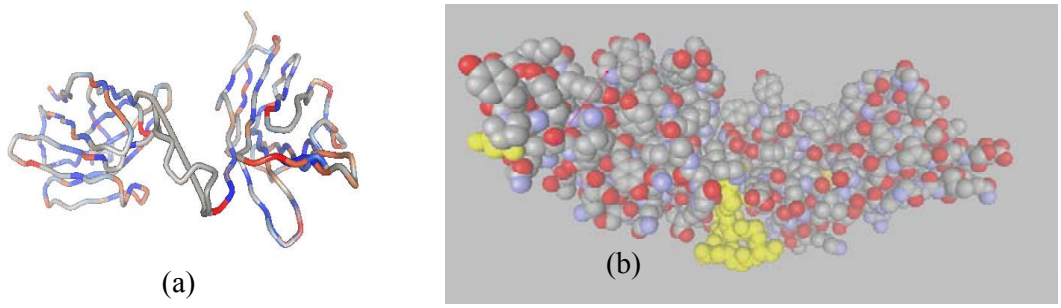
Để có thể dự đoán hoạt tính sinh dược của kháng thể nhận được trong các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi đã tiến hành phân tích cấu trúc không gian của kháng thể bằng phần mềm SWISS.PDBVIEWER V3.7 (http://www.expasy.org/spdbv).

Từ trình tự axit amin của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 đã suy diễn và được xác nhận bởi kết quả phân tích khối phổ là:

```
KVSCKASGYT FTDYNMHWVR QAPGQGLEWI GYIYPYNGGT GYNQKFKSKA 50
TITADESTNT AYMELSSLRS EDTAVYYCAR GRPAMDYWGQ GTLVTVSSGG 100
```

```
GGSGGGGSDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASEDNYGI SFMNWFQQKP 150
GKAPKLLIYA ASNQGSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP DDFATYYCQQ 200
SKEVPWTFGQ GTKVEIKPAS GCGPEGIGAV LKVLTTGLPA LISWIKRQRQ 250
QHHHHHHAA                                              259
```

Phân tích cấu trúc không gian sau khi phân tích khối phổ:được sử dụng để phân tích cấu trúc không gian của kháng thể đặc hiệu CD33 bằng phần mềm SWISS.PDBVIEWER V3.7 (http://www.expasy.org/spdbv). Các axit amin đầu N (DI) và vùng liên kết nối giữa V_H và V_L (SSGGGGSGGGGSGG) được đánh dấu mầu vàng ở phần trình tự axit amin cũng được nhận biết bởi phần có mầu vàng ở mô hình cấu trúc không gian (hình 3.95)

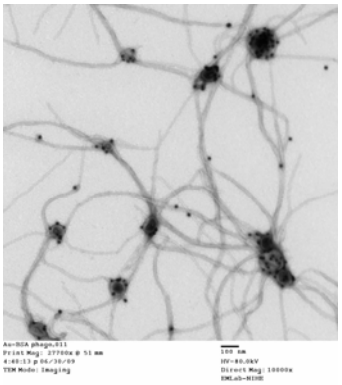


Hình 3.95. Mô hình cấu trúc không gian của kháng thể đặc hiệu CD33. Các axit amin biểu thị dạng hình que (a) và dạng hình cầu (b).

Kết quả phân tích cấu hình không gian cho thấy các vùng biến đổi V_L và V_H của kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD33 nhận được không có sự cuộn xoắn vào nhau mà chúng được phân bố tách biệt nhau. Điều này có nghĩa là khả năng liên kết với kháng nguyên CD33 của từng vùng biến đổi (V_H và V_L) không bị thay đổi và chúng có khả năng hoạt động tương đối độc lập nhau. Nói cách khác, đoạn peptide liên kết mà chúng tôi đã tạo ra để gắn kết trình tự V_H và V_L có độ linh động thích hợp và không làm ảnh hưởng tới hoạt tính riêng của các đơn vị cấu trúc nếu xét theo khía cạnh cấu trúc không gian của toàn bộ phân tử tái tổ hợp.

3.3.6. Kết quả gắn scFv với hạt nano vàng để tạo Kit định tính

Kiểm tra kết quả gắn hạt vàng lên kháng thể phage đặc hiệu CD33 được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử (hình 3.96) cho thấy các hạt vàng được gắn chủ yếu vào đầu của phage, nghĩa là gắn chủ yếu vào phần kháng thể đặc hiệu CD33.

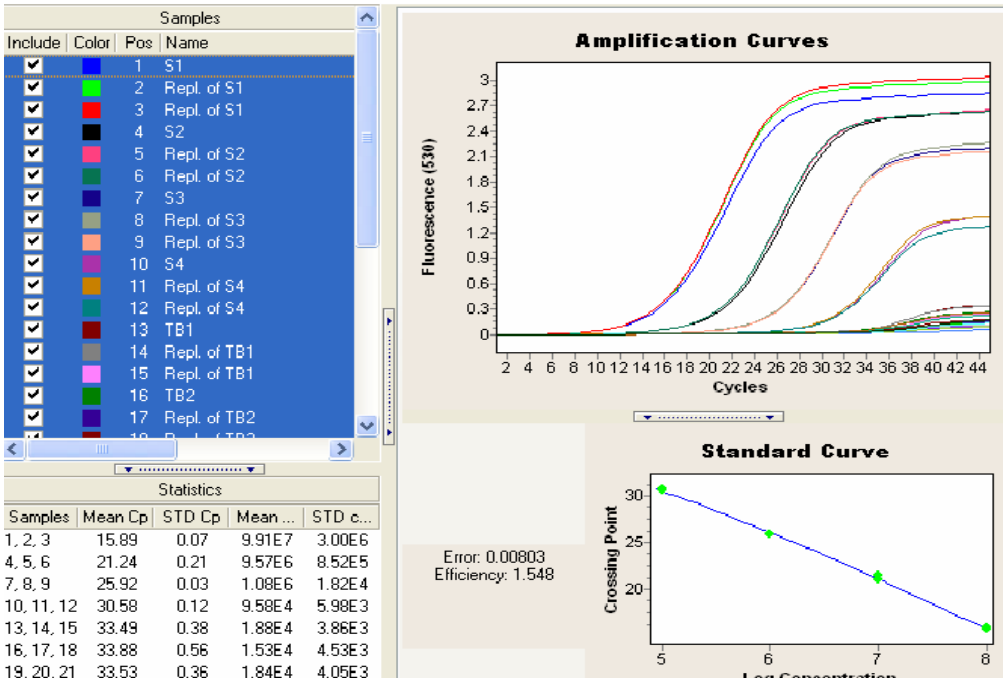


Hình 3.96. Ảnh chụp kính hiển vi điện tử kháng thể phage gắn hạt nano vàng

3.3.7. Kết quả tạo KIT định lượng kháng nguyên CD33

Gen mã hóa các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 (do đề tài tạo ra và đăng ký trong Ngân hàng gen quốc tế với mã số AM402973, **phụ lục 7**) đã được gắn vào vector pHEN2 để tạo kháng thể phage. Kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 của Hãng Sigma và kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD33 do đề tài tạo ra. Các mẫu bệnh phẩm ung thư dạng tiền tủy cấp do Bệnh Viện Bạch Mai cung cấp. QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (Roche).

Kết quả phản ứng real-time PCR khi xây dựng đường chuẩn nồng độ được trình bày tại hình 3.97. Sự tương quan giữa tín hiệu huỳnh quang nhận được trong real-time PCR với lượng kháng nguyên CD33 đã sử dụng. Trên hình 3.97: nồng độ S1 cao nhất nên có tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng sớm nhất với Cp=15,89, tiếp theo là S2 có Cp = 21,24, S3 có Cp = 25,92, và S4 có Cp = 30,58.

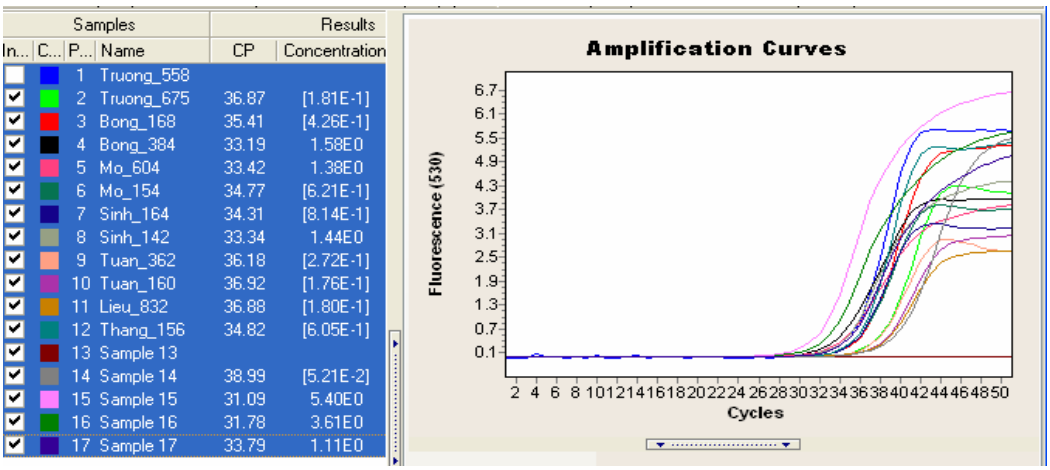


Hình 3.97. Kết quả real-time PCR khi xây dựng đường chuẩn nồng độ S1: Tương ứng với phage nhận được từ giếng phủ 100 ng kháng nguyên CD33, S2: Tương ứng với phage nhận được từ giếng phủ 10 ng kháng nguyên CD33; S3: Tương ứng với phage nhận được từ giếng phủ 1 ng kháng nguyên CD33; S4: Tương ứng với phage nhận được từ giếng phủ 0,1 ng kháng nguyên CD33.

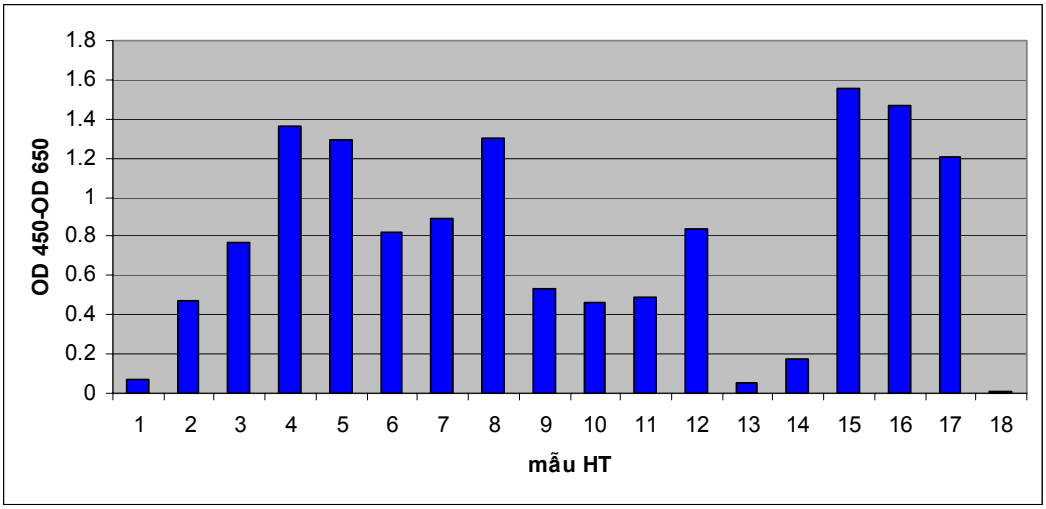
Định lượng kháng nguyên CD33 trong các mẫu bệnh phẩm

Các mẫu huyết thanh được định lượng song song bằng hai cách: định lượng sơ bộ bằng kỹ thuật ELISA và định lượng bằng kỹ thuật PDRTI-PCR. Các kết quả cho thấy có sự tương đương giữa hai kỹ thuật: Những mẫu có nồng độ CD33 tính theo nanogam cao thì cũng có OD cao trong kết quả bán định lượng.

Kết quả định lượng của một số mẫu huyết thanh bệnh được trình bày tại hình 3.98 và kết quả tương ứng bằng kỹ thuật bán định lượng (hình 3.99).



Hình 3.98: Kết quả định lượng kháng nguyên CD33 trong các mẫu huyết thanh



Hình 3.99. Kết quả bán định lượng bằng kỹ thuật ELISA

Sự tương ứng kết quả trên cùng một mẫu thử

Kỹ thuật ELISA cũng có thể xác định hàm lượng kháng nguyên trong các mẫu phân tích. Vì vậy, để khẳng định tính ưu việt của phương pháp định lượng dựa trên kỹ thuật phage kết hợp với kỹ thuật real-time PCR, chúng tôi đã tiến hành xác định mối tương đồng giữa các kết quả nhận được bằng kỹ thuật ELISA và kết quả nhận được kỹ thuật sử dụng kháng thể phage kết hợp với real-time PCR (bảng 3.30).

Bảng 3.30. Nồng độ kháng nguyên trong các mẫu huyết thanh

TT	Giá trị Cp	Lượng CD33 trong giếng (ng)	CD33 trong 1 ml huyết thanh (ng)	OD (trong kết quả ELISA)	Tỷ lệ tế bào blast trong máu và (tủy)
1	-	-	-	<0,1	0, (0)
2	36,87	0,0024	2,4	0,45	2,4%
3	35,41	0,0052	5,2	0,75	68%
4	33,19	0,0159	15,9	1,35	0
5	33,42	0.0143	14,3	1,30	0
6	34,77	0,0071	7,1	0,8	2%
7	34,31	0,0089	8,9	0,9	6%
8	33,34	0,0148	13,8	1,30	85% (88%)
9	36,18	0,0036	3,6	0,55	0
10	36,92	0,0024	2,4	0,45	0
11	36,88	0,0025	2,5	0,50	0 (45%)
12	34,82	0,0071	7,1	0,85	
13	-	-	-	<0,1	Người khỏe

Đối chiếu với các xét nghiệm huyết học khác

Kết quả chẩn đoán thông qua định lượng kháng nguyên CD33 trong các mẫu huyết thanh với các kết quả phân tích huyết học khác được trình bày trên bảng 3.31.

Bảng 3.31. Kết quả định lượng kháng nguyên CD33 và các kết quả huyết học

STT	Tên BN	Ngày	CD33	Các xét nghiệm huyết học khác
1	Nguyễn Trọng Tr AML	12/3	2,4ng/mL	**CTM:**HC:5.63T/L;TC:240G/L;BC:5.19G/L; BCTT 52.7 %;Lym: 34.5%;Mono: 8.7 %;BC ưa acid: 3.5%;BC ưa Base:0.6 %; **TB blast: 0%**
		17/3	0	**CTM:**HC:5.45T/L;TC:240G/L;BC:6.2G/L; BC TT : 79.8 % 60%; Lym: 11.3 %;Mono: 7.4 %;BCưa acid:1.3% BCưa Base: 0.2: 0%;**TB blast 0%.**

2	Nguyễn Hữu B AML	13/2	5,2ng/mL	**CTM:**HC:3.74T/L;TC:24G/L;BC:5.04G/L;BC TT : 16 %; Lym: 14%;Mono: 2%; **TB blast:** 68%
		5/3	15,9ng/mL	**CTM:HC:**3.73T/L;TC:219G/L;BC:4.42G/L;B CTT 9.5 %; Lym: 22,4%;Mono: 8,1% **TB blast : 0% ;POD +; Sudan:+;Esterase:+**
3	Nguyễn Thị M ALL	18/2	7,1ng/mL	**CTM:**HC:2.92T/L;TC:141G/L;BC:2.6G/L;BC TT:5.3 %; Lym: 12.7%; **TB blast: 0%**
		6/3	14,3ng/mL	**CTM:**HC:4.25T/L;TC:165G/L;BC:2.13G/L:B CTT: 68.4 %; Lym: 25.9%;Mono: 3.5%;BC ưa acid: 0.6%;BC ưa base: 0.3%;**TB blast : 0%**
4	Bùi Văn S CML→AML	7/1	8,9ng/mL	**CTM:**HC:2.96T/L;TC:299G/L;BC:2.67G/L; BCTT : 8 %; Lym: 60 %;Mono: 8 %;BCưa acid: 16%;BC ưa base: 0 %;**TB Blast : 8%**
		18/2	13,8ng/mL	**CTM**:HC:1.44T/L;TC:105G/L;BC:63.3G/L; BC TT : 9 %; Lym: 5 %; **TB Blast : 86 %; POD:+;Sudan:+;Esterase:+**

Bàn luận

Leukemia cấp dòng tuỷ (Acute myelogenous leukemia, AML) là một bệnh lý ác tính của tổ chức tạo máu. Bệnh được đặc trưng bởi sự tăng sinh một loại tế bào non chưa biệt hoá hoặc biệt hoá rất ít, có nguồn gốc là tế bào gốc định hướng dòng tuỷ, bệnh làm suy giảm quá trình sinh tạo máu bình thường của cơ thể. Đây là một trong những bệnh máu ác tính thường gặp ở người lớn, ở các nước phương Tây leukemia cấp dòng tuỷ chiếm 40% trong tổng số các trường hợp leukemia, trong đó leukemia cấp ở người lớn chiếm 80% và ở trẻ em chiếm 15-21% (Ravandi, 2004). Tại Việt Nam theo nghiên cứu của Trần Thị Minh Hương (2000) tại viện Huyết Học Truyền Máu trên

2089 bệnh nhân trong 3 năm 1997-1999, leukemia cấp dòng tuỷ chiếm 54,6% các trường hợp bệnh máu ác tính.

Chẩn đoán leukemia cấp dòng tuỷ chủ yếu dựa vào chọc hút tuỷ xương, nhuộm Giemsa và hoá học tế bào. Bệnh được chẩn đoán xác định khi tế bào non ác tính chiếm > 30% tế bào có nhân trong tuỷ xương.

CD33 là một protein xuyên màng, biểu hiện trên các tế bào gốc tạo máu, các tế bào hạt, tế bào tiền thân của đại thực bào và tế bào hồng cầu. Các tế bào gốc tạo máu chưa biệt hoá ở giai đoạn sớm nhất có khả năng tái tạo không biểu hiện CD33 trên bề mặt. CD33 được xác định có sự biểu hiện quá mức ở 90% các tế bào leukemic blast của bệnh nhân mắc AML (Acute myelogenous Leukemia), nhưng không biểu hiện trên các tế bào gốc tạo máu bình thường cũng như các tế bào của các mô không tạo máu. CD33 được xem là một chỉ thị quan trọng trong chẩn đoán bệnh bạch cầu cấp tính, nó cho phép phân biệt giữa các tế bào tủy xương cấp tính với các tế bào gốc bình thường. Do vậy việc định lượng chính xác lượng kháng nguyên CD33 tự do trong máu có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong việc chẩn đoán bệnh và giúp cho việc điều trị có hiệu quả hơn.

Trong công trình này chúng tôi trình bày phương pháp định lượng kháng nguyên CD33 trong huyết thanh dựa vào sự kết hợp các kỹ thuật hiện đại nhất trong sinh học phân tử như real-time PCR, phage display với sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Thông qua việc xác định mẫu chuẩn kỹ thuật ***PDRTI-PCR*** thể hiện có độ chính xác tới nanogam. Mẫu S3 nồng độ CD 33 là 1ng với Cp =25,92; mẫu S4 nồng độ CD 33 là 0,1ng với Cp=30,52: tất cả đều <35.

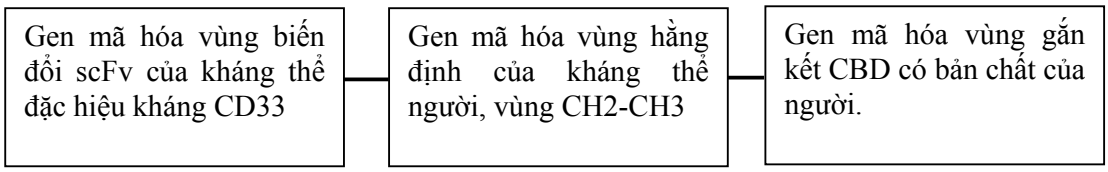
Khi tiến hành định lượng song song các mẫu huyết thanh bằng cả hai kỹ thuật ELISA và PDRTI-PCR đều cho kết quả tương ứng (bảng 3.30). Đối chiếu với các xét nghiệm huyết học khác như công thức máu, huyết đồ xác định tỷ lệ tế bào blast và các xét nghiệm hóa tế bào, tuy bước đầu số bệnh

nhân không nhiều, nhưng chúng tôi có một số nhận xét theo bảng 3.31 như sau. Sự tương ứng giữa tế bào blast và nồng độ CD33 : ở mẫu 1 và 13 (người bình thường) không có tế bào blast trong máu ngoại vi, nồng độ CD33 = 0. Ở các mẫu thử 2, 6, 7 số lượng tế bào blast trong máu thấp, nồng độ CD33 cũng thấp, ở các mẫu tế bào blast nhiều (mẫu 3, 8) nồng độ CD33 tăng cao là điều dễ hiểu. Tuy nhiên, ở các mẫu 4,5 nồng độ CD33 khá cao nhưng không thấy tế bào blast, điều này có thể nhận thấy rõ hơn trong bảng 3.31. Bệnh nhân Nguyễn Hữu B được định lượng hai lần 1 CD33 là 5,2 ng/mL khi tỷ lệ tế bào blast là 68%. lần 2 CD33 là 15,9 ng/mL khi tỷ lệ tế bào blast chỉ 0%. Cũng tương tự, bênh nhân Nguyễn Thị M khi tế bào blast 2% nồng độ CD33 là 7,1 ng/mL và ở mẫu thử sau gần một tháng điều trị, tế bào blast là 0% thì nồng độ CD33 lại tăng 14,3 ng/mL. Chúng tôi cho rằng CD33 được định lượng là CD33 tự do tồn tại trong huyết thanh, vì vậy rất có thể khi tế bào blast bị phá hủy không còn trong máu nữa thì CD33 được giải phóng, chính vì vậy mà nồng độ CD33 trong huyết thanh vẫn cao. Điều này có nghĩa là sự có mặt của CD33 trong huyết thanh tồn tại lâu hơn sự có mặt của tế bào blast trong máu. Chúng tôi cho rằng đây có thể là một ưu thế có thể lợi dụng được trong chẩn đoán và theo dõi AML. Tuy nhiên để làm sáng tỏ điều này chúng tôi cần có sự theo dõi nhiều mẫu thử ở các giai đoạn khác nhau của cùng một bệnh nhân. Cũng trong bảng 2 bệnh nhân Nguyễn Thị M được lâm sàng chẩn đoán là ALL nhưng các kết quả mà chúng tôi định lượng CD33 đều cho nồng độ khá cao. Chúng tôi không tìm được xét nghiệm tế bào ở bệnh nhân này nên không giám khẳng định, nhưng về lý thuyết thì sự phân biệt về hình thái của tế bào lympho non và tế bào bạch cầu non khác đôi khi cũng gặp khó khăn.

3.3.8. Kết quả tạo gen kháng thể dạng ghép đặc hiệu CD33

Kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên CD33 cũng được tạo ra theo quy trình tạo kháng thể dạng ghép đặc hiệu HER2 đã trình bày ở phần

trên, nghĩa là kháng thể dạng ghép bao gồm: ***Vùng biến đổi*** được tách dòng từ thư viện scFv có bản chất của người; Gen mã hóa ***vùng hằng định CH2-CH3***, gen mã hóa ***vùng gắn kết với chitin*** đều được tách dòng từ các tế bào lympho của người. Gen tái tổ hợp mã hóa cho kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên CD33 cũng lắp ráp theo sơ đồ sau:



Trình tự amino acid của kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên CD33 được trình bày tại hình 3.100 và **phụ lục 8.**

```
MKKVLMAFII CLSLILSVLA APPSGAGAAF EDIQMTQSPS SLSASVGDRV   50
TITCRASEDN YGISFMNWFQ QKPGKAPKLL IYAASNQGSG VPSRFSGSGS  100
GTDFTLTISS LQPDDFATYY CQQSKEVPWT FGQGTKVEIK PASGCGPEGS  150
GGGGSGGGGS LEDMGCPYGP KKKRKVGGQV QLVQSGAEVK KPGSSVKVSC  200
KASGYTFTDY NMHWVRQAPG QGLEWIGYIY PYNGGTGYNQ KFKSKATITA  250
DESTNTAYME LSSLRSEDTA VYYCARGRPA MDYWGQGTLV TVPGEPKSCD  300
KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP  350
EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC  400
KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG  450
FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN  500
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGKAGTF CQGKADGLYP NPRERSSFYS  550
CAAGRLFQQS CPTGLVFSNS CKCCTWN*                          577
```

Hình 3.100. Trình tự amino acid của kháng thể dạng ghép đặc hiệu CD33

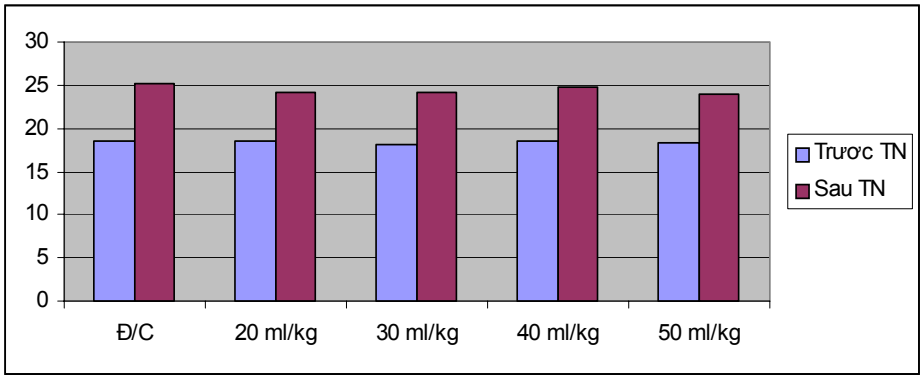
3.3.9. Kết quả xác định độc tính của kháng thể đặc hiệu CD33

Trọng lượng cơ thể chuột ở nhóm chứng và các nhóm thử đều tăng trọng lượng cơ thể trong thời gian theo dõi (bảng 3.32. và hình 3.101).

Bảng 3.32. Sự thay đổi trọng lượng chuột khi uống kháng thể đặc hiệu CD33

TT	**Nhóm 1 (20 ml/kg)**		STT	**Nhóm 2 (30 ml/kg)**	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
1	18.5	24.0	11	18.0	24.5
2	18.5	25.0	12	18.0	23.5
3	18.0	23.5	13	18.0	24.5
4	18.5	24.5	14	18.0	26.0
5	19.0	23.5	15	18.0	25.0
6	19.0	24.0	16	18.5	23.5
7	18.5	25.5	17	19.0	24.5
8	18.0	24.0	18	18.5	24.0
9	18.5	23.5	19	18.0	23.5
10	18.5	24.5	20	18.0	23.0
STT	**Nhóm 3 (40 ml/kg)**		STT	**Nhóm 4 (50 ml/kg)**	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
21	18.5	25.5	31	18.0	24.0
22	19.0	24.5	32	18.5	23.5
23	19.0	24.0	33	18.0	24.5
24	19.0	24.0	34	18.5	25.0
25	18.5	24.5	35	18.0	24.5
26	18.5	26.0	36	18.0	24.0
27	18.0	25.5	37	18.5	24.0
28	18.0	23.5	38	18.0	23.5
29	18.5	25.0	39	18.5	24.0
30	18.0	24.5	40	19.0	23.5

STT	Nhóm chứng		STT	Nhóm chứng	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
41	18.0	25.5	46	18.5	27.0
42	18.5	25.0	47	19.0	26.5
43	18.5	23.5	48	19.0	25.0
44	18.0	24.5	49	18.5	24.5
45	18.5	26.0	50	19.0	23.5



Hình **3.101**. Sự thay đổi trọng lượng chuột khi uống kháng thể đặc hiệu CD33

Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột

- Nhóm chứng: Hoạt động và ăn uống bình thường
- Các nhóm thử: Sau khi uống thuốc và trong 7 ngày theo dõi nhóm thử, không nhận thấy có biểu hiện gì khác thường so với nhóm chứng.

Quan sát dấu hiệu ngộ độc

- Không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc ở các nhóm thử trong thời gian theo dõi.
- Không có chuột chết trong quá trình thử nghiệm.

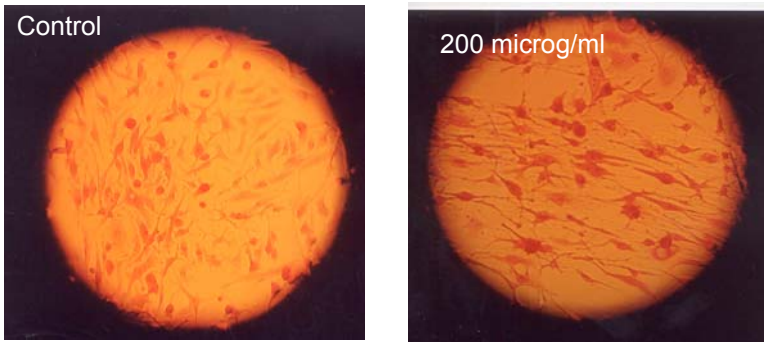
Kết luận

Mẫu thử Anti CD33 gửi tới yêu cầu thử độc tính cấp trên chuột nhắt trắng có kết quả như sau: Dùng nguyên mẫu thử tiêm vào tĩnh mạch đuôi chuột với các mức liều từ 10,0 ml – 50 ml mẫu thử/ kg chuột không nhận thấy

biểu hiện gì khác thường, không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi. Tất cả chuột đều ăn uống, hoạt động bình thường. Không xác định được liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD_{50}) vì không tìm được liều gây chết chuột.

3.3.10. Kết quả thử hoạt tính Immunotoxin-CD33

Kháng thể scFv đặc hiệu CD33 gắn với peptide làm tan tế bào melittin được biểu hiện trong *E.coli* để tạo Immunotoxin và kết quả thử hoạt tính làm tan tế bào của Immunotoxin này trên dòng tế bào nuôi cấy cho thấy khả năng làm tan tế bào của Immunotoxin (hình 3.102).



Hình 3.102. Kết quả xác định khả năng làm tan tế bào của Immunotoxin

3.3.11. Kết luận về nội dung tạo kháng thể đặc hiệu CD33

Nội dung nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 đã được thực hiện thành công với các nội dung đã thực hiện từ việc tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa kháng nguyên, biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên cho tới việc sử dụng kháng nguyên để gây miễn dịch ở gà. Các gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể gà đặc hiệu CD33 được thu nhận từ tủy xương và tế bào lách gà đã gây miễn dịch để tạo thư viện scFv (kháng thể đơn chuỗi).

Kháng thể đơn chuỗi scFv biểu lộ trên phage đặc hiệu CD33 được sử dụng như một thành phần cơ bản của Kit định lượng kháng nguyên ung thư CD33 trong các mẫu huyết thanh khi sử dụng kỹ thuật real-time PCR. Như vậy, cũng như đối với trường hợp kháng nguyên HER2, Cyfra 21-1, sử dụng kỹ thuật phage display và kỹ thuật real-time PCR cho phép định lượng chính xác kháng nguyên CD33 trong huyết thanh.

Kháng thể đặc hiệu CD33 không gây độc tính cho chuột thí nghiệm. Để có thể sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 làm nguyên liệu thuốc điều trị cần có những nghiên cứu tiếp theo về tác dụng dược lý trước khi xin phép để thử nghiệm lâm sàng.

3.4. BÀN LUẬN

3.4.1. Kháng nguyên tái tổ hợp

Quy trình thu nhận các kháng nguyên tái tổ hợp mà đề tài đã thực hiện là phù hợp và là quy trình chuẩn hiện đang được sử dụng ở các phòng thí nghiệm về sinh học phân tử trên thế giới. Quy trình được thực hiện với các bước cơ bản sau: (1) tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa kháng nguyên, (2) thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên, (3) tinh sạch và phân tích cấu trúc bậc nhất của kháng nguyên, (4) sử dụng các kháng nguyên làm nguyên liệu để gây miễn dịch cũng như trong các phân tích miễn dịch. Các kháng nguyên đích mà đề tài cần thu nhận là HER2 trong ung thư vú, Cyfra 21-1 trong ung thư phổi tế bào không nhỏ và CD33 trong ung thư máu đều là những kháng nguyên trên bề mặt các tế bào ung thư. Vì vậy, để tăng hiệu quả đối với việc biểu hiện và thu nhận kháng thể ở giai đoạn tiếp theo chúng tôi chỉ nhân bản và tách dòng gen mã hóa đoạn ngoại bào của các kháng nguyên này. Cụ thể, đối với kháng nguyên HER2, CD33 chúng tôi chỉ biểu hiện một phần ngoại bào để sử dụng làm nguyên liệu cho gây miễn dịch ở động vật thí nghiệm. Đối với kháng nguyên Cyfra 21-1 chúng tôi chỉ sử

dụng một đoạn ngắn có chứa epitope để biểu hiện và sử dụng các các thí nghiệm tiếp theo.

Với các kết quả đã nhận được có thể nhận thấy rằng việc sử dụng đoạn peptide ngắn có chứa epitope (ví dụ, đối với Cyfra 21-1) của kháng nguyên đích làm nguyên liệu để gây miễm dịch, thu nhận kháng nguyên có những ưu điểm hơn so với các đoạn peptide có kích thước dài (ví dụ, đối với kháng nguyên CD33, HER2). Theo các kết quả nghiên cứu mới nhận được (chúng tôi chưa công bố và cũng không phải là nội dung chính của đề tài nghiên cứu này) thì trong trường hợp gây miễn dịch bằng các epitope có thể sử dụng kỹ thuật biểu lộ trên phage (phage display technology) để tạo nguyên liệu gây miễn dịch. Nghĩa là sử dụng trực tiếp các epitope biểu lộ trên phage để gây miễn dịch. Khi đó phage đóng vai trò như một chất mang đối với các epitope được biểu lộ trên bề mặt. Một trong các ưu điểm của phương pháp này là sự đơn giản trong quá trình tạo nguyên liệu gây miễn dịch, quá trình gây miễn dịch cũng đơn giản hơn.

Sử dụng gà để gây miễn dịch là một trong những điểm mới, sáng tạo của đề tài nghiên cứu này. Như chúng ta đã biết một số protein có tính bảo thủ cao giữa các loài động vật có vú. Ví dụ, tương ứng với HER2 ở người thì ở chuột là neu. Người ta đã phát hiện protein neu ở chuột trước khi phát hiện ra protein HER2 tương ứng ở người. Hai protein này cũng có chức năng như nhau và có độ tương đồng rất cao. Do đó, nếu sử dụng kháng nguyên HER2 để gây miễn dịch ở động vật có vú như ở chuột, thỏ, thì đáp ứng miễn dịch sẽ thấp hơn ở gà. Vì vậy, chúng tôi đã sử dụng gà để gây miễn dịch đối với cả 3 kháng nguyên HER2, Cyfra 21-1 và CD33. Kết quả phân tích đáp ứng miễn dịch sau khi gây miễn dịch cho thấy sự lựa chọn này là phù hợp và có thể áp dụng đối với các trường hợp cần thu nhận kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên khác có bản chất từ người hoặc từ các loài động vật có vú.

3.4.2. Phương pháp thu nhận kháng thể

Quy trình thu nhận kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên đích: HER2 trong ung thư vú, Cyfra 21-1 trong ung thư phổi và CD33 trong ung thư máu mà đề tài đã thực hiện có sự kết hợp của các kỹ thuật hiện đại và tiên tiến nhất trong sinh học phân tử như kỹ thuật gen, kỹ thuật PCR, real-time PCR, kỹ thuật miễn dịch phân tử, kỹ thuật phage display. Các kháng thể được thu nhận từ các gen tái tổ hợp mã hóa cho các kháng thể đơn chuỗi (scFv) hoặc gen mã hóa cho các minibody (khi gắn scFv với các vùng hằng định của kháng thể người), tạo các immunotoxin khi gắn với các peptide gây độc tế bào.

Gen mã hóa cho các kháng thể tái tổ hợp được thu nhận dưới dạng các block: gen mã hóa cho "block"-scFv được thu nhận từ thư viện các đoạn scFv có nguồn gốc từ các kháng thể gà hoặc từ thư viện Griffin-1 (nhận được từ trung tâm công nghệ protein của Vương Quốc Anh). Còn "block"-CH2-CH3 và "block"-hCBD được tách dòng trực tiếp từ các tế bào lympho của người. Riêng đối với "block"-melittin để tạo immunotoxin một nguyên liệu quan trọng để tạo chế phẩm thuốc điều trị có bản chất kháng thể được tách dòng từ ong mật Việt Nam *Apis cerana.*

Các đoạn kháng thể đơn chuỗi (scFv) chủ yếu là đơn trị, được tạo bởi sự gắn kết vùng biến đổi của chuỗi nặng với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thông qua đoạn polypeptide linh động. Cấu trúc scFv vẫn duy trì được khả năng gắn kết với kháng nguyên của kháng thể "bố mẹ" chúng có kích thước nhỏ và có những ưu điểm vượt trội trong chẩn đoán và điều trị (Presta, 2003; Holliger và Hudson, 2005). Các phân tử scFv có khả năng xâm nhập vào khối u cao hơn và tốc độ trung hòa nhanh hơn so với các kháng thể "bố mẹ" (Beckman, 2007; Carter, 2001). Các cấu trúc scFv có thể được sử dụng để tạo ra những "Modul scFv" mới để làm tăng hóa trị của phân tử (tạo các phân tử kép, các diabody), tức là tăng khả năng liên kết đáp ứng cho chẩn đoán và điều trị trong điều kiện *in vivo* (Volkel, 2001; Turner, 1977; Kortt, 2001). Rất nhiều dạng scFv hướng

đích các tế bào ung thư hiện đang được thử nghiệm tiền lâm sàng và có những hiệu quả đáng khích lệ, trong đó có dạng scFv tăng đáng kể ái lực liên kết (Peterson, 2008). Những hiểu biết sâu về cấu trúc và chức năng của các gốc amino acid trong scFv đóng vai trò rất quan trọng trong việc tìm kiếm và dự đoán các chức năng của scFv, đặc biệt là những hiểu biết ở mức độ nguyên tử đối với cấu trúc không gian ba chiều cần thiết cho việc duy trì các chức năng sinh học của kháng thể.

Phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên mà đề tài đã thực hiện có sự quan tâm tới các gốc amino acid trong miền biến đổi, miền chịu trách nhiệm gắn kết với kháng nguyên. Các kháng thể đơn dòng sản xuất theo phương pháp Kohler và Milstein (1975) có ứng dụng rất lớn trong nghiên cứu khoa học để xác định mối tương tác giữa các phân tử, xác định các quyết định kháng nguyên,... Tuy nhiên, khi ứng dụng trong điều trị lại gặp những trở ngại về tính hiệu quả do chúng nhanh chóng bị trung hoà (cơ thể người bệnh sinh kháng thể kháng lại nó, gọi tắt là hiện tượng HAMA). Phần lớn các kháng thể đơn dòng được thử nghiệm vào giai đoạn 1980-1987 có bản chất hoàn toàn của chuột đều không thành công, ứng dụng thử nghiệm lâm sàng đối với các kháng thể dạng này đã giảm mạnh và hoàn toàn chấm dứt vào năm 2003. Hơn nữa, phương pháp này khá phức tạp mà hiệu quả thu nhận được các dòng tế bào hybridoma có khả năng sản xuất kháng thể đặc hiệu kháng nguyên là không cao. Đặc biệt đối với các kháng nguyên ung thư là các kháng nguyên có nguồn gốc từ tế bào người. Vì vậy, để khắc phục vấn đề này các nhà khoa học đã sử dụng kỹ thuật gen để: tạo kháng thể đơn dòng dạng ghép và kháng thể có bản chất của người hoàn toàn để tạo chế phẩm thuốc sử dụng cho điều trị. Từ những kết quả nghiên cứu của đề tài, chúng tôi nhận thấy rằng quy trình tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích (HER2, Cyfra 21-1, CD33) là phù hợp và hiệu quả. Sử dụng quy trình này có thể thu nhận các kháng thể có khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên đích.

Kỹ thuật phage display được sử dụng để tạo thư viện các đoạn scFv đặc hiệu kháng nguyên ung thư có nguồn gốc từ kháng thể gà là một phương pháp mới do Jennifer và cộng sự đề xuất năm 2000. Ưu điểm của phương pháp này là hiệu quả thu nhận các kháng thể cao hơn so với phương pháp tạo hybridoma và đặc biệt là các kháng thể thu nhận theo phương pháp này có ái lực cao với các kháng nguyên đích.

Kết quả xác định đặc tính về cấu trúc, khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khi sử dụng để phân tích định lượng các kháng nguyên này trong huyết thanh đã góp phần khẳng định sử dụng kỹ thuật gen và kỹ thuật phage display để tạo thư viện scFv của kháng thể có nguồn gốc từ gà là phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích có hiệu quả. Các kháng thể tạo được có ái lực cao với các kháng nguyên đích, đặc biệt là các kháng nguyên có nguồn gốc từ động vật có vú là những protein có tính bảo thủ cao trong quá trình tiến hóa nên thường có đáp ứng miễn dịch không cao khi sử dụng để gây miễn dịch ở động vật có vú.

Tuy nhiên, cũng như đối với quy trình tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích bằng kỹ thuật hybridoma, việc chọn lựa hệ biểu hiện các gen tái tổ hợp mã hóa kháng thể đặc hiệu các kháng nguyên đích là một trong những khó khăn và trở ngại chính cần phải được tiếp tục nghiên cứu. Hiện nay, các nhà khoa học đang tìm kiếm các hệ biểu hiện khác nhau (như hệ biểu hiện ở nấm men, biểu hiện ở thực vật, ở động vật, ở các dòng tế bào nuôi cấy,...) để có thể biểu hiện một cách có hiệu quả nhất đối với các protein tái tổ hợp, đặc biệt là các protein sử dụng trong y học (chủ yếu là các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ung thư, các kháng nguyên của bệnh tự miễn). Một protein tái tổ hợp có thể biểu hiện tốt ở hệ biểu hiện này nhưng lại biểu hiện kém ở hệ biểu hiện khác. Mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp phục thuộc vào nhiều yếu tố, nhưng một trong các yếu tố cần quan tâm là cấu trúc bậc nhất của protein cần biểu hiện.

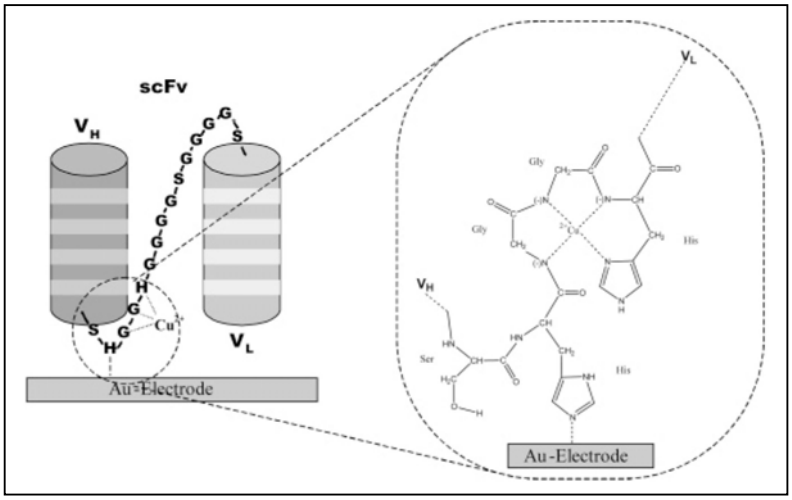
Vì vậy, để có thể biểu hiện tốt gen mã hóa các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích (HER2, Cyfra 21-1, CD33) có hiệu quả, thu được đủ lượng kháng thể cần thiết cho việc tạo chế phẩm thuốc điều trị cần có những nghiên cứu tiếp thể để lựa chọn hệ biểu hiện thích hợp nhất cho mỗi gen tái tổ hợp đã tạo ra.

3.4.3. KIT định lượng các kháng nguyên đích

Kit xác định nhanh các tác nhân gây bệnh, các chỉ thị khối u được thực hiện chủ yếu dựa trên nguyên tắc tương tác **kháng nguyên-kháng thể**. Đây là phản ứng có độ nhạy và tính đặc hiệu cao theo nguyên lý ổ khóa-chìa khóa. Để xác định các kháng nguyên, người ta thường gắn các kháng thể đơn dòng với các chất tạo mầu hoặc các chất có tính phát quang và phức hệ này được sử dụng để tạo các que thử nhanh xác định các kháng nguyên đích. Các Kit thử như vậy rất thuận lợi cho việc định tính, sàng lọc nhanh và đặc biệt có lợi ích đối với các trường hợp cần định tính tại hiện trường, hoặc trong các trường hợp mà kháng nguyên đích là chỉ thị có tính chất quyết định, như trường hợp các bệnh do khuẩn, virus gây ra.

Theo nội dung nghiên cứu của đề tài chúng tôi đã gắn thành công các kháng thể scFv biểu lộ trên phage với các hạt nano vàng. Các phức hệ scFv-Au đã được kiểm tra bằng kính hiển vi truyền qua và kính hiển vi điện tử. Các kết quả này cho thấy các hạt nano vàng bám dính chủ yếu vào phần scFv trên bề mặt phage, chỉ một phần nhỏ bán dính vào phần thân của phage. Theo công bố của Zhihong Shen và cs (2005) thì hạt vàng được gắn vào Histidin (hình 3.103). Điều này cũng giải thích tại sao các hạt vàng được dính chủ yếu vào phần đầu scFv biểu lộ trên bề mặt phage. Vì đây là vùng chứa đuôi 6 histidin. Đuôi His-tag được thiết kế giúp cho việc tinh sạch trên cột Nikel đối với các kháng thể đơn chuỗi scFv khi biểu hiện ở các chủng không ức chế (ví dụ, chủ *E. coli* HB2151), nên hoạt tính nhận biết và gắn kết đặc hiệu với kháng

nguyên của scFv không bị thay đổi sau khi gắn kết với các hạt nano vàng (kết quả ELISA phức hệ scFv đặc hiệu HER2 trên phage được gắn với các hạt nano vàng, Đối với các trường hợp scFv đặc hiệu CD33 và Cyfra 21-1 cũng cho kết quả tương tự.)



Hình 3.103. Mô hình phức hệ scFv với hạt nano vàng sử dụng để tạo Biosensor

Như vậy, với các quy trình nghiên cứu thực hiện đề tài, chúng tôi đã tạo được các phức hệ scFv-Au đặc hiệu các kháng nguyên ung thư (kháng nguyên HER2 trong ung thư vú, kháng nguyên CD33 trong ung thư máu, kháng nguyên Cyfra 21-1 trong ung thư phổi). Các phức hệ này đã được xác định cấu trúc, vị trí gắn kết của các hạt nano vàng dưới kính hiển vi truyền qua và kính hiển vi điện tử. Tuy nhiên, việc ứng dụng các phức hệ scFv-Au tạo Kit định tính nhanh các kháng nguyên ung thư cần phải có những trang thiết bị chuyên dụng và với dây chuyền sản xuất thích hợp.

Để có thể ứng dụng các kết quả của đề tài vào thực tiễn chúng tôi đã xây dựng phương pháp định lượng kháng nguyên ung thư dựa trên các scFv biểu lộ trên thực khuẩn thể. Vì như chúng ta đã biết, đối với các trường hợp mà kháng nguyên đích (kháng nguyên ung thư đích) chỉ có ý nghĩa đặc hiệu về mặt số lượng thì việc định lượng chính xác hàm lượng của nó trong một đơn vị thể tích là rất quan trọng. Ví dụ, đối với trường hợp kháng nguyên HER2

trong ung thư vú. HER2 là thành viên của họ thụ thể các yếu tố phát triển biểu mô, đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh sản và phát triển của tế bào và ung thư vú phụ thuộc HER2 chỉ xuất hiện khi có sự phiên mã hoặc biểu hiện quá mức của gen *HER2,* hay nói đúng hơn nồng độ HER2 cao hơn mức bình thường có liên quan chặt chẽ với ung thư vú. Theo công bố của các tác giả thì nồng độ ngưỡng của kháng nguyên HER2 trong huyết thanh là 15 ng/ml (Fornier, 2005; Ali, 2002; Ellis, 2000; Birner, 2001; Hsi, 2004; Bertucci, 2004). Vì vậy, việc định lượng chính xác hàm lượng kháng nguyên HER2 trong huyết thanh là rất quan trọng, nó giúp cho việc chẩn đoán bệnh được chính xác và sớm ngay cả khi khối u chưa xuất hiện.

Trong trường hợp ung thư phổi thì hàm lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 không chỉ là chỉ số quan trọng để chẩn đoán ung thư mà còn là chỉ số để đánh giá mức độ tiến triển, trạng thái của khối u. Giá trị trung bình của Cyfra 21-1 ở người khỏe nằm trong khoảng từ 2,3 ng/ml (Pariente, 1997) đến 2,7 ng/ml (Marta Sanchez-Carbayo, 1999) và các nhà nghiên cứu lâm sàng đã xác định ngưỡng đối với kháng nguyên Cyfra 21-1 là 3,6 ng/ml (Gianfranco, 2001). Hơn nữa, hàm lượng Cyfra 21-1 thay đổi đáng kể sau khi di căn. Theo công bố của Shi-Jian Ding và cộng sự (2004), hàm lượng Cyfra 21-1 sau hai tuần di căn là 4,79 ± 1,76 ng/ml thì đến tuần thứ 12 hàm lượng Cyfra 21-1 trong huyết thanh là 95,94 ± 19,68 với $p<0,01$. Như vậy, chỉ thị Cyfra 21-1 không chỉ là chỉ thị chẩn đoán khối u mà còn được xem là chỉ thị theo dõi điều trị. Kết quả định lượng bằng kỹ thuật real-time PCR kết hợp với kỹ thuật phage display, chúng tôi đã xác định được hàm lượng kháng nguyên trong các mẫu huyết thanh từ 22,9 ng/ml (mẫu HT4) và 95,9 ng/ml (mẫu HT3). Như vậy, có thể khẳng định các mẫu huyết thanh HT1, HT2, HT3 và HT4 đều có hàm lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 cao đặc trưng cho giai đoạn ung thư phổi đã di căn.

Trong trường hợp ung thư máu biểu hiện CD33, sử dụng phương pháp định lượng kháng nguyên mà đề tài đã tạo ra không chỉ chính xác hàm lượng CD33 trong các mẫu huyết thanh mà còn xác định được sự tương ứng giữa tế bào blast và nồng độ CD33. Một trong những kết quả nhận được đã chứng minh rằng nồng độ CD33 trong huyết thanh tồn tại cả khi tế bào blast trong máu ngoại vi đã không còn sau điều trị.

Một trong những điểm mới, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn là quy trình định lượng các kháng nguyên ung thư (KIT định lượng dựa trên kỹ thuật phage display và real-time PCR). Kỹ thuật real-time PCR là một trong các kỹ thuật hiện đại nhất của sinh học phân tử vì kỹ thuật này có độ nhạy và đặc hiệu rất cao. Kỹ thuật này hiện là một trong các kỹ thuật sau cùng để khẳng định sự nhiễm các virus HIV, virus viêm gan, virus viêm màng não,... cũng như nghiên cứu sự biểu hiện của gen trên cơ sở sử dụng khuôn là axit nucleic. Sử dụng kỹ thuật real-time PCR ta có thể định lượng chính xác số bản sao của gen đích trong mẫu phân tích. Tuy nhiên, trong các trường hợp này chỉ có thể định lượng số bản sao gen chứ không phải sản phẩm của gen nên sẽ có những yếu tố tác động đến kết quản phân tích, chẩn đoán.

Vì vậy, việc sử dụng kỹ thuật real-time PCR để định lượng kháng nguyên (bản chất là protein) trong các mẫu phân tích trên cơ sở sử dụng phức hệ protein-DNA (phage biểu lộ kháng thể trên bề mặt, còn hệ gen của phage chứa gen mã hóa kháng thể) là một điểm mới, sáng tạo của đề tài.

Các kết quả thử nghiệm Kit định lượng các kháng nguyên HER2, Cyfra 21-1, CD33 trong các mẫu huyết thanh của bệnh nhân đã khẳng định khả năng ứng dụng của phương pháp trong thực tiễn lâm sàng. Phương pháp định lượng kháng nguyên (KIT định lượng kháng nguyên) với sự kết hợp kỹ thuật phage display và kỹ thuật real-time PCR đã được chúng tôi đăng ký bản quyền tại Cục sở hữu trí tuệ ngày 28 tháng 4 năm 2008 và được chấp nhận ngày 31 tháng 3 năm 2009.

3.4.4. Tạo chế phẩm điều trị trên cơ sở các kháng thể đặc hiệu

Mục tiêu của đề tài là xây dựng được quy trình thu nhận kháng thể để tạo chế phẩm điều trị đặc hiệu các kháng nguyên đích HER2, Cyfra 21-1, CD33. Khác với các kháng thể sử dụng để tạo Kit chẩn đoán vì trong trường hợp này các kháng thể phải có những đặc tính phù hợp hơn, ví dụ độ ổn định, tác dụng hướng đích (tức là khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên đích).

Để có được các kháng thể đáp ứng được các yêu cầu đối với nguyên liệu làm thuốc điều trị chúng tôi đã tiến hành tạo các gen tái tổ hợp với các "block" khác nhau và được thiết kế để biểu hiện trong các hệ biểu hiện khác nhau. Kết quả xác định khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu của các kháng thể đều được khẳng định bằng phản ứng ELISA. Độc tính cấp của các sản phẩm đã được kiểm định. Kết quả kiểm định cho thấy các sản phẩm kháng thể là không độc. Hoạt tính làm tan dòng tế bào nuôi cấy đã được thử nghiệm đối với các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích được cấu tạo bởi 2 "block": **scFv-melittin**.

Để sử dụng các kháng thể tạo được làm nguyên liệu sản xuất thuốc điều trị cần có những nghiên cứu tiếp theo nhằm thu nhận có hiệu quả lượng kháng thể đủ cho các nghiên cứu lâm sàng ở giai đoạn tiếp theo.

Phần IV. KẾT QUẢ ĐÀO TẠO

Một trong các nội dung đăng ký của đề tài là đào tạo cán bộ có chuyên môn sâu về công nghệ gen và về miễn dịch. Theo đăng ký đề tài cần đào tạo được 1 tiến sỹ, 2 cao học, 2 cử nhân. Kết quả đề tài đã tham gia đào tạo theo nội dung nghiên cứu 3 nghiên cứu sinh, 5 cao học và 6 cử nhân sinh học.

TT	Tên sinh viên	Tên luận án	Cơ sở đào tạo, khóa	Năm bảo vệ
Nghiên cứu sinh				
1	Lã Thị Huyền	Nghiên cứu tạo kháng thể tái tổ hợp kháng CD25 để ứng dụng trong Y học	NCS Viện CNSH. Khóa 2007-2009	Đã bảo vệ CS 3/2009
2	Đào Huyền Quyên	Định lượng kháng nguyên CD33 trong máu các bệnh nhân lơxêmi cấp dòng tủy bằng kháng thể tái tổ hợp với phương pháp real-time pCR.	NCS, Đại Học Y Hà Nội. Khóa 2008-1011.	Đang thực hiện
3	Lê Đình Chắc	Nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ung thư phổi Cyfra21-1	NCS. Đại học Thái Nguyên. Khóa 2009-1012	Đang thực hiện
Cao học				
TT	**Tên sinh viên**	**Tên luận văn**	**Cơ sở đào tạo, khóa**	**Năm bảo vệ**
1	Nguyễn Duy Loát	Nghiên cứu biểu hiện gen mã hoá kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng	Đại học KHTN-Khoá 2006-2008	24/12/2008

		nguyên Her2 trong *Bacillus megaterium*		
2	Đặng Thị Thu	Nghiên cứu biểu hiện gen mã hoá kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD33.	Đại học KHTN, Khoá K15 (2006-2008),	25/12/2008
3	Bùi Trọng Lịch	Nghiên cứu biểu hiện gen kháng nguyên ung thư máu CD33 trên vi khuẩn *Bacillus megaterium*	Đại học KHTN, khóa K15 (2006-2008),	12/12/2008
4	Nguyễn T. Khánh Linh	Nghiên cứu định lượng kháng nguyên ung thư phổi Cyfra21-1 bằng kỹ thuật Real-time PCR	Đại học KHTN, K16 (2007-2009),	12/2009
5	Nguyễn Phương Hiền	Nghiên cứu biểu hiện gen mã hoá kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ung thư phổi, Cyfra 21-1.	Đại học KHTN, K16 (2007-2009),	12/2009
Sinh viên				
TT	**Tên sinh viên**	**Tên luận văn**	**Cơ sở đào tạo, khóa**	**Năm bảo vệ**
1	Nguyễn Thị Bảo Ly	Nghiên cứu tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa kháng nguyên CD33 từ máu bệnh nhân ung thư tiền tủy cấp.	K30 04SH ĐHBK Đà Nẵng. 0906565975.	8/6/2009

2	Cao Hải Yến	Nghiên cứu khả năng biểu hiện kháng thể tái tổ hợp đặc hiêu HER2 trong *E.coli*	Khoa CNSH, Đại học mở Hà Nội, K12	9/6/2009
3	Phạm Thị Chung	Tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa kháng thể phage đặc hiệu HER2 (ĐTThu giúp)	Khoa CNSH, Đại học mở Hà Nội, K12	9/6/2009
4	Phạm Như Trọng	Tách dòng và xác định trình tự gen mã hoá kháng nguyên Her2 đặc hiệu tế bào ung thư vú.	Lớp K48b CNSH, Đại học KHTN,	6/2007
5	Nguyễn Phương Hiền	Nghiên cứu thu nhận kháng nguyên Cyfra21-1 bằng kỹ thuật gen.	Lớp CNKH tài năng , K7, Đại học KHTN	6/2007

Phần IV. KẾT QUẢ CÔNG BỐ KHOA HỌC

Theo đăng ký của đề tài: Các kết quả nghiên cứu khoa học của đề tài phải đăng 03 bài báo trên các tạp chí khoa học chuyên ngành. Kết quả đề tài đã đăng được 7 bài trên các tạp chí chuyên ngành, đăng ký 2 trình tự gen trong Ngân hàng gen Quốc tế, 9 bài trên các Hội nghị khoa học toàn quốc, 01 bản quyền sở hữu trí tuệ; một quyển sách chuyên khảo "Kháng thể tái tổ hợp và ứng dụng".

Các bài báo đã đăng trên các tạp chí khoa học và Hội nghị khoa học toàn quốc

1. Lê Quang Huấn, Nguyễn Thị Thu Thủy, 2009. Xây dựng phương pháp định lượng kháng nguyên Cyfra 21-1 bằng kỹ thuật real-time PCR. Tạp chí Y học Việt Nam. Tập 360, số 2. Trang 22-29.
2. Đào Huyền Quyên, Nguyễn Thị Thu Thủy, Lê Quang Huấn, 2009. Nghiên cứu kỹ thuật định lượng kháng nguyên CD33 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư máu dạng tủy bào cấp. Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh, phụ bản Tập 13, số 2. Tr.30-37.
3. Lê Đình Chắc, Lã Thị Huyền và Lê Quang Huấn, 2008. Tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa kháng nguyên ung thư phổi, CYFRA 21.1. Tạp chí sinh học, số 30(3):165-168.
4. Lê Quang Huấn, Nguyễn Thị Thu Thủy, Lã Thị Huyền,Trần Thị Thanh Huyền, Đào Huyền Quyên (2008). Định lượng kháng nguyên ung thư bằng phương pháp PDRTI-PCR. Tạp chí công nghệ sinh học, tập 6 (4A), tr. 605-612.
5. Lã Thị Huyền, Lê Quang Huấn, (2008). Chọn dòng kháng thể phage đặc hiệu CD25 và bước đầu ứng dụng để xác định CD25 trong huyết thanh bệnh nhân. Tạp chí công nghệ sinh hoc, tập 6 (4A), tr. 613-618.

6. Nguyễn Hoàng Dương, Phạm Việt Cường, Lê Quang Huấn, (2008). Biểu hiện và tinh sạch yếu tố thụ thể của yếu tố sinh trưởng biểu mô. Tạp chí công nghệ sinh học, tập 6 (4A), tr. 599-604.
7. Đặng Thị Thu, Đào Huyền Quyên, Lã Thị Huyền, Nguyễn Thị Thanh Dịu, Lê Quang Huấn (2008), Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD33. Tạp chí Y học Việt Nam, tập 347 (2). Tr. 47-52.
8. Lê Thị Minh Phúc, Nguyễn Xuân Hưng, Lã Thị Huyền, Nguyễn Thị Phương Hiền và Lê Quang Huấn. Thu nhận kháng nguyên ung thư phổi, Cyfra 21-1, bằng kỹ thuật gen. Tạp chí khoa học và công nghệ (đang in).
9. Le Quang Huan, La Thi Huyen, Nguyen Xuan Hung, 2006. Making immunotoxins with two properties for the diagnosis and treatment of breast cancer, Gene Bank, Accession Number AM402973.
10. Le Quang Huan, La Thi Huyen, Nguyen Xuan Hung, 2006. Making immunotoxins with two properties for the diagnosis and treatment of breast cancer, Gene Bank, Accession Number AM402974.
11. Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Thị Thanh Huyền và Lê Quang Huấn, 2008. Nghiên cứu định lượng kháng nguyên ung thư vú bằng kỹ thuật Real-time PCR. Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 4 về hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ, nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm. Hà Nội, ngày 15-17 tháng 10, năm 2008. trang 562-566.
12. Lã Thị Huyền, Nguyễn Phương Hoa và Lê Quang Huấn, (2008), Nghiên cứu thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD25 bằng kỹ thuật phage display. Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 4 về hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ, nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm. Hà Nội, ngày 15-17 tháng 10, năm 2008. trang 473-475.

13. Nguyễn Duy Loát, Trần Thị Thanh Huyền, Lã Thị Huyền và Lê Quang Huấn, (2008). Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 trong *Bacillus megaterium*. Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 4 về hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ, nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm. Hà Nội, ngày 15-17 tháng 10, năm 2008. Trang 723-725.
14. Đặng Thị Thu, Lã Thị Huyền, Lê Quang Huấn (2008). Tạo thư viện kháng thể phage đặc hiệu kháng nguyên HER2 trong ung thư vú. Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 4 về hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ, nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm. Hà Nội, ngày 15-17 tháng 10, năm 2008. Trang 550-553.
15. Nguyễn Thị Thanh Dịu, Lã Thị Huyền, Phạm Như Trọng, Lê Quang Huấn, 2007. Tách dòng và xác định trình tự gen Her2/neu đặc hiệu ung thư vú. Hội nghị Khoa học và sự sống, Đại Học Quy Nhơn, 10/8/2007, Tr. 668-671.
16. Lã Thị Huyền, Lê Thị Minh Phúc, Nguyễn Xuân Hưng, Lê Quang Huấn, 2007. Ung thư máu và một số chỉ thị phân tử. Hội nghị Khoa học và sự sống, Đại Học Quy Nhơn, 10/8/2007. Tr. 751-754
17. Lê Quang Huấn, Lã Thị Huyền, Nguyễn Xuân Hưng, 2007. Thu nhận kháng thể đơn dòng tái tổ hợp bằng phương pháp tạo thư viện thực khuẩn thể. Hội nghị Khoa học và sự sống, Đại Học Quy Nhơn, 10/8/2007. Tr.740-743
18. Nguyễn Thị Thuỷ, Vũ Thị Bích Hường, Lê Quang Huấn, 2007. Nghiên cứu tạo kháng thể kháng tế bào ung thư vú bằng kỹ thuật phage display. Hội nghị Khoa học và sự sống, Đại Học Quy Nhơn, 10/8/2007. Tr. 846-849.

Đăng ký bản quyền

- Tên giải pháp hữu ích: **Kháng thể đơn chuỗi đặc hiệu kháng nguyên Her2 trong ung thư vú và phương pháp xác định kháng nguyên Her2.**
- Ngày nộp đơn đề nghị: ngày 28 tháng 4 năm 2008.
- Các tác giả: Lê Quang Huấn, Lã Thị Huyền, Trần Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Dịu, Nguyễn Thị Thu Thủy.
- Ngày được chấp nhận đơn: 31/3/2009

Sách xuất bản

- Tên sách: **Kháng thể tái tổ hợp và ứng dụng**
- Các tác giả: Lê Quang Huấn, Lã Thị Huyền
- Nhà xuất bản: Nhà Xuất bản khoa học và Công nghệ
- Năm xuất bản: 9-2009

Các kết quả đề tài đã đạt được so với đăng ký trong hợp đồng KH&CN với Ban chủ nhiệm KC-10/06-10

TT	Nội dung	Đăng Ký	Đã đạt được	Kết quả
1	Xây dựng được quy trình thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích	01	01	Đạt
2	Xây dựng được quy trình tạo Kit chẩn đoán	01 Định tính	01 Định tính, Định lượng	Vượt đăng ký
3	Xây dựng được quy trình tạo chế phẩm định hướng điều trị	01	01	Đạt
4	Thu nhận được 3 bộ KIT (100 phản ứng)/1 bô KIT/một kháng nguyên	03	03	Đạt
5	1g chế phẩm/1 kháng thể	1g chế phẩm/1 kháng thể	1g chế phẩm/1 kháng thể	Đạt
6	Bài báo khoa học	03	07	Vượt đăng ký
7	Tham gia báo cáo và đăng bài tại các tuyển tập Hội nghị khoa học toàn quốc	0	11	Vượt đăng ký
8	Sách chuyên khảo	0	01	Vượt đăng ký
9	Đăng ký bản quyền phát minh sáng chế	0	01	Vượt đăng ký
10	Đào tạo	1 TS 2 Th.S 2CN	3 TS 5 ThS 5 CN	Vượt đăng ký

Phần V. KẾT LUẬN

Kết quả dạng I

1. Đã tạo được ba bộ Kit định lượng kháng nguyên HER2, Cyfra 21-1 và CD33 với tính đặc hiệu và độ nhạy cao.
2. Đã thu nhận được 1 gram kháng thể/1 loại kháng thể và đã xác định cấu trúc bậc nhất của các kháng thể bằng khối phổ; xác định hoạt tính của của các kháng thể bằng phản ứng ELISA, phản ứng làm tan tế bào nuôi cấy của các kháng thể đơn chuỗi dạng scFv-melittin.

Kết quả dạng II

1. Đã xây dựng được 3 tiêu cuẩn cơ sở sử dụng Kit định lượng kháng nguyên: HER2 trong ung thư vú, Cyfra 21-1 trong ung thư phổi và CD33 trong ung thư máu.
2. Đã xây dựng được quy trình thu nhận kháng nguyên tái tổ hợp bằng công nghệ gen.
3. Đã xây dựng được quy trình thu nhận kháng thể tái tổ hợp dạng đơn chuỗi scFv trên cơ sở tạo thư viện scFv của các kháng thể có nguồn gốc từ gà; tạo được gen mã hóa các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đích dạng ghép (scFv-CH2-CH3-hCBD) và dạng Immunotoxin (scFv-melittin).
4. Đã xây dựng được quy trình định lượng kháng nguyên đặc hiệu ung thư trên cơ sở sử dụng các scFv của kháng thể biểu lộ trên phage đặc hiệu kháng nguyên đích và các kỹ thuật phage display, real-time PCR.

Kết quả dạng III và IV

1. Đề tài đã công bố các kết quả nghiên cứu trong 19 bài báo khoa học tại các tạp chí khoa học chuyên ngành và Hội nghị khoa học toàn Quốc (Hội nghị về Công nghệ sinh học, Hội nghị Hóa sinh Y dược Miền Bắc,

Hội nghị Hóa sinh Y dược Toàn Quốc, Hội nghị khoa học cơ bản về sự sống, Hội nghị toàn quốc về Y học hạt nhân).

2. Đề tài cũng đã đăng ký 1 giải pháp hữu ích "Kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên HER2 và phương pháp xác định kháng nguyên HER2" với số đơn đăng ký 2-2008-00077.
3. Đề tài đã xuất bản 1 quyển sách "Kháng thể tái tổ hợp và ứng dụng" do Nhà xuất bản Khoa học và công nghệ ấn hành năm 2009.

Tài liệu tham khảo

1. Ali SM, Leitzel K, Chinchilli VM, et al. Relationship of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. Clin Chem 2002;48:1314–20.
2. Almedin Jermal, DNM, PhD, Rebecca, MPH, Elizabeth Ward, PhD, Taylor Murray, Jiaquan Xu, Michael J. Thum, MD, MS (2007), *Cancer statistic. American Cancer Society.*
3. Andris-Widhopf J, Rader C, Steinberger P, Fuller R, Barbas III CF (2000) Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. J. Immunol. Methods 242: 159–181.
4. Beckman R A, Weiner L M and Davis H M, 2007. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors; *Cancer* **109** 170–179
5. Bertucci F, Borie N, Ginestier C, et al. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. Oncogene 2004;23:2564–75.
6. Birner P, Oberhuber G, Stani J, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. Clin Cancer Res 2001;7:1669–75.
7. Coussen L, Yang-Feng TV, Liao YC, Chen E, GrayA, Mc Grath J et.al, (1985), *Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with new oncogene*, Science, 230:1132-9.
8. Đái Duy Ban, 2006
9. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. J Clin Pathol 2000;53:890–2.
10. Feldman A M, Koch WJ and Force TL (2007), *Developing strategies to link Basic Cardio vascular Science with clinical drug development:*

Another opportunity for translational science, Clinical pharmacology and therapeutic 81, 887-892.

11. Fornier M. N., Seidman A. D., Schwartz M. K., Ghani F., Thiel R., Norton L. and Hudis C.. 2005. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. Annals of Oncology 16: 234–239.
12. Gianfranco Buccheri and Domenico Ferrigno, 2001. Cytokeratin-derived markers of lung cancer *Expert Rev. Mol. Diagn*. 1(3), (2001)
13. Hanana and Weiberg (2000), *Heterotypic signaling between Epithelial Tumors cells and fibroblast in carcinoma formation, Experimental Cell Research*, Volume 264, issue 1, 10/March, 169-184.
14. Harold J Burstein, MD, PhD and Fric. Winer, MD (2005), *primary care for survivors of breast cancer*, The New England Journal of Medicine, volume 343: 1086-1094.
15. Hsi ED, Tubbs RR. Guidelines for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2004;57:241–2.
16. Jens G.B., Hubertus St. N., Bernhard G., Achim H., and Norbert J. S., (2000). CYFRA 21-1 Serum Analysis in Patients with Esophageal Cancer. Clinical Cancer Research **4249.** *Vol. 6, 4249–4252*
17. Kohler and Milstein (1975), *Continuous cultures of fused cell secretary antibody of predefined specificity*, Nature 256, 495-497.
18. Krau SM, Popescu N, Amsbaugh S, King C (1987), *Over expression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human tumor cell lines by different molecular mechanisms*, EMBO J, 6: 605.
19. Lê Quang Huấn, Nguyễn Thị Thu Thủy, Lã Thị Huyền,Trần Thị Thanh Huyền, Đào Huyền Quyên (2008). Định lượng kháng nguyên ung thư

bằng phương pháp PDRTI-PCR. Tạp chí công nghệ sinh học, tập 6 (4A), tr. 605-612.

20. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Hank, Lee JH, Ciarallos, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM (2002), *PKB/Akt phosphorylated p27 impair nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest, Nat Med*, oct 8 (10), 1153-60.
21. Marta Sanchez-Carbayo, Antonia Espasa, Virtudes Chinchilla, Enrique Herrero, Julia´n Megı´as, Antonio Mira and Federico Soria, (1999). New Electrochemiluminescent Immunoassay for the Determination of CYFRA 21-1: Analytical Evaluation and Clinical Diagnostic Performance in Urine Samples of Patients with Bladder Cancer. *Clinical Chemistry* 45:10 1944–1953.
22. Pariente JL, Bordenave L, Michel P, Latapie MJ, Ducassou D, Le Guillou M. (1997). Initial evaluation of CYFRA 21-1 diagnostic performances as a urinary marker in bladder transitional cell carcinoma. *J Urol 1997*;158:338–41.
23. Raat Jos MH, Wijnen Eveline M, Prujin Ger JM, Vanden Hoogen Frank HJ, Van Venrooij Walter J (2003), *Recombinant human monoclonal utoantibodies specific for citrulline-containing peptides from phage display libraries derived from patients with rheumatoid arthritis*, The Journal of rheumatology, 30 (8): 1696-711.
24. Rygus and Hyllen (1991), *Glucose and Glucose-6 phosphate interaction with xylose repressor proteins from Bacillus spp may contribute to regulation of xylose utilization*, J Bacteriol. 1995, October 177 (19): 5467-5472.
25. Sano T, Smith CL, Cantor CR (1992) Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. Science 258:120–122.

26. Sapats S. I., Heine H. G., Trinidad L., Gould G. J., Foord A. J., Doolan S. G., Prowse S. and Ignjatovic J. (2002). Generation of chicken single chain antibody variablefragment s (scFv) that differentiate and neutralize infectious bursal disease virus (IBDV). Arch Virol (2003) 148: 497–515.
27. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T (1985): *a v-erbB related proto-oncogene, c-erbB-2 is distinct from the c-erbB-1, epidermial growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma*, Proc Natl Acad Sci USA 82: 6497.
28. Shi-Jian Ding, Yan Li, Ye-Xiong Tan, et.al., (2006), Overexpression Cytokeratin 19 and Hepatocellular Carcinoma Metastasis. *Molecular & Cellular Proteomics 3:73–81, 2004*
29. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL, (2002), *PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of* $p27^{KIP1}$ *at threonine 157 and modulation of its cellular localization*, Nat Med oct 8 (10): 1145-52
30. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ulrich A, MC Gure WL (1987), *Human Breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2-neu oncogene*, Science, 235: 177-182.
31. Timothy J. Hobday , MD, Edith A. Perez MD, *Moleculary Targeted therapies for Breast cancer*, 05/05/2005, Journal of Moffitt Cancer Center.
32. Tracy Vargo-Gogola, Jeffrey M Rosen (10/2007), *Modelling Breast cancer: one side is not fit all, Natural Reviews*. Cancer 7 (9): 659-72.
33. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio, Califano D, vinci F, Chippet G, Tsichlis P, Bellecosa A, Fusco Santoro M, (2002) *Cytoplasmic recolization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor* $p27^{KIP1}$ *by pKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer*, Nad Med, oct 8 (10).

34. Yong-Chao Guo, Ya-Feng Zho, Xian-En Zhang, Zhi-Ping Zhang, Yan-Mei Qiao, Li-Jun Bi, Ji-Kai Wen, Mi-Fang Liang and Ji-Bin Zhang (2006). Phage display mediated immuno-PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, No. 8.

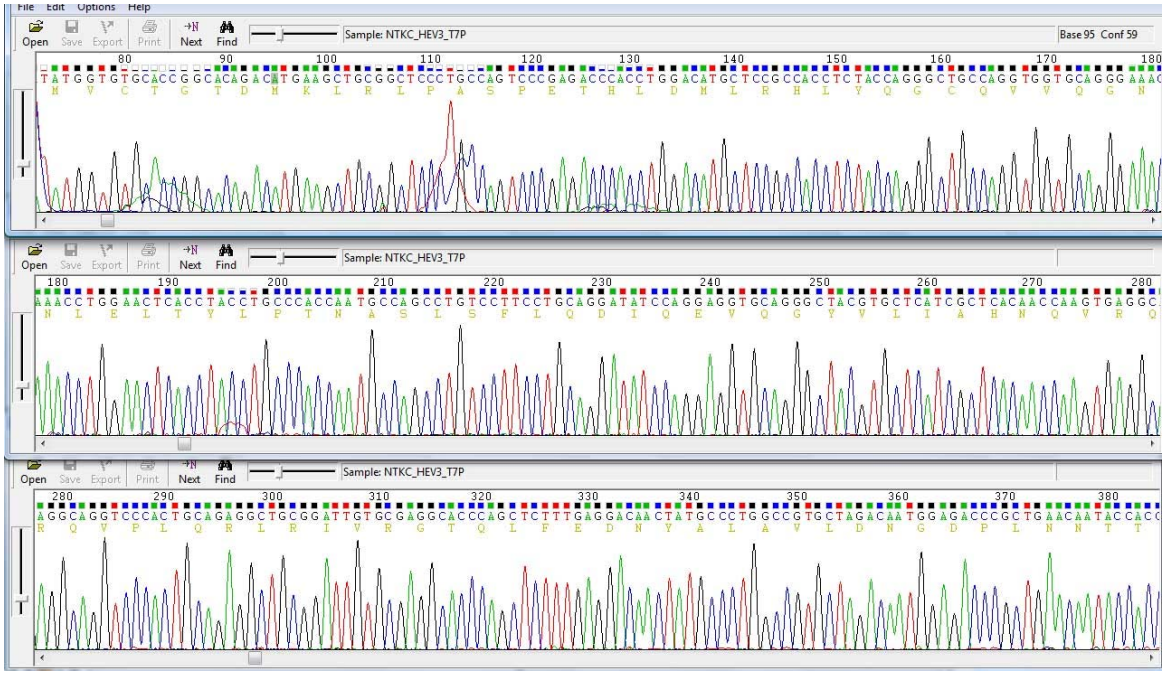
35. Zhihong S., Raymond L. Mernaugh, Heping Y., Lei Y., Ying Z., and Xiangqun Z., (2005). Engineered Recombinant Single-Chain Fragment Variable Antibody for Immunosensors. *al Chem*. 2005 November 1; 77(21): 6834–6842.

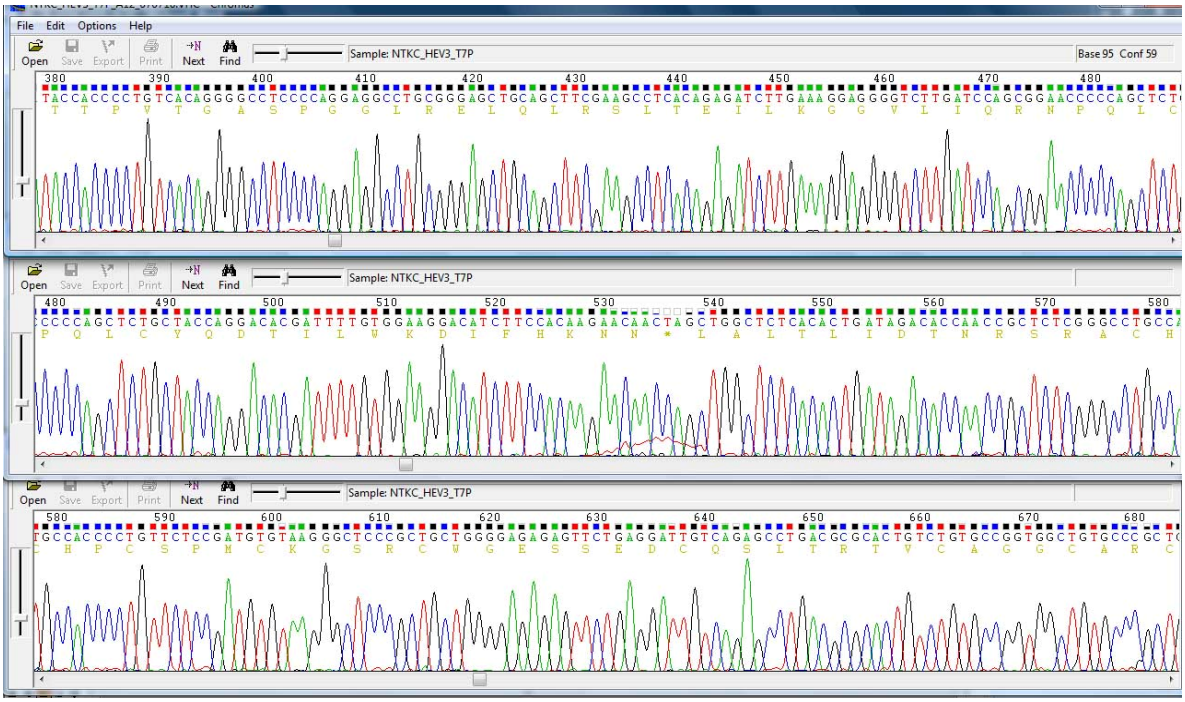
36. Zhou, H., Fisher, R.J., Papas, T.S., 1993. Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection. Nucleic Acids Res.21, 6038.

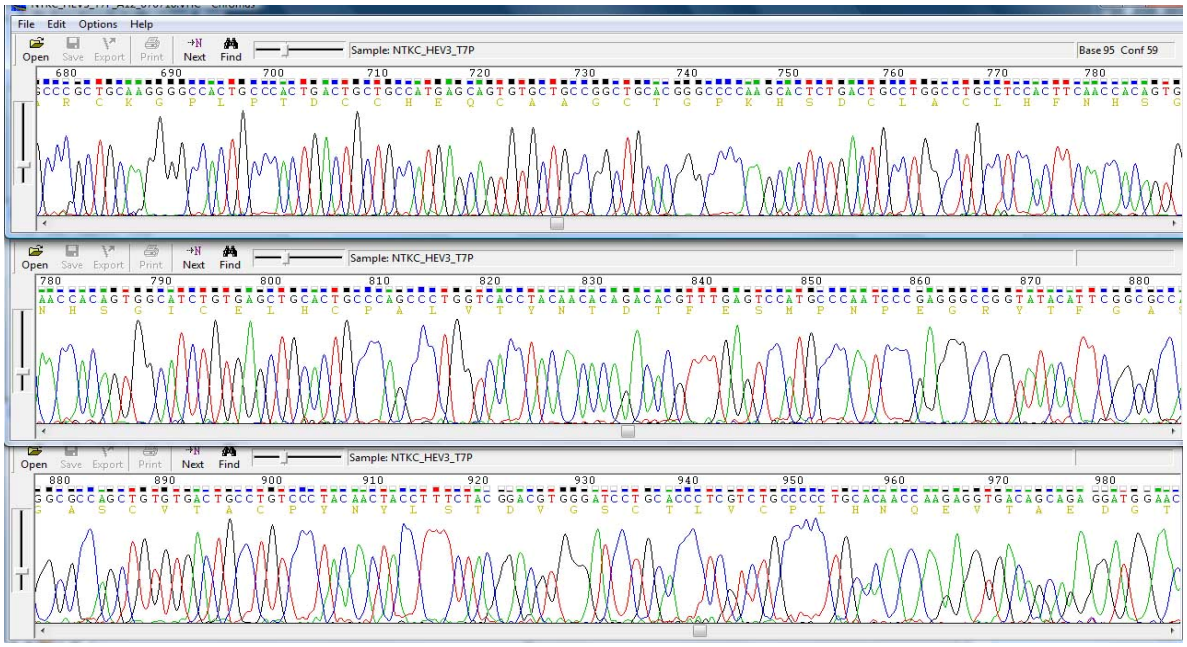
Phần Phụ Lục

Phục lục 1

1.1. Kết quả xác định trình tự nucleotide gen mã hóa vùng ngoại bào của HER2








```
        10        20        30        40        50        60
GTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGAC
 V  C  T  G  T  D  M  K  L  R  L  P  A  S  P  E  T  H  L  D

        70        80        90       100       110       120
ATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACTCACCTAC
 M  L  R  H  L  Y  Q  G  C  Q  V  V  Q  G  N  L  E  L  T  Y

       130       140       150       160       170       180
CTGCCCACCAATGCCAGCCTGTCCTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTG
 L  P  T  N  A  S  L  S  F  L  Q  D  I  Q  E  V  Q  G  Y  V

       190       200       210       220       230       240
CTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGC
 L  I  A  H  N  Q  V  R  Q  V  P  L  Q  R  L  R  I  V  R  G

       250       260       270       280       290       300
ACCCAGCTCTTTGAGGACAACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAAC
 T  Q  L  F  E  D  N  Y  A  L  A  V  L  D  N  G  D  P  L  N

       310       320       330       340       350       360
AATACCACCCCTGTCACAGGGGCCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGC
 N  T  T  P  V  T  G  A  S  P  G  G  L  R  E  L  Q  L  R  S

       370       380       390       400       410       420
CTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTACCAG
 L  T  E  I  L  K  G  G  V  L  I  Q  R  N  P  Q  L  C  Y  Q

       430       440       450       460       470       480
GACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACACTGATA
 D  T  I  L  W  K  D  I  F  H  K  N  N  Q  L  A  L  T  L  I

       490       500       510       520       530       540
GACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGC
 D  T  N  R  S  R  A  C  H  P  C  S  P  M  C  K  G  S  R  C
```

```
       550       560       570       580       590       600
TGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGT
 W  G  E  S  S  E  D  C  Q  S  L  T  R  T  V  C  A  G  G  C

       610       620       630       640       650       660
GCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGC
 A  R  C  K  G  P  L  P  T  D  C  C  H  E  Q  C  A  A  G  C

       670       680       690       700       710       720
ACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGT
 T  G  P  K  H  S  D  C  L  A  C  L  H  F  N  H  S  G  I  C

       730       740       750       760       770       780
GAGCTGCACTGCCCAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCCCAAT
 E  L  H  C  P  A  L  V  T  Y  N  T  D  T  F  E  S  M  P  N

       790       800       810       820       830       840
CCCGAGGGCCGGTATACATTCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACTACCTT
 P  E  G  R  Y  T  F  G  A  S  C  V  T  A  C  P  Y  N  Y  L

       850       860       870       880       890       900
TCTACGGACGTGGGATCCTGCACCCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCA
 S  T  D  V  G  S  C  T  L  V  C  P  L  H  N  Q  E  V  T  A

       910       920       930       940       950       960
GAGGATGGAACACAGCGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCTATGGT
 E  D  G  T  Q  R  C  E  K  C  S  K  P  C  A  R  V  C  Y  G

       970       980       990      1000      1010      1020
CTGGGCATGGAGCACTTGCGAGAGGTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTT
 L  G  M  E  H  L  R  E  V  R  A  V  T  S  A  N  I  Q  E  F

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
GCTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTTCTGCCGGAGAGCTTTGATGGGGAC
 A  G  C  K  K  I  F  G  S  L  A  F  L  P  E  S  F  D  G  D

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
CCAGCCTCCAACACTGCCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTTTGAGACTCTGGAA
 P  A  S  N  T  A  P  L  Q  P  E  Q  L  Q  V  F  E  T  L  E

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTC
 E  I  T  G  Y  L  Y  I  S  A  W  P  D  S  L  P  D  L  S  V

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
TTCCAGAACCTGCAAGTAATCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACC
 F  Q  N  L  Q  V  I  R  G  R  I  L  H  N  G  A  Y  S  L  T

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
CTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAACTGGGCAGTGGA
 L  Q  G  L  G  I  S  W  L  G  L  R  S  L  R  E  L  G  S  G

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
CTGGCCCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCCTGGGACCAG
 L  A  L  I  H  H  N  T  H  L  C  F  V  H  T  V  P  W  D  Q

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CTCTTTCGGAACCCGCACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAGTGT
 L  F  R  N  P  H  Q  A  L  L  H  T  A  N  R  P  E  D  E  C
```

```
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
GTGGGCGAGGGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGGCACTGCTGGGGTCCAGGG
 V  G  E  G  L  A  C  H  Q  L  C  A  R  G  H  C  W  G  P  G

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
CCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGCCAGTTCCTTCGGGGCCAGGAGTGCGTGGAGGAATGC
 P  T  Q  C  V  N  C  S  Q  F  L  R  G  Q  E  C  V  E  E  C

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
CGAGTACTGCAGGGGCTCCCCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCGTGCCAC
 R  V  L  Q  G  L  P  R  E  Y  V  N  A  R  H  C  L  P  C  H

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCTGAGTGTCAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGT
 P  E  C  Q  P  Q  N  G  S  V  T  C  F  G  P  E  A  D  Q  C

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
GTGGCCTGTGCCCACTATAAGGACCCTCCCTTCTGCGTGGCCCGCTGCCCCAGCGGTGTG
 V  A  C  A  H  Y  K  D  P  P  F  C  V  A  R  C  P  S  G  V

      1750      1760      1770      1780      1790      1800
AAACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAG
 K  P  D  L  S  Y  M  P  I  W  K  F  P  D  E  E  G  A  C  Q

      1810      1820      1830      1840      1850      1860
CCTTGCCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCC
 P  C  P  I  N  C  T  H  S  C  V  D  L  D  D  K  G  C  P  A

      1870      1880      1890      1900      1910
GAGCAGAGAGCCAGCCCTCTGACGTCCATCATCTCTGCGGTGGTT
 E  Q  R  A  S  P  L  T  S  I  I  S  A  V  V
```

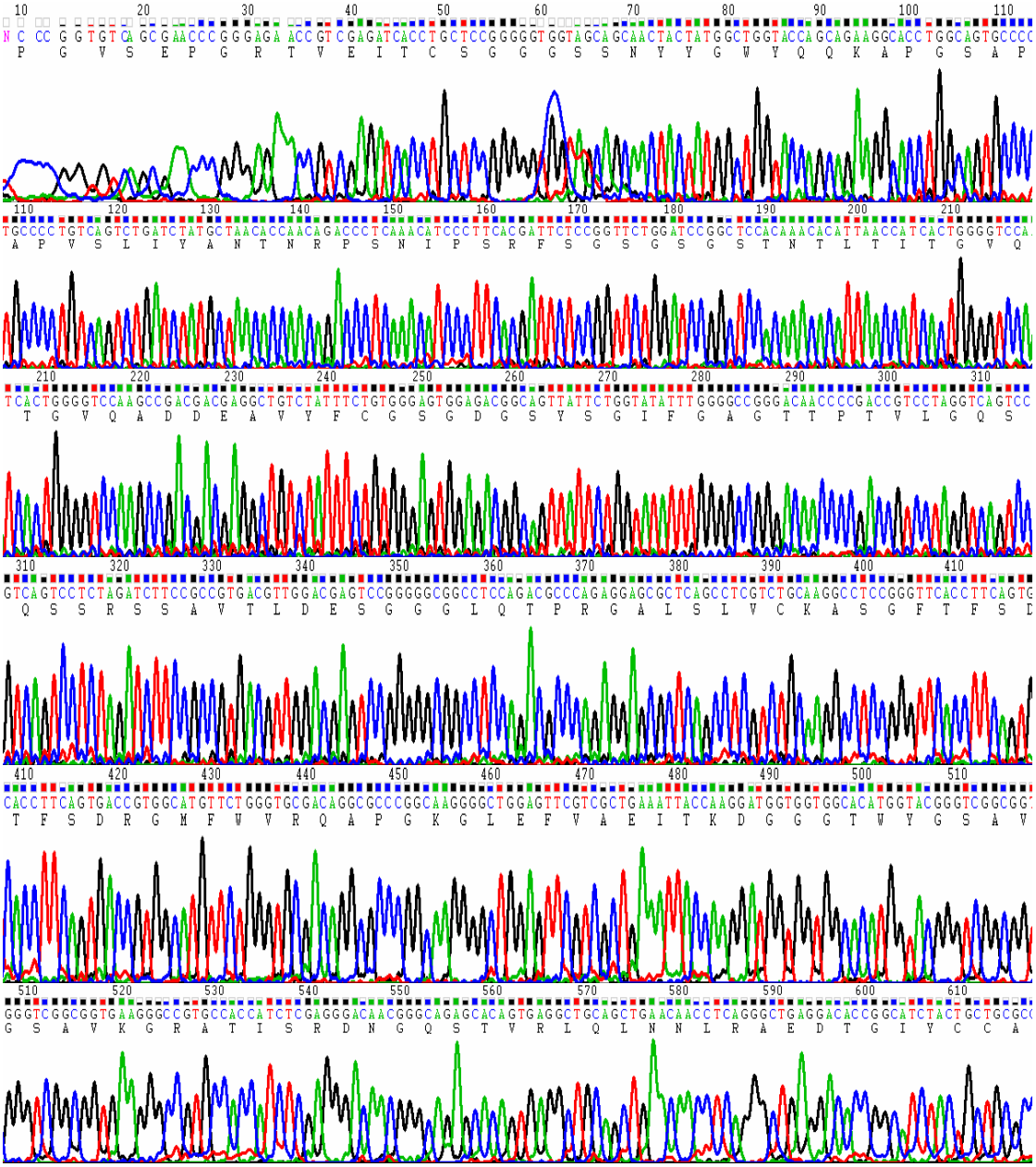
1.2. Kết quả so sánh trìh tự gen mã hóa vùng ngoại bào của HER2 đã tách dòng với trình tự đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế

So sánh trình tự nucleotide đoạn gen *HER2* đã tách dòng với các đoạn gen đã được đăng ký trong Ngân hàng gen quốc tế bằng phần mềm FASTA, chúng tôi nhận thấy đoạn gen *HER2* mà chúng tôi nhận được có độ tương đồng rất cao với các trình tự trên ngân hàng gen đã được đăng ký. Kết quả 19 trình tự có độ tương đồng 100%, chứng tỏ đoạn gen *HER2* là rất đặc trưng và có trình tự bảo thủ cao.

Alignment	DB:ID	Source	Length	Identity%	Similar%	Overlap	E (I)
1 ☐	EM_PAT:AX201817	Sequence 1 from Patent WO015	3768	100.0	100.0	1905	0
2 ☐	EM_PAT:DI080321	HER-2/neu Fusion Proteins.	3768	100.0	100.0	1905	0
3 ☐	EM_PAT:AX465456	Sequence 1 from Patent WO021	3768	100.0	100.0	1905	0
4 ☐	EM_PAT:BD267514	HER-2/neu fusion proteins.	3768	100.0	100.0	1905	0
5 ☐	EM_PAT:AX380923	Sequence 9 from Patent WO021	3768	100.0	100.0	1905	0
6 ☐	EM_PAT:CS667649	Sequence 20 from Patent WO20	3768	100.0	100.0	1905	0
7 ☐	EM_PAT:DI066618	COMPOSITIONS AND METHODS FOR	3768	100.0	100.0	1905	0
8 ☐	EM_PAT:AX384604	Sequence 1 from Patent WO021	3768	100.0	100.0	1905	0
9 ☐	EM_HUM:BC167147	Homo sapiens v-erb-b2 erythr	3771	100.0	100.0	1905	0
10 ☐	EM_HUM:X03363	Human c-erb-B-2 mRNA	4473	100.0	100.0	1905	0
11 ☐	EM_PAT:CS436135	Sequence 57 from Patent EP17	4473	100.0	100.0	1905	0
12 ☐	EM_PAT:DD395817	COMPOSITIONS AND METHODS FOR	4478	100.0	100.0	1905	0
13 ☐	EM_PAT:CQ723568	Sequence 9502 from Patent WO	4483	100.0	100.0	1905	0
14 ☐	EM_PAT:CS545465	Sequence 8 from Patent WO200	4624	100.0	100.0	1905	0
15 ☐	EM_PAT:CS538660	Sequence 37 from Patent EP17	4624	100.0	100.0	1905	0
16 ☐	EM_PAT:CS237525	Sequence 240 from Patent WO2	4624	100.0	100.0	1905	0
17 ☐	EM_PAT:CS647928	Sequence 9 from Patent WO200	4624	100.0	100.0	1905	0
18 ☐	EM_PAT:CS685639	Sequence 371 from Patent WO2	4624	100.0	100.0	1905	0
19 ☐	EM_HUM:DJ003234	Compositions and methods for	4624	100.0	100.0	1905	0
20 ☐	EM_PAT:DD272611	Her-2/neu DNA VACCINE HAVING	2052	99.9	99.9	1905	0
21 ☐	EM_PAT:DI030265	Her-2/neu DNA VACCINE HAVING	2052	99.9	99.9	1905	0
22 ☐	EM_HTG:AK313683	Homo sapiens cDNA, FLJ94272.	3730	99.9	99.9	1905	0
23 ☐	EM_PAT:DI042134	VASCULAR STENT OR GRAFT COAT	3768	99.9	99.9	1905	0
24 ☐	EM_PAT:DI043895	METHODS OF TREATMENT USING E	3768	99.9	99.9	1905	0

Phục lục 2

2.1. Kết quả xác định trình tự nucleotide gen mã hóa một trong các kháng thể scFv được tách từ gà đã gây miễn dịch bởi kháng nguyên HER2



Trình tự nucleotide và trình tự amino axít suy diễn cụ thể như sau:

```
        10        20        30        40        50        60
GGTGTCAGCGAACCCGGGAGAACCGTCGAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGTAGCAGCAAC
 G  V  S  E  P  G  R  T  V  E  I  T  C  S  G  G  G  S  S  N

        70        80        90       100       110       120
TACTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCTGGCAGTGCCCCTGTCAGTCTGATCTATGCT
 Y  Y  G  W  Y  Q  Q  K  A  P  G  S  A  P  V  S  L  I  Y  A

       130       140       150       160       170       180
AACACCAACAGACCCTCAAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCTGGATCCGGCTCCACA
 N  T  N  R  P  S  N  I  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  S  T

       190       200       210       220       230       240
AACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGT
 N  T  L  T  I  T  G  V  Q  A  D  D  E  A  V  Y  F  C  G  S

       250       260       270       280       290       300
GGAGACGGCAGTTATTCTGGTATATTTGGGGCCGGGACAACCCCGACCGTCCTAGGTCAG
 G  D  G  S  Y  S  G  I  F  G  A  G  T  T  P  T  V  L  G  Q

       310       320       330       340       350       360
TCCTCTAGATCTTCCGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCAGA
 S  S  R  S  S  A  V  T  L  D  E  S  G  G  G  L  Q  T  P  R

       370       380       390       400       410       420
GGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCACCTTCAGTGACCGTGGCATGTTC
 G  A  L  S  L  V  C  K  A  S  G  F  T  F  S  D  R  G  M  F

       430       440       450       460       470       480
TGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTTCGTCGCTGAAATTACCAAGGATGGT
 W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  F  V  A  E  I  T  K  D  G

       490       500       510       520       530       540
GGTGGCACATGGTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGG
 G  G  T  W  Y  G  S  A  V  K  G  R  A  T  I  S  R  D  N  G

       550       560       570       580       590       600
CAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATCTACTGC
 Q  S  T  V  R  L  Q  L  N  N  L  R  A  E  D  T  G  I  Y  C

       610       620       630       640       650       660
TGCGCCAAACCTGCTGGTTATTGTTGGTATGGTGATTGTGGTGGTTGGATCGACGCATGG
 C  A  K  P  A  G  Y  C  W  Y  G  D  C  G  G  W  I  D  A  W

       670       680       690       700       710       720
GGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCACTAGTGGCCAGGCCAGACCAGATCCTCAT
 G  H  G  T  E  V  I  V  S  S  T  S  G  Q  A  R  P  D  P  H
```

2.2. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn với các trình tự amino acid đã công bố trong Ngân hàng dữ liệu Uni-ProtKB/Swiss-Prot

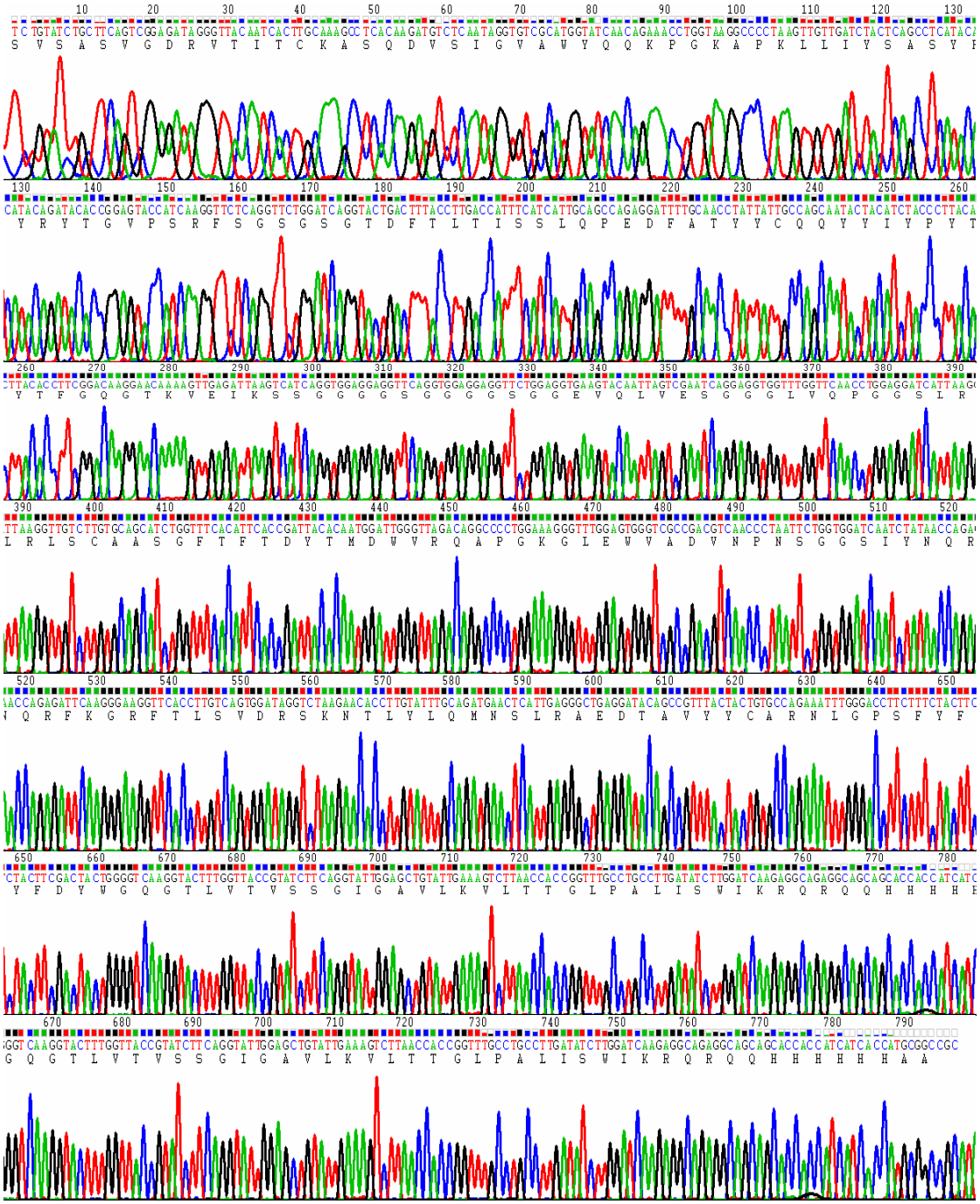
Alignment	DB:ID	Source	Length	Identity%	Similar%	Overlap	E()
1	SW:LV1_CHICK	Ig lambda chain V-1 region OS=Gall	113	81.7	91.5	82	1.1e-21
2	SW:HV311_HUMAN	Ig heavy chain V-III region KOL	126	54.8	75.4	126	2.2e-21
3	SW:HV321_HUMAN	Ig heavy chain V-III region DOB	120	55.6	75.0	124	5.9e-21
4	SW:HVR01_RAT	Ig heavy chain V region IR2 OS=Rat	142	54.8	77.8	126	9.1e-21
5	SW:HV303_HUMAN	Ig heavy chain V-III region VH26	117	64.9	84.5	97	4e-20
6	SW:HV307_HUMAN	Ig heavy chain V-III region CAM	122	52.4	74.2	124	1.2e-19
7	SW:HVM16_MOUSE	Ig heavy chain V region MOPC 21	136	54.0	75.8	124	2.3e-19
8	SW:HV310_HUMAN	Ig heavy chain V-III region HIL	121	52.0	73.6	125	3.9e-19

```
SW:LV1_CHICK P04210 Ig lambda chain V-1 region OS=Gall  (113 aa)
 initn: 440 init1: 387 opt: 440  Z-score: 523.7  bits: 103.2 E(): 1.1e-21
Smith-Waterman score: 440; 81.7% identity (91.5% similar) in 82 aa overlap
(3-84:31-110)

                                                 10        20        30
Sequen                                     GVSEPGRTVEITCSGGGSSNYYGWYQQKAPGS
                                             ..::.::.:::::  :  ::::::::::::
SW:LV1 MAWAPLLLAVLAHTSGSLVQAALTQPSSVSANPGETVKITCSGDRS--YYGWYQQKAPGS
                10        20        30        40          50

              40        50        60        70        80        90
Sequen APVSLIYANTNRPSNIPSRFSGSGSGSTNTLTITGVQADDEAVYFCGSGDGSYSGIFGAG
       :::.::: :::::::::::::: :::: ::::::::::::::.:::.:.:
SW:LV1 APVTLIYDNTNRPSNIPSRFSGSKSGSTATLTITGVQADDEAVYYCGSADSSSTA
       60        70        80        90       100       110

            100       110       120       130       140       150
Sequen TTPTVLGQSSRSSAVTLDESGGGLQTPRGALSLVCKASGFTFSDRGMFWVRQAPGKGLEF
```

Kết quả nhận được cho thấy trình tự nhận được có sự tương đồng cao (91,5%) với trình tự amino acid của kháng thể gà có mã số P041210

Phục lục 3.

3.1. Kết quả thu nhận gen mã hóa kháng thể đặc hiệu HER2 từ thư viện phage



Trình tự nucleotide và amino axit suy diễn của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 từ thư viện phage

```
        10        20        30        40        50        60
TCTGTATCTGCTTCAGTCGGAGATAGGGTTACAATCACTTGCAAAGCCTCACAAGATGTC
 S  V  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  K  A  S  Q  D  V

        70        80        90       100       110       120
TCAATAGGTGTCGCATGGTATCAACAGAAACCTGGTAAGGCCCCTAAGTTGTTGATCTAC
 S  I  G  V  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y

       130       140       150       160       170       180
TCAGCCTCATACAGATACACCGGAGTACCATCAAGGTTCTCAGGTTCTGGATCAGGTACT
 S  A  S  Y  R  Y  T  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T

       190       200       210       220       230       240
GACTTTACCTTGACCATTTCATCATTGCAGCCAGAGGATTTTGCAACCTATTATTGCCAG
 D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q

       250       260       270       280       290       300
CAATACTACATCTACCCTTACACCTTCGGACAAGGAACAAAAGTTGAGATTAAGTCATCA
 Q  Y  Y  I  Y  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K  V  E  I  K  S  S

       310       320       330       340       350       360
GGTGGAGGAGGTTCAGGTGGAGGAGGTTCTGGAGGTGAAGTACAATTAGTCGAATCAGGA
 G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  E  V  Q  L  V  E  S  G

       370       380       390       400       410       420
GGTGGTTTGGTTCAACCTGGAGGATCATTAAGGTTGTCTTGTGCAGCATCTGGTTTCACA
 G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T

       430       440       450       460       470       480
TTCACCGATTACACAATGGATTGGGTTAGACAGGCCCCTGGAAAGGGTTTGGAGTGGGTC
 F  T  D  Y  T  M  D  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V

       490       500       510       520       530       540
GCCGACGTCAACCCTAATTCTGGTGGATCAATCTATAACCAGAGATTCAAGGGAAGGTTC
 A  D  V  N  P  N  S  G  G  S  I  Y  N  Q  R  F  K  G  R  F

       550       560       570       580       590       600
ACCTTGTCAGTGGATAGGTCTAAGAACACCTTGTATTTGCAGATGAACTCATTGAGGGCT
 T  L  S  V  D  R  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A

       610       620       630       640       650       660
GAGGATACAGCCGTTTACTACTGTGCCAGAAATTTGGGACCTTCTTTCTACTTCGACTAC
 E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  N  L  G  P  S  F  Y  F  D  Y

       670       680       690       700       710       720
TGGGGTCAAGGTACTTTGGTTACCGTATCTTCAGGTATTGGAGCTGTATTGAAAGTCTTA
 W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  G  I  G  A  V  L  K  V  L

       730       740       750       760       770       780
ACCACCGGTTTGCCTGCCTTGATATCTTGGATCAAGAGGCAGAGGCAGCAGCACCACCAT
 T  T  G  L  P  A  L  I  S  W  I  K  R  Q  R  Q  Q  H  H  H

       790       800
CATCACCATGCGGCCGC
 H  H  H  A  A
```

Kết quả tách dòng và xác định trình tự nucleotide vùng hằng định của kháng thể người để tạo kháng thể dạng ghép

```
PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN  50
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK 100
ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD 150
IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS 200
VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K                                221
```

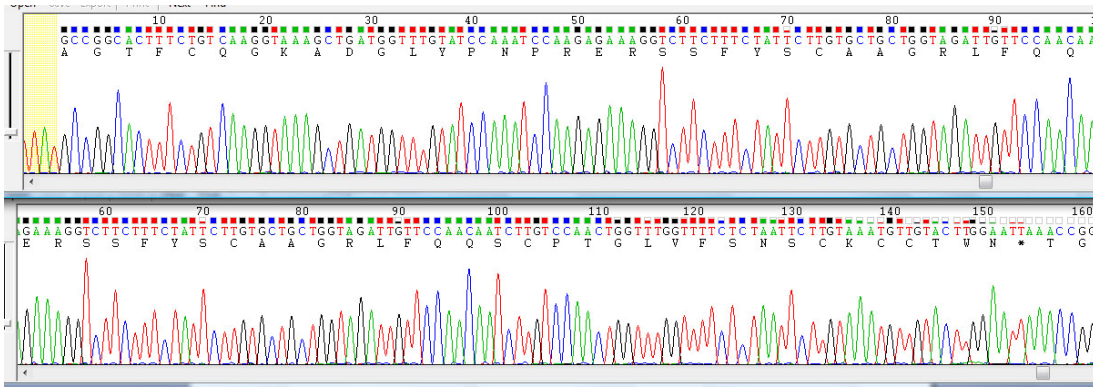
SUBMISSION PARAMETERS			
Title	Sequence 221 aa	Database	pdb
Sequence length	221	Sequence type	p
Program	fasta	Version	35.02 Feb. 18, 2008
Expectation upper value	10.0	Matrix	BL50
Sequence range	1-	Number of scores	50
Number of alignments	50	Word size	2
Open gap penalty	-10	Gap extension penalty	-2
Histogram	false		

Show Annotation | Fasta Result | MView | VisualFasta | XML | SUBMIT ANOTHER JOB

Clear all | Check all | Invert selection | Reset | Show Alignments | Download | fasta

Alignment	DB:ID	Source	Length	Identity%	Similar%	Overlap	E()
1	PDB:2DTS_B	mol:protein length:223 Ig gamma-1 chain C	223	100.0	100.0	221	1.7e-61
2	PDB:2DTQ_B	mol:protein length:223 Ig gamma-1 chain C	223	100.0	100.0	221	1.7e-61
3	PDB:2DTS_A	mol:protein length:223 Ig gamma-1 chain C	223	100.0	100.0	221	1.7e-61
4	PDB:2DTQ_A	mol:protein length:223 Ig gamma-1 chain C	223	100.0	100.0	221	1.7e-61
5	PDB:1HZH_H	mol:protein length:457 IMMUNOGLOBULIN HEAV	457	100.0	100.0	221	2.4e-61
6	PDB:1HZH_K	mol:protein length:457 IMMUNOGLOBULIN HEAV	457	100.0	100.0	221	2.4e-61
7	PDB:2J6E_A	mol:protein length:232 IG GAMMA-1 CHAIN C	232	99.5	100.0	221	3.2e-61
8	PDB:2J6E_B	mol:protein length:232 IG GAMMA-1 CHAIN C	232	99.5	100.0	221	3.2e-61
9	PDB:1T89_B	mol:protein length:224 recombinant IgG1 he	224	99.1	100.0	221	3.9e-61

Kết quả tách dòng vùng hCBD để tạo kháng thể dạng ghép



Gen tái tổ hợp mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên HER2

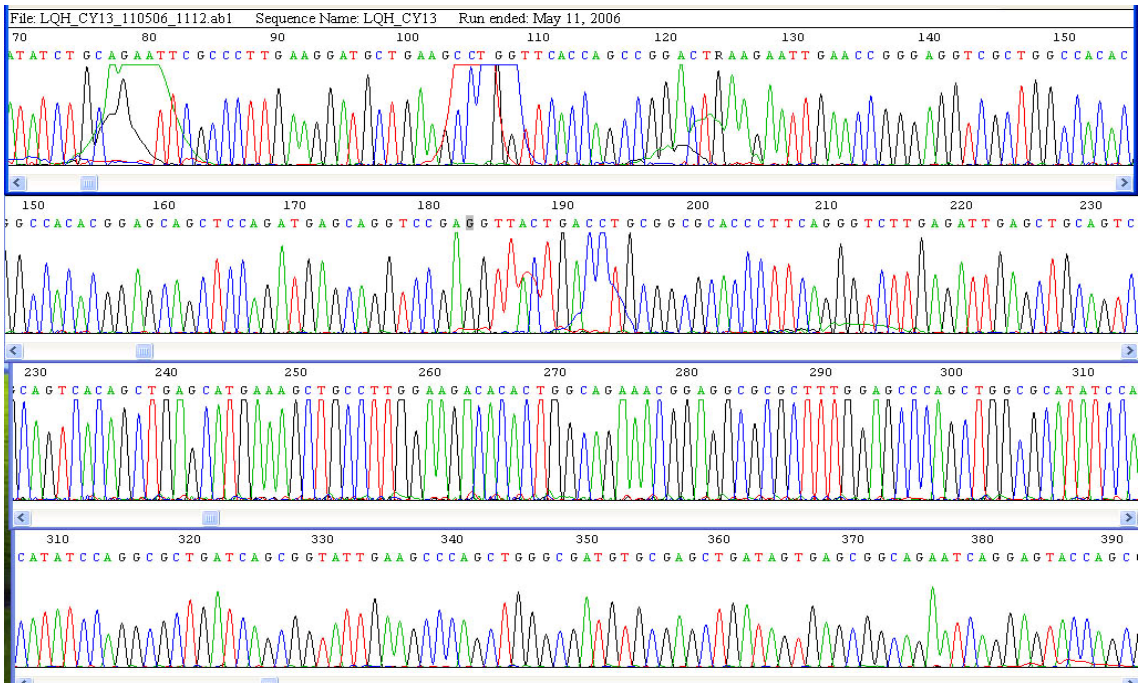
Trình tự nucleotide gen tái tổ hợp mã hóa kháng thể dạng ghép đặc hiệu kháng nguyên HER2 được xác định như sau:

```
ATGGACTGCCCTTACGGACCAAAGAAAAAGAGGAAGGTAGGTGGACAGATCCAAATGACT 60
 M  D  C  P  Y  G  P  K  K  K  R  K  V  G  G  Q  I  Q  M  T

CAGTCACCATCTTCTGTATCTGCTTCAGTCGGAGATAGGGTTACAATCACTTGCAAAGCC 120
 Q  S  P  S  S  V  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  K  A

TCACAAGATGTCTCAATAGGTGTCGCATGGTATCAACAGAAACCTGGTAAGGCCCCTAAG 180
 S  Q  D  V  S  I  G  V  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K

TTGTTGATCTACTCAGCCTCATACAGATACACCGGAGTACCATCAAGGTTCTCAGGTTCT 240
 L  L  I  Y  S  A  S  Y  R  Y  T  G  V  P  S  R  F  S  G  S

GGATCAGGTACTGACTTTACCTTGACCATTTCATCATTGCAGCCAGAGGATTTTGCAACC 300
 G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T

 TATTATTGCCAGCAATACTACATCTACCCTTACACCTTCGGACAAGGAACAAAAGTTGAG 360
 Y  Y  C  Q  Q  Y  Y  I  Y  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K  V  E

 ATTAAGTCATCAGGTGGAGGAGGTTCAGGTGGAGGAGGTTCTGGAGGTGAAGTACAATTA 420
 I  K  S  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  E  V  Q  L

 GTCGAATCAGGAGGTGGTTTGGTTCAACCTGGAGGATCATTAAGGTTGTCTTGTGCAGCA 480
 V  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A

TCTGGTTTCACATTCACCGATTACACAATGGATTGGGTTAGACAGGCCCCTGGAAAGGGT 540
 S  G  F  T  F  T  D  Y  T  M  D  W  V  R  Q  A  P  G  K  G

TTGGAGTGGGTCGCCGACGTCAACCCTAATTCTGGTGGATCAATCTATAACCAGAGATTC 600
 L  E  W  V  A  D  V  N  P  N  S  G  G  S  I  Y  N  Q  R  F

AAGGGAAGGTTCACCTTGTCAGTGGATAGGTCTAAGAACACCTTGTATTTGCAGATGAAC 660
 K  G  R  F  T  L  S  V  D  R  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N

TCATTGAGGGCTGAGGATACAGCCGTTTACTACTGTGCCAGAAATTTGGGACCTTCTTTC 720
 S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  N  L  G  P  S  F

TACTTCGACTACTGGGGTCAAGGTACTTTGGTTACCGTAcccgggGAACCTAAATCTTGT 780
 Y  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  P  G  E  P  K  S  C

GATAAAACACATACATGTCCTCCTTGTCCTGCACCTGAATTATTAGGAGGACCTTCTGTA 840
 D  K  T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V

TTTTTATTTCCTCCTAAACCTAAAGATACATTAATGATTTCTCGTACACCTGAAGTAACA 900
 F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T

TGTGTAGTAGTAGATGTATCTCATGAAGATCCTGAAGTAAAATTTAATTGGTATGTAGAT 960
 C  V  V  V  D  V  S  H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D

GGAGTAGAAGTACATAATGCAAAAACAAAACCTCGTGAAGAACAATATAATTCTACATAT 1020
 G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y
```

```
CGTGTAGTATCTGTATTAACAGTATTACATCAAGATTGGTTAAATGGAAAAGAATATAAA 1080
 R  V  V  S  V  L  T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K

TGTAAAGTATCTAATAAAGCATTACCTGCACCTATTGAAAAAACAATTTCTAAAGCAAAA 1140
 C  K  V  S  N  K  A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K

GGACAACCTCGTGAACCTCAAGTATATACATTACCTCCTTCTCGTGATGAATTAACAAAA 1200
 G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K

AATCAAGTATCTTTAACATGTTTAGTAAAAGGATTTTATCCTTCTGATATTGCAGTAGAA 1260
 N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E

TGGGAATCTAATGGACAACCTGAAAATAATTATAAAACAACACCTCCTGTATTAGATTCT 1320
 W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S

GATGGATCTTTTTTTTTATATTCTAAATTAACAGTAGATAAATCTCGTTGGCAACAAGGA 1380
 D  G  S  F  F  L  Y  S  K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G

AATGTATTTTCTTGTTCTGTAATGCATGAAGCATTACATAATCATTATACACAAAAATCT 1440
 N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S

TTATCTTTATCTCCTGGAAAAGCCGGCACTTTCTGTCAAGGTAAAGCTGATGGTTTGTAT 1500
 L  S  L  S  P  G  K  A  G  T  F  C  Q  G  K  A  D  G  L  Y

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
CCAAATCCAAGAGAAAGATCTTCTTTCTATTCTTGTGCTGCTGGTAGATTGTTCCAACAA 1560
 P  N  P  R  E  R  S  S  F  Y  S  C  A  A  G  R  L  F  Q  Q

TCTTGTCCAACTGGTTTGGTTTTCTCTAATTCTTGTAAATGTTGTACTTGGAATTAATTA 1620
 S  C  P  T  G  L  V  F  S  N  S  C  K  C  C  T  W  N  *  L
```

Kháng thể phage đặc hiệu HER2

Phụ lục 4. Kết quả tách dòng gen mã hóa epitope kháng nguyên Cyfra 21-1

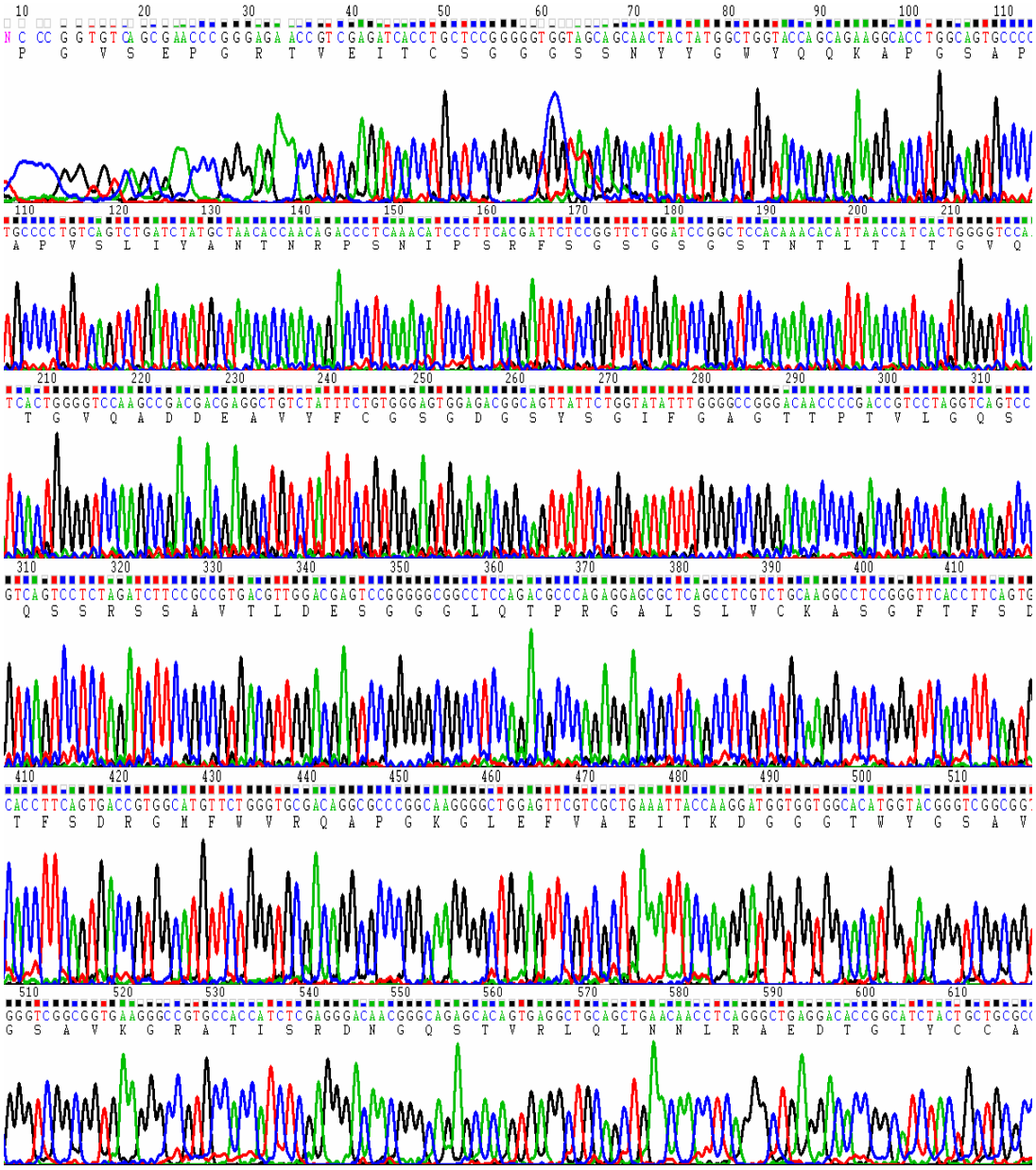



```
AATTCGCCCTTGAAGGATGCTGAAGCCTGGTTCACCAGCCGGACTGAAGAATTGAACCGGGAGGTCGCTGGC  72
 N  S  P  L  K  D  A  E  A  W  F  T  S  R  T  E  E  L  N  R  E  V  A  G

CACACGGAGCAGCTCCAGATGAGCAGGTCCGAGGTTACTGACCTGCGGCGCACCCTTCAGGGTCTTGAGATT 144
 H  T  E  Q  L  Q  M  S  R  S  E  V  T  D  L  R  R  T  L  Q  G  L  E  I

GAGCTGCAGTCACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTTGGAAGACACACTGGCAGAAACGGAGGCGCGCTTTGGA 216
 E  L  Q  S  Q  L  S  M  K  A  A  L  E  D  T  L  A  E  T  E  A  R  F  G

GCCCAGCTGGCGCATATCCAGGCGCTGATCAGCGGTATTGAAGCCCAGCTGGGCGATGTGCGAGCTGATAGT 288
 A  Q  L  A  H  I  Q  A  L  I  S  G  I  E  A  Q  L  G  D  V  R  A  D  S

GAGCGGCAGAATCAGGAGTACCAGCGGCTCATGGACATCAAGTCGCGGCTGGAGCAGGAGATTGCCACCTAC 360
 E  R  Q  N  Q  E  Y  Q  R  L  M  D  I  K  S  R  L  E  Q  E  I  A  T  Y

CGCAGCCTGCTCGAGGGACAGGAAGATCACTACAACAATTTGTCTGCCTCCAAGGTCCTCTGAGGCAGCAGG 432
 R  S  L  L  E  G  Q  E  D  H  Y  N  N  L  S  A  S  K  V  L  *  G  S  R

TCTGKGKCTTCTGCTGTCCTTTGGAGGGTGTCTTCTGGGTAAAGGG                           478
   X  X  X  F  C  C  P  L  E  G  V  F  W  V  K
```

```
>>SW:K1C19_HUMAN P08727 Keratin, type I cytoskeletal 19   (400 aa)
 initn: 838 initl: 838 opt: 838  Z-score: 924.5  bits: 178.4 E(): 3.1e-44
Smith-Waterman score: 838;  99.265% identity (100.000% similar) in 136 aa overlap (3-138:265-4

                                            10        20        30
Sequen                                PLKDAEAWFTSRNEELNREVAGHTEQLQMSRS
                                        ::::::::::.::::::::::::::::::
SW:K1C VEVDSAPGTDLAKILSDMRSQYEVMAEQNRKDAEAWFTSRTEELNREVAGHTEQLQMSRS
          240       250       260       270       280       290

              40        50        60        70        80        90
Sequen EVTDLRRTLQGLEIELQSQLSMKAALEDTLAETEARFGAQLAHIQALISGIEAQLGDVRA
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SW:K1C EVTDLRRTLQGLEIELQSQLSMKAALEDTLAETEARFGAQLAHIQALISGIEAQLGDVRA
          300       310       320       330       340       350

             100       110       120       130
Sequen DSERQNQEYQRLMDIKSRLEQEIATYRSLLEGQEDHYNNLSASKVL
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SW:K1C DSERQNQEYQRLMDIKSRLEQEIATYRSLLEGQEDHYNNLSASKVL
          360       370       380       390       400
```

Phụ lục 5

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa scFv kháng thể đặc hiệu kháng nguyên Cyfra 21-1.



Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của kháng thể đặc hiệu Cyfra21-1 (clone7)

```
         10        20        30        40        50        60
GGTGTCAGCGAACCCGGGAGAACCGTCGAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGTAGCAGCAAC
 G  V  S  E  P  G  R  T  V  E  I  T  C  S  G  G  G  S  S  N

         70        80        90       100       110       120
TACTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCTGGCAGTGCCCCTGTCAGTCTGATCTATGCT
 Y  Y  G  W  Y  Q  Q  K  A  P  G  S  A  P  V  S  L  I  Y  A

        130       140       150       160       170       180
AACACCAACAGACCCTCAAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCTGGATCCGGCTCCACA
 N  T  N  R  P  S  N  I  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  S  T

        190       200       210       220       230       240
AACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGT
 N  T  L  T  I  T  G  V  Q  A  D  D  E  A  V  Y  F  C  G  S

        250       260       270       280       290       300
GGAGACGGCAGTTATTCTGGTATATTTGGGGCCGGGACAACCCCGACCGTCCTAGGTCAG
 G  D  G  S  Y  S  G  I  F  G  A  G  T  T  P  T  V  L  G  Q

        310       320       330       340       350       360
TCCTCTAGATCTTCCGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCAGA
 S  S  R  S  S  A  V  T  L  D  E  S  G  G  G  L  Q  T  P  R

        370       380       390       400       410       420
GGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCACCTTCAGTGACCGTGGCATGTTC
 G  A  L  S  L  V  C  K  A  S  G  F  T  F  S  D  R  G  M  F

        430       440       450       460       470       480
TGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTTCGTCGCTGAAATTACCAAGGATGGT
 W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  F  V  A  E  I  T  K  D  G

        490       500       510       520       530       540
GGTGGCACATGGTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGG
 G  G  T  W  Y  G  S  A  V  K  G  R  A  T  I  S  R  D  N  G

        550       560       570       580       590       600
CAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATCTACTGC
 Q  S  T  V  R  L  Q  L  N  N  L  R  A  E  D  T  G  I  Y  C

        610       620       630       640       650       660
TGCGCCAAACCTGCTGGTTATTGTTGGTATGGTGATTGTGGTGGTTGGATCGACGCATGG
 C  A  K  P  A  G  Y  C  W  Y  G  D  C  G  G  W  I  D  A  W

        670       680       690       700       710       720
GGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCACTAGTGGCCAGGCCAGACCAGATCCTCAT
 G  H  G  T  E  V  I  V  S  S  T  S  G  Q  A  R  P  D  P  H
```

Kết quả so sánh bằng phần mềm Fasta với các trình tự amino acid suy diễn từ gen mã hóa kháng thể đặc hiệu eptope kháng nguyên Cyfra 21-1 với các trình tự amino acid đã công bố trong ngân hàng dữ liệu quốc tế

Alignment	DB:ID	Source	Length	Identity%	Similar%	Overlap	E()
1	SW:LV1_CHICK	Ig lambda chain V-1 region OS=Gall	113	81.7	91.5	82	1.1e-21
2	SW:HV311_HUMAN	Ig heavy chain V-III region KOL	126	54.8	75.4	126	2.2e-21
3	SW:HV321_HUMAN	Ig heavy chain V-III region DOB	120	55.6	75.0	124	5.9e-21
4	SW:HVR01_RAT	Ig heavy chain V region IR2 OS=Rat	142	54.8	77.8	126	9.1e-21
5	SW:HV303_HUMAN	Ig heavy chain V-III region VH26	117	64.9	84.5	97	4e-20
6	SW:HV307_HUMAN	Ig heavy chain V-III region CAM	122	52.4	74.2	124	1.2e-19
7	SW:HVM16_MOUSE	Ig heavy chain V region MOPC 21	136	54.0	75.8	124	2.3e-19
8	SW:HV310_HUMAN	Ig heavy chain V-III region HIL	121	52.0	73.6	125	3.9e-19

```
SW:LV1_CHICK P04210 Ig lambda chain V-1 region OS=Gall  (113 aa)
 initn: 440 init1: 387 opt: 440  Z-score: 523.7  bits: 103.2 E(): 1.1e-21
Smith-Waterman score: 440; 81.7% identity (91.5% similar) in 82 aa overlap (3-
84:31-110)

                                                 10        20        30
Sequen                                    GVSEPGRTVEITCSGGGSSNYYGWYQQKAPGS
                                            ..::.::.::::  :  ::::::::::::
SW:LV1 MAWAPLLLAVLAHTSGSLVQAALTQPSSVSANPGETVKITCSGDRS--YYGWYQQKAPGS
                10        20        30        40          50

             40        50        60        70        80        90
Sequen APVSLIYANTNRPSNIPSRFSGSGSGSTNTLTITGVQADDEAVYFCGSGDGSYSGIFGAG
       :::.::: :::::::::::::: :::: :::::::::::::::.:::.:.:
SW:LV1 APVTLIYDNTNRPSNIPSRFSGSKSGSTATLTITGVQADDEAVYYCGSADSSSTA
       60        70        80        90       100       110

            100       110       120       130       140       150
Sequen TTPTVLGQSSRSSAVTLDESGGGLQTPRGALSLVCKASGFTFSDRGMFWVRQAPGKGLEF
```

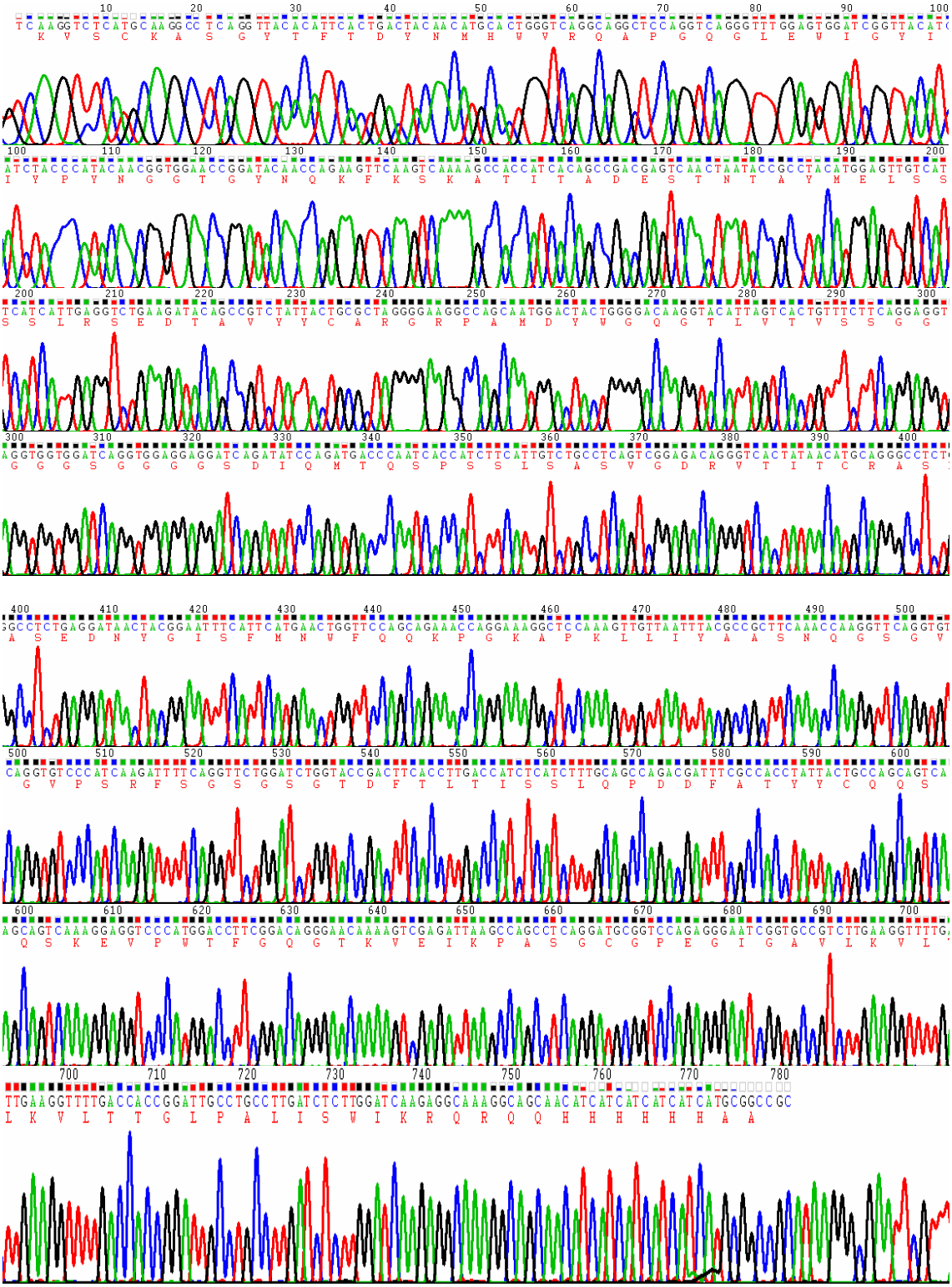
Phụ lục 6

Kết quả xác định trình tự nucleotide gen mã hóa kháng nguyên CD33

```
         10        20        30        40        50        60
TCTGCTCACACAGGAAGCCCTGGAAGCTGCTTCCTCAGACATGCCGCTGCTGCTACTGCT
 L  L  T  Q  E  A  L  E  A  A  S  S  D  M  P  L  L  L  L  L

         70        80        90       100       110       120
GCCCCTGCTGTGGGCAGGGGCCCTGGCTATGGATCCAAATTTCTGGCTGCAAGTGCAGGA
 P  L  L  W  A  G  A  L  A  M  D  P  N  F  W  L  Q  V  Q  E

        130       140       150       160       170       180
GTCAGTGACGGTACAGGAGGGTTTGTGCGTCCTCGTGCCCTGCACTTTCTTCCATCCCAT
 S  V  T  V  Q  E  G  L  C  V  L  V  P  C  T  F  F  H  P  I

        190       200       210       220       230       240
ACCCTACTACGACAAGAACTCCCCAGTTCATGGTTACTGGTTCCGGGAAGGAGCCATTAT
 P  Y  Y  D  K  N  S  P  V  H  G  Y  W  F  R  E  G  A  I  I

        250       260       270       280       290       300
ATCCAGGGACTCTCCAGTGGCCACAAACAAGCTAGATCAAGAAGTACAGGAGGAGACTCA
 S  R  D  S  P  V  A  T  N  K  L  D  Q  E  V  Q  E  E  T  Q

        310       320       330       340       350       360
GGGCAGATTCCGCCTCCTTGGGGATCCCAGTAGGAACAACTGCTCCCTGAGCATCGTAGA
 G  R  F  R  L  L  G  D  P  S  R  N  N  C  S  L  S  I  V  D

        370       380       390       400       410       420
CGCCAGGAGGAGGGATAATGGTTCATACTTCTTTCGGATGGAGAGAGGAAGTACCAAATA
 A  R  R  R  D  N  G  S  Y  F  F  R  M  E  R  G  S  T  K  Y

        430       440       450       460       470       480
CAGTTACAAATCTCCCCAGCTCTCTGTGCATGTGACAGACTTGACCCACAGGCCCAAAAT
 S  Y  K  S  P  Q  L  S  V  H  V  T  D  L  T  H  R  P  K  I

        490       500       510       520       530       540
CCTCATCCCTGGCACTCTAGAACCCGGCCACTCCAAAAACCTGACCTGCTCTGTGTCCTG
 L  I  P  G  T  L  E  P  G  H  S  K  N  L  T  C  S  V  S  W

        550       560       570       580       590       600
GGCCTGTGAGCAGGGAACACCCCCGATCTTCTCCTGGTTGTCAGCTGCCCCCACCTCCCT
 A  C  E  Q  G  T  P  P  I  F  S  W  L  S  A  A  P  T  S  L

        610       620       630       640       650       660
GGGCCCCAGGACTACTCACTCCTCGGTGCTCATAATCACCCCACGGCCCCAGGACCACGG
 G  P  R  T  T  H  S  S  V  L  I  I  T  P  R  P  Q  D  H  G

        670       680       690       700       710       720
CACCAACCTGACCTGTCAGGTGAAGTTCGCTGGAGCTGGTGTGACTACGGAGAGAACCAT
 T  N  L  T  C  Q  V  K  F  A  G  A  G  V  T  T  E  R  T  I

        730       740       750       760       770       780
CCAGCTCAACGTCACCTATGTTCCACAGAACCCAACAACTGGTATCTTTCCAGGAGATGG
 Q  L  N  V  T  Y  V  P  Q  N  P  T  T  G  I  F  P  G  D  G
```

```
       790       800       810       820       830       840
CTCAGGGAAACAAGAGACCAGAGCAGGAGTGGTTCATGGGGCCATTGGAGGAGCTGGTGT
 S  G  K  Q  E  T  R  A  G  V  V  H  G  A  I  G  G  A  G  V

       850       860       870       880       890       900
TACAGCCCTGCTCGCTCTTTGTCTCTGCCTCATCTTCTTCATAGTGAAGACCCACAGGAG
 T  A  L  L  A  L  C  L  C  L  I  F  F  I  V  K  T  H  R  R

       910       920       930       940       950       960
GAAAGCAGCCAGGACAGCAGTGGGCAGGAATGACACCCACCCTACCACAGGGTCAGCCTC
 K  A  A  R  T  A  V  G  R  N  D  T  H  P  T  T  G  S  A  S

       970       980       990      1000      1010      1020
CCCGAAACACCAGAAGAAGTCCAAGTTACATGGCCCCACTGAAACCTCAAGCTGTTCAGG
 P  K  H  Q  K  K  S  K  L  H  G  P  T  E  T  S  S  C  S  G

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
TGCCGCCCCTACTGTGGAGATGGATGAGGAGCTGCATTATGCTTCCCTCAACTTTCATGG
 A  A  P  T  V  E  M  D  E  E  L  H  Y  A  S  L  N  F  H  G

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
GATGAATCCTTCCAAGGACACCTCCACCGAATACTCAGAGGTCAGGACCCAGTGAGGAAC
 M  N  P  S  K  D  T  S  T  E  Y  S  E  V  R  T  Q  *  G  T
```

Phụ lục 7. Trình tự gen mã hóa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33



Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD 33

```
         10        20        30        40        50        60
TCAAGGTCTCATGCAAGGCCTCAGGTTACACATTCACTGACTACAACATGCACTGGGTCA
  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  D  Y  N  M  H  W  V  R

         70        80        90       100       110       120
GGCAGGCTCCAGGTCAGGGTTTGGAGTGGATCGGTTACATCTACCCATACAACGGTGGAA
  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y  I  Y  P  Y  N  G  G  T

        130       140       150       160       170       180
CCGGATACAACCAGAAGTTCAAGTCAAAAGCCACCATCACAGCCGACGAGTCAACTAATA
  G  Y  N  Q  K  F  K  S  K  A  T  I  T  A  D  E  S  T  N  T

        190       200       210       220       230       240
CCGCCTACATGGAGTTGTCATCATTGAGGTCTGAAGATACAGCCGTCTATTACTGCGCTA
  A  Y  M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R

        250       260       270       280       290       300
GGGGAAGGCCAGCAATGGACTACTGGGGACAAGGTACATTAGTCACTGTTTCTTCAGGAG
  G  R  P  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  G  G

        310       320       330       340       350       360
GTGGTGGATCAGGTGGAGGAGGATCAGATATCCAGATGACCCAATCACCATCTTCATTGT
  G  G  S  G  G  G  G  S  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S

        370       380       390       400       410       420
CTGCCTCAGTCGGAGACAGGGTCACTATAACATGCAGGGCCTCTGAGGATAACTACGGAA
  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  E  D  N  Y  G  I

        430       440       450       460       470       480
TTTCATTCATGAACTGGTTCCAGCAGAAACCAGGAAAGGCTCCAAAGTTGTTAATTTACG
  S  F  M  N  W  F  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  A

        490       500       510       520       530       540
CCGCTTCAAACCAAGGTTCAGGTGTCCCATCAAGATTTTCAGGTTCTGGATCTGGTACCG
  A  S  N  Q  G  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D

        550       560       570       580       590       600
ACTTCACCTTGACCATCTCATCTTTGCAGCCAGACGATTTCGCCACCTATTACTGCCAGC
  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  D  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q

        610       620       630       640       650       660
AGTCAAAGGAGGTCCCATGGACCTTCGGACAGGGAACAAAAGTCGAGATTAAGCCAGCCT
  S  K  E  V  P  W  T  F  G  Q  G  T  K  V  E  I  K  P  A  S

        670       680       690       700       710       720
CAGGATGCGGTCCAGAGGGAATCGGTGCCGTCTTGAAGGTTTTGACCACCGGATTGCCTG
  G  C  G  P  E  G  I  G  A  V  L  K  V  L  T  T  G  L  P  A

        730       740       750       760       770       780
CCTTGATCTCTTGGATCAAGAGGCAAAGGCAGCAACATCATCATCATCATCATGCGGCCG
  L  I  S  W  I  K  R  Q  R  Q  Q  H  H  H  H  H  H  A  A
```

Phụ lục 8

Trình tự gen mã hóa kháng thể đặc hiệu CD33 đã đăng ký trong Ngân hàng gen

1: AM402974. Reports ...[gi:115306410]

- Features
- Sequence

```
LOCUS       AM402974                 885 bp    DNA     linear   SYN 22-
SEP-2006
DEFINITION  Synthetic construct for chimaeric Homo sapiens and Apis
cerana
            huanH33gen gene for H33Mel.
ACCESSION   AM402974
VERSION     AM402974.1  GI:115306410
KEYWORDS    H33Mel; huanH33gen gene.
SOURCE      synthetic construct
  ORGANISM  synthetic construct
            other sequences; artificial sequences.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Le,H.Q., La,H.T. and Nguyen,H.X.
  TITLE     Making immunotoxin with two properties for the diagnosis and
            treatment of blood cancer
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 885)
  AUTHORS   Le,H.Q.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-SEP-2006) Le H.Q., Animal Cell Biotechnology,
            Biotechnology, 18 Hoang Quoc Viet, Caugiay, Hanoi, 10,000,
VIET NAM
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..885
                     /organism="synthetic construct"
                     /mol_type="other DNA"
                     /db_xref="taxon:32630"
                     /focus
     source          1..387
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="other DNA"
                     /isolation_source="patient with acute myeloid
leukemia"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone_lib="human synthetic VH + VL scFv library,
                     Griffin.1 library"
     source          424..774
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="other DNA"
                     /isolation_source="patient with acute myeloid
leukemia"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone_lib="human synthetic VH + VL scFv library,
                     Griffin.1 library"
     source          775..852
                     /organism="Apis cerana"
                     /mol_type="other DNA"
                     /db_xref="taxon:7461"
```

```
                     /country="Viet Nam:Hanoi"
     gene            1..885
                     /gene="huanH33gen"
     CDS             1..885
                     /gene="huanH33gen"
                     /note="synthetic CDS for antibody against CD33 and
                     cytolytic cells"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="H33Mel"
                     /protein_id="CAL47330.1"
                     /db_xref="GI:115306411"

/translation="MGCPYGPKKKRKVGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF
TDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLR
SEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV
TITCRASEDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKPASGCGPEGIGAVLKVLTTGLPALIS
WIKRQRQQHHHHHHAAAN"
     misc_feature    388..423
                     /gene="huanH33gen"
                     /note="linker sequence"
     misc_feature    853..885
                     /gene="huanH33gen"
                     /note="His-Tag"
ORIGIN
     1 atgggttgcc catacggacc aaagaagaag aggaaggtcg gtggacaggt ccagttggta
    61 cagtcaggtg cagaggtaaa gaagccagga tcatctgtca aggtctcatg caaggcctca
   121 ggttacacat tcactgacta caacatgcac tgggtcaggc aggctccagg tcagggtttg
   181 gagtggatcg gttacatcta cccatacaac ggtggaaccg gatacaacca gaagttcaag
   241 tcaaaagcca ccatcacagc cgacgagtca actaataccg cctacatgga gttgtcatca
   301 ttgaggtctg aagatacagc cgtctattac tgcgctaggg gaaggccagc aatggactac
   361 tggggacaag gtacattagt cactgtttct tcaggaggtg gtggatcagg tggaggagga
   421 tcagatatcc agatgaccca atcaccatct tcattgtctg cctcagtcgg agacagggtc
   481 actataacat gcagggcctc tgaggataac tacggaattt cattcatgaa ctggttccag
   541 cagaaaccag gaaaggctcc aaagttgtta atttacgccg cttcaaacca aggttcaggt
   601 gtcccatcaa gattttcagg ttctggatct ggtaccgact tcaccttgac catctcatct
   661 ttgcagccag acgatttcgc cacctattac tgccagcagt caaaggaggt cccatggacc
   721 ttcggacagg gaacaaaagt cgagattaag ccagcctcag gatgcggtcc agagggaatc
   781 ggtgccgtct tgaaggtttt gaccaccgga ttgcctgcct tgatctcttg gatcaagagg
   841 caaaggcagc aacatcatca tcatcatcat gcggccgcga attaa
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Phụ lục 9

Trình tự gen mã hóa kháng thể đặc hiệu HER2 đã đăng ký trong Ngân hàng gen quốc tế

1: AM402973. Reports ...[gi:115306408]

- Features
- Sequence

```
LOCUS       AM402973                 876 bp    DNA     linear   SYN 22-
SEP-2006
DEFINITION  Synthetic construct for chimaeric Homo sapiens and Apis
cerana
            huanHergen gene for HerMel.
ACCESSION   AM402973
VERSION     AM402973.1  GI:115306408
KEYWORDS    HerMel; huanHergen gene.
SOURCE      synthetic construct
  ORGANISM  synthetic construct
            other sequences; artificial sequences.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Le,H.Q., La,H.T. and Nguyen,H.X.
  TITLE     Making immunotoxins with two properties for the diagnosis and
            treatment of blood cancer
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 876)
  AUTHORS   Le,H.Q.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-SEP-2006) Le H.Q., Animal Cell Biotechnology,
            Biotechnology, 18 Hoang Quoc Viet, Caugiay, Hanoi, 10,000,
VIET NAM
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..876
                     /organism="synthetic construct"
                     /mol_type="other DNA"
                     /db_xref="taxon:32630"
                     /focus
     source          1..366
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="other DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="MCF7"
                     /clone_lib="human synthetic VH + VL scFv Library,
                     Griffin.1 Library"
     source          409..765
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="other DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="MCF7"
                     /clone_lib="human synthetic VH + VL scFv Library,
                     Griffin.1 Library"
     source          766..843
                     /organism="Apis cerana"
                     /mol_type="other DNA"
                     /db_xref="taxon:7461"
                     /country="Viet Nam:Hanoi"
     gene            1..876
```

```
                     /gene="huanHergen"
     CDS             1..876
                     /gene="huanHergen"
                     /function="immunotoxin"
                     /note="synthetic CDS for antibody to Her2 and
cytolytic
                     cells"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="HerMel"
                     /protein_id="CAL47329.1"
                     /db_xref="GI:115306409"

/translation="MDCPYGPKKKRKVGGQIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQDV
SIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY
CQQYYIYPYTFGQGTKVEIKSSGGGGSGGGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA
SGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSGIGAVLKVLTTGLPALISWIK
RQRQQHHHHHHAAAN"
     misc_feature    367..408
                     /gene="huanHergen"
                     /note="linker sequence"
     misc_feature    844..876
                     /gene="huanHergen"
                     /note="His-Tag"
ORIGIN
     1 atggactgcc cttacggacc aaagaaaaag aggaaggtag gtggacagat ccaaatgact
    61 cagtcaccat cttctgtatc tgcttcagtc ggagataggg ttacaatcac ttgcaaagcc
   121 tcacaagatg tctcaatagg tgtcgcatgg tatcaacaga aacctggtaa ggcccctaag
   181 ttgttgatct actcagcctc atacagatac accggagtac catcaaggtt ctcaggttct
   241 ggatcaggta ctgactttac cttgaccatt tcatcattgc agccagagga ttttgcaacc
   301 tattattgcc agcaatacta catctaccct tacaccttcg gacaaggaac aaaagttgag
   361 attaagtcat caggtggagg aggttcaggt ggaggaggtt ctggaggtga agtacaatta
   421 gtcgaatcag gaggtggttt ggttcaacct ggaggatcat taaggttgtc ttgtgcagca
   481 tctggtttca cattcaccga ttacacaatg gattgggtta gacaggcccc tggaaagggt
   541 ttggagtggg tcgccgacgt caaccctaat tctggtggat caatctataa ccagagattc
   601 aagggaaggt tcaccttgtc agtggatagg tctaagaaca ccttgtattt gcagatgaac
   661 tcattgaggg ctgaggatac agccgtttac tactgtgcca gaaatttggg accttctttc
   721 tacttcgact actggggtca aggtactttg gttaccgtat cttcaggtat tggagctgta
   781 ttgaaagtct taaccaccgg tttgcctgcc ttgatatctt ggatcaagag gcagaggcag
   841 cagcaccacc atcatcacca tgcggccgcg aattaa
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

MỤC LỤC

THÔNG TIN CHUNG 1
MỞ ĐẦU 4
Phần I. GIỚI THIỆU CHUNG 5
1.1. Kháng thể đơn dòng và quy trình sản xuất 6
1.2. Các kháng thể đơn dòng đang được sử dụng trong y học 7
1.3. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng 9
1.4. Nghiên cứu ung thư 10
1.5. Các kháng nguyên ung thư theo nội dung nghiên cứu 11
1.6. Sơ đồ nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên 12
Phần II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 15
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU 15
2.1.1. Mẫu bệnh phẩm 15
2.1.2. Sinh phẩm và hóa chất 15
2.1.3. Trang thiết bị 19
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 20
2.2.1. Các phương pháp thao tác với DNA 20
2.2.2. Các phương pháp thao tác với protein tái tổ hợp 30
2.2.3. Các kỹ thuật phage display 48
2.2.4. Phương pháp thống kê sinh học 54
2.2.5. Gắn kháng thể với vàng làm nguyên liệu của KIT định tính 55
2.2.6. Phương pháp thử nghiệm độc tính cấp sản phẩm kháng thể 56
Phần III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN 58
3. I. TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU HER2 TRONG UNG THƯ VÚ 58
3.1.1. Tổng quan về ung thư vú 58
3.1.2. Ung thư vú liên quan tới sự biểu hiện mạnh HER2 62
3.1.3. Kết quả thu nhận kháng nguyên HER2 65
3.1.3.4. Kết quả biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên HER2 71
3.1.3.5. Kết luận về tách dòng gen mã hóa kháng nguyên HER2 75
3.1.4. Kết quả gây miễn dịch động vật thí nghiệm bằng HER2 75

3.1.5. Kết quả thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HER2 77
3.1.6. Kết quả gắn kháng thể với hạt vàng để tạo Kit chẩn đoán..... 97
3.1.7. Kết quả tạo KIT định lượng kháng nguyên HER2 101
3.1.8. Kết quả xác định đặc tính của kháng thể đặc hiệu HER2 106
3.1.9. Bàn luận và kết luận về thu nhận kháng thể đặc hiệu HER2 111
3.2. TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU CYFRA 21-1..... 116
3.2.1. Tổng quan về ung thư phổi 116
3.2.2. Ung thư phổi liên quan tới sự biểu hiện mạnh CYFRA 21-1 118
3.2.3. Kết quả thu nhận kháng nguyên CYFRA 21-1 120
3.2.4. Kết quả gây miễn dịch gà thí nghiệm bằng CYFRA 21-1 130
3.2.5. Kết quả thu kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CYFRA 21-1..... 134
3.2.6. Kết quả tạo KIT định lượng kháng nguyên CYFRA 21-1 140
3.2.7. Kết quả tạo gen kháng thể dạng ghép đặc hiệu CYFRA 21-1 142
3.2.8. Kết quả thử độc tố cấp của kháng thể đặc hiệu CYFRA 21-1 144
3.2.9. Kết luận về nội dung tạo kháng thể đặc hiệu Cyfra 21-1..... 146
3.3. TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU CD33 TRONG UNG THƯ MÁU 148
3.3.1 Tổng quan về ung thư máu và phân loại 148
3.3.2. Ung thư máu liên quan tới sự biểu hiện mạnh CD33 153
3.3.3. Kết quả thu nhận kháng nguyên CD33 157
3.3.4. Kết quả gây miễn dịch động vật thí nghiệm bằng CD33 161
3.3.5. Kết quả thu nhận kháng thể đặc hiệu kháng nguyên CD33 161
3.3.6. Kết quả gắn scFv với hạt nano vàng để tạo Kit định tính 170
3.3.7. Kết quả tạo KIT định lượng kháng nguyên CD33 170
3.3.8. Kết quả tạo gen kháng thể dạng ghép đặc hiệu CD33 176
3.3.9. Kết quả xác định độc tính của kháng thể đặc hiệu CD33 177
3.3.10. Kết quả thử hoạt tính Immunotoxin-CD33 180
3.3.11. Kết luận về nội dung tạo kháng thể đặc hiệu CD33..... 180
3.4. BÀN LUẬN 181
Phần IV. KẾT QUẢ ĐÀO TẠO 191
Phần IV. KẾT QUẢ CÔNG BỐ KHOA HỌC 194

Phần V. KẾT LUẬN 199
Phần Phụ Lục 206
Phục lục 1 206
Phục lục 2 211