

# NGHIÊN CỨU TỐI  U ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN CD20

*Phạm Thu Thùy\**; *Trần Minh Đạo\**  
*Lê Thị Hạnh\*\**; *Lã Thị Huyền\*\**; *Lê Quang Huấn\*\**

## TÓM TẮT

Nghiên cứu góp phần tạo ra lượng lớn kháng thể tái tổ hợp tinh sạch làm nguyên liệu cho những nghiên cứu sâu hơn cho chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư máu có mang chỉ thị phân tử CD20.

Tiến hành nghiên cứu bằng phương pháp biểu hiện gen mã hóa kháng thể kháng CD20 trong tế bào E.coli (BL21); phương pháp điện di protein tiến hành theo Laemmli (1970) và phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp trên cột sắc ký ái lực theo hướng dẫn của hãng Probon cho thấy đã tối ưu được các điều kiện biểu hiện kháng thể tái tổ hợp: nồng độ IPTG, thời gian sau cảm ứng IPTG, mật độ quang học (OD) và nhiệt độ, kết quả kháng thể biểu hiện tốt nhất với các điều kiện: nhiệt độ nuôi cấy 37°C; OD dịch nuôi đạt 0,8 bổ sung IPTG với nồng độ 0,6 mM, 5 giờ sau cảm ứng sẽ thu mẫu. Đã tinh sạch thành công kháng thể tái tổ hợp kháng CD20.

\* Từ khóa: U bạch huyết non-Hodgkin, Kháng nguyên CD20.

## STUDY OF OPTIMIZATION OF EXPRESSING CONDITIONS FOR RECOMBINED SPECIFIC CD20 ANTIBODY

### SUMMARY

*Our study contributed to create huge number of purely recombinant antibody to use as material for further studies such as diagnosis and treatment of blood cancer contented CD20 marker. The technique was used in the study: Expression gene coded anti-CD20 antibody in E.coli (BL21) and protein electrophoresis followed by Laemmli (1970) and recombinant protein purification on affinity chromatography column followed the instruction of Probon Enterprise. Optimized the expressing conditions for recombinant antibody: IPTG concentration, time after inducing IPTG, optical density (OD), temperature. The best expression condition of the antibody was: culture temperature was 37°C; culture solution reached 0,8 supplement IPTG with 0,6 mM concentration after received samples, purified recombinant protein or recombinant antibody anti-CD20.*

*\* Key words: Non-Hodgkin lymphoma; CD20 antibody.*

---

\* Bệnh viện 198

\*\* Viện Công nghệ Sinh học - Viện KH và CN Việt Nam

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

## ĐẶT VẤN ĐỀ

U non-Hodgkin bạch huyết (NHL) là một trong hai loại ung thư máu lymphoma (NHL và Hodgkin lymphoma). NHL có số người mắc bệnh mới và chết cao hơn nhiều so với Hodgkin lymphoma (HL). Theo thống kê năm 2010 - 2011 ở Mỹ [8], có 628.415 người mắc bệnh lymphoma, trong đó 474.880 người mắc NHL, 74.030 trường hợp mới mắc bệnh lymphoma (65.540 NHL và 8.490 HL), số người chết do mắc bệnh lymphoma là 21.530 (1.320 HL; 20.210 NHL).

NHL là ung thư phổ biến thứ 7 ở nước Mỹ và các nước khác trên thế giới. 85 - 90% NHL có nguồn gốc do tế bào B và biểu hiện các chỉ thị kháng nguyên bề mặt tế bào B [4].

CD20 là một phân tử đích tiềm năng trong y học, do kháng nguyên này hầu hết biểu hiện trên tế bào B; mức biểu hiện cao (khoảng 100.000 phân tử/tế bào); không biến dạng hay đồng hóa khi gắn với kháng thể và thường không phát hiện được ở dạng hòa tan [6].

Hiện nay, có nhiều phương pháp điều trị ung thư máu dạng NHL như: xạ trị, hóa chất, ghép tủy, đặc biệt là liệu pháp sinh học. Các liệu pháp sinh học như sử dụng kháng thể đơn dòng (kháng thể tái tổ hợp) đang được đông đảo các nhà khoa học nghiên cứu và đã thu được những kết quả nhất định. Có nhiều phương pháp được áp dụng để tạo ra chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu CD20 như: phương pháp xung điện, phương pháp biến nạp... Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành theo phương pháp biến nạp đưa plasmid tái tổ hợp (pET-22b+/anti-CD20) vào tế bào *E.coli* (BL21) dưới tác dụng của nhiệt và ion  $Ca^{2+}$ .

Tuy nhiên, để có thể thu được lượng kháng thể tái tổ hợp lớn hơn, chúng tôi tiến hành "*Nghiên cứu tối ưu điều kiện biểu hiện và tinh sạch kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20 trong E.coli*", nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo về chẩn đoán và điều trị ung thư máu dạng NHL.

## CHẤT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Chất liệu nghiên cứu.

Chủng vi khuẩn *E.coli* BL21 được sử dụng làm chủng biểu hiện.

Plasmid tái tổ hợp pET-22b (+) đã gắn gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20 (plasmid tái tổ hợp pET-22b (+)/anti-CD20).

Các hóa chất: LB lỏng, LB đặc, IPTG, polyacrylamide; glycerol; comassie blue; APS; SDS,...

### 2. Phương pháp nghiên cứu.

\* *Phương pháp biểu hiện gen ngoại lai trong tế bào E. coli:*

- Lấy 1 khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp cho vào môi trường LB lỏng chứa kháng sinh thích hợp, nuôi lắc 200 vòng/phút, để ở 37<sup>0</sup>C, qua đêm.

- Cấy chuyển sang môi trường LB lỏng chứa kháng sinh với tỷ lệ chủng 2%.

- Nuôi lắc 200 vòng/phút, 37<sup>0</sup>C đến khi OD<sub>600</sub> đạt một độ thích hợp.

- 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 protein, thu mẫu sau cảm ứng.

\* *Phương pháp điện di protein tiến hành theo Laemmli (1970) [7]:*

Phức hợp protein-SDS thu được sau khi biến tính protein bằng SDS 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.

Phát hiện protein trong gel polyacrylamide bằng cách nhuộm với Coomassie Brilliant Blue (CBB) và quan sát thấy bằng mắt thường.

\* *Phương pháp tinh sạch protein:*

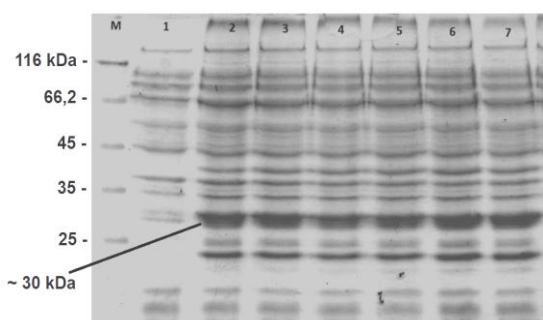
Thiết kế cột sắc ký ái lực  $Ni^{2+}$  để tinh sạch protein tái tổ hợp có chứa gốc histidine. Đây là đuôi Histag được mã hóa bởi bộ ba mã hóa nằm trên vector do nhà sản xuất thiết kế có ái lực mạnh với  $Ni^{2+}$ . Có thể dùng cột sắc ký ái lực Nickel resin để tinh sạch protein tái tổ hợp, biểu hiện trong nhiều loại vật chủ khác nhau.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Tối ưu điều kiện biểu hiện gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20 trong *E.coli*.

\* *Ảnh hưởng của IPTG:*

Nuôi cấy chủng *E.coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22b+/anti-CD20 trong cùng điều kiện. Thí nghiệm này chỉ khác nhau ở nồng độ IPTG được sử dụng để cảm ứng là 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mM. Sau 5 giờ cảm ứng, thu các mẫu và điện di protein kiểm tra kết quả.



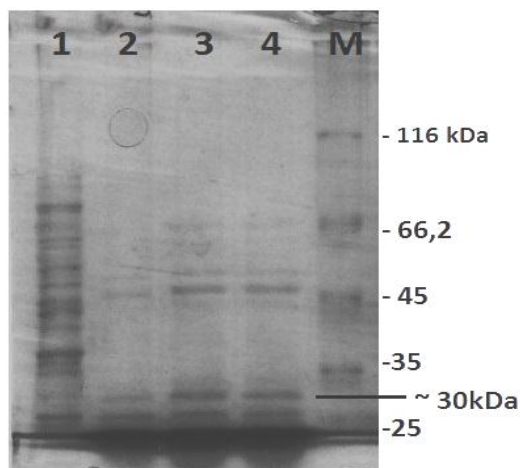
Hình 1: Ảnh hưởng của IPTG đến khả năng biểu hiện của kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20.

M: thang protein chuẩn, 1: protein trước cảm ứng IPTG, 2 - 7: protein được tổng hợp ở các nồng độ IPTG 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mM

Hàm lượng protein tái tổ hợp ở nồng độ IPTG từ 0,5 - 0,6 mM cao hơn ở nồng độ 0,1 - 0,4 mM. Do vậy, chúng tôi chọn nồng độ IPTG 0,6 mM để tối ưu hàm lượng protein.

\* *Khảo sát thời gian thu mẫu sau cảm ứng IPTG:*

Để lựa chọn thời điểm mà tại đó lượng protein được tổng hợp cao nhất, tiến hành khảo sát thời gian thu mẫu sau cảm ứng IPTG khác nhau (sau 2, 5 và 15 giờ). Nuôi cấy tế bào *E.coli* mang plasmid tái tổ hợp trong bình (như mô tả trong phần phương pháp và nồng độ IPTG 0,6 mM). Thu mẫu ở thời điểm 2, 5 và 15 giờ sau cảm ứng. Phân tích kết quả được bằng điện di trên gel polyacrylamide.



Hình 2: Protein tái tổ hợp kháng CD20 được tổng hợp theo thời gian.

M: thang protein chuẩn,

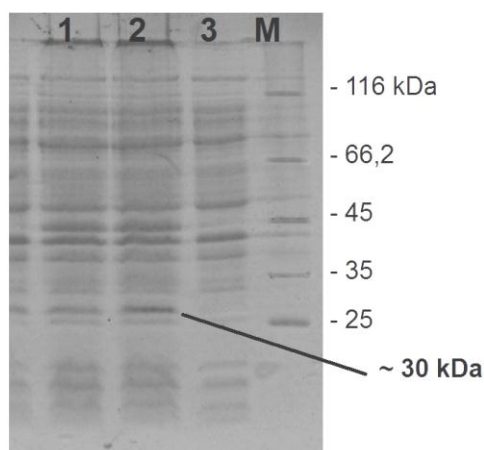
1: protein trước cảm ứng IPTG,

2 - 4: lượng protein tổng hợp tại các thời điểm 2, 5 và 15 giờ

Mẫu thu sau 2 giờ và 15 giờ cho lượng protein ít hơn. Mẫu thu sau 5 giờ cho lượng protein nhiều nhất. Vì vậy, chúng tôi chọn thời điểm tại 5 giờ sau khi cảm ứng để thu mẫu.

\* *Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy:*

Nhiệt độ cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng và biểu hiện protein tái tổ hợp kháng CD20 của chủng *E.coli* BL21 (DE3). Nghiên cứu khả năng biểu hiện của chủng *E.coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22b (+)/*anti-CD20* ở những nhiệt độ nuôi cấy khác nhau (30 - 37°C), trong cùng điều kiện nuôi cấy (kết hợp với thu mẫu sau 5 giờ cảm ứng và nồng độ IPTG 0,6 mM). Kết quả được phân tích bằng điện di polyacrylamid.



Hình 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng biểu hiện gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20.

M: thang protein chuẩn, 3: protein trước cảm ứng IPTG; 1, 2 lượng protein ở nhiệt độ 30°C, 37°C.

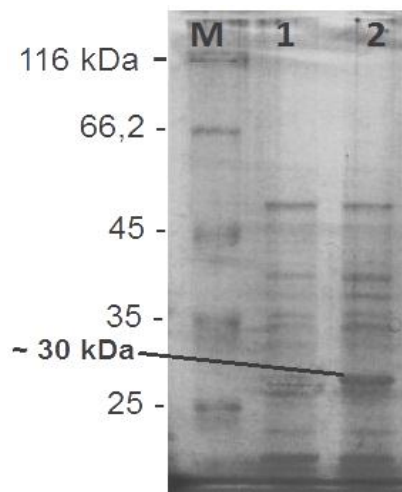
Nhiệt độ có ảnh hưởng đến khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp kháng CD20 của chủng nghiên cứu. Ở nhiệt độ 30°C, băng protein có kích thước ~ 30 kDa xuất hiện mờ, ở nhiệt độ nuôi cấy 37°C, băng protein xuất hiện đậm hơn. Điều đó chứng tỏ nuôi cấy *E.coli* ở 37°C biểu hiện protein tốt hơn ở 30°C.

\* *Ảnh hưởng của mật độ quang học đến khả năng biểu hiện gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20:*

Tế bào *E.coli* mang plasmid tái tổ hợp được nuôi cấy trong 3 bình (kết hợp với điều kiện đã lựa chọn) chỉ khác thời gian nuôi hoạt hóa của bình 1, 2 và 3 lần lượt là 2, 3 và 4 giờ. Sau đó, xác định OD<sub>600</sub> để biết được mật độ quang học của mẫu. Kết quả đo OD<sub>600</sub> như sau: bình 1, 2, 3 có giá trị lần lượt là 0,8; 1,2; 2,0. Tiếp tục bổ sung IPTG và thu mẫu sau 5 giờ cảm ứng. Kết quả được phân tích bằng điện di polyacrylamid cho thấy, mật độ quang học cũng ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp kháng CD20. Cả 3 đường chạy 1, 2, 4 đều xuất hiện băng protein tái tổ hợp kích thước ~ 30 kDa, nhưng nuôi kích hoạt sau 3 giờ, băng protein tái tổ hợp xuất hiện đậm nhất. Như vậy, ở thời điểm OD<sub>600</sub> đạt 1, 2 mức biểu hiện kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu CD20 cao nhất.

\* *Biểu hiện protein tái tổ hợp kháng CD20 ở những điều kiện thích hợp đã lựa chọn:*

Sau khi đã lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp, tiến hành biểu hiện chủng *E.coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp chứa gen mã hóa cho kháng thể đặc hiệu CD20 trong bình nuôi cấy với điều kiện đã lựa chọn (thời gian sau cảm ứng IPTG là 5 giờ, nồng độ IPTG là 0,6 mM, nồng độ OD<sub>600</sub> là 0,8 và nhiệt độ nuôi cấy 37<sup>0</sup>C). Sau đó điện di kiểm tra kết quả.



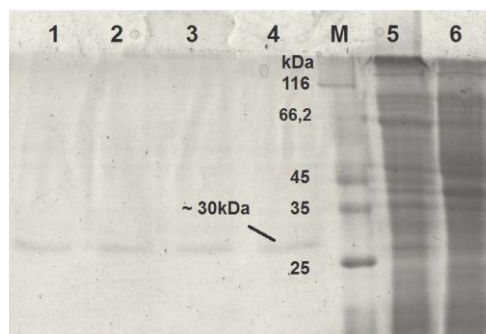
Hình 5: Biểu hiện gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20 ở các điều kiện tối ưu.

M: thang protein chuẩn, 1: protein trước cảm ứng IPTG; 2: protein sau cảm ứng IPTG.

Băng protein ở kích thước ~ 30 kDa xuất hiện rất đậm ở đường chạy số 2, chứng tỏ chủng biểu hiện tốt ở điều kiện nuôi cấy đã lựa chọn.

## 2. Kết quả tinh sạch kháng nguyên kháng CD20.

Protein tái tổ hợp kháng CD20 đã biểu hiện thành công trong tế bào *E.coli* BL21 DE3 (star). Do protein tái tổ hợp có đuôi ái lực 6-histidin, nên protein có đuôi His-Tag này có ái lực với Ni<sup>2+</sup> và bám chặt lên chất giá trên cột. Sau khi rửa cột bằng đệm rửa (Wash Buffer), protein của *E.coli* không có hoặc có ít gốc histidine liên tục sẽ bị trôi khỏi cột, chỉ còn lại protein có ái lực cao với Ni<sup>2+</sup> được giữ lại. Sau đó, sẽ loại ra khỏi cột protein gắn trên cột nhờ elution buffer, chúng tôi thu 4 phân đoạn, mỗi phân đoạn 1 ml.



Hình 6: Kết quả tinh sạch protein tái tổ hợp kháng CD20

M: thang protein 6: trước cảm ứng; 5 sau khi cảm ứng IPTG; 1 - 4: các phân đoạn sắc khí khác nhau.

Sau khi tinh chế, kiểm tra protein bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,5%. Kết quả trên điện di đồ thu được 1 băng protein đặc hiệu có kích thước ~ 30 kDa, chứng tỏ protein tái tổ hợp của CD20 đã được tinh sạch thành công.

## BÀN LUẬN

Vector biểu hiện pET22b (+) là vector được thiết kế cho biểu hiện các gen ngoại lai trong vi khuẩn *E.coli* với nhiều ưu điểm. Vector này được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới và trong nước sử dụng để sản xuất protein tái tổ hợp [1, 2].

*E.coli* là loài vật chủ gram âm được ưa chuộng nhất trong sản xuất protein tái tổ hợp. Một trong những lý do là thao tác kỹ thuật với *E.coli* khá dễ dàng và chuẩn hóa ở mọi phòng thí nghiệm. Thông thường, tất cả các chủng *E.coli* dùng trong biểu hiện đều xuất phát từ chủng *E.coli* K-12 hay B [3].

Với mục đích thu được lượng lớn protein tái tổ hợp kháng CD20, chủng *E.coli* (BL21) chứa plasmid tái tổ hợp (pET22b+/anti CD20) được nuôi cấy trong các điều kiện (nồng độ IPTG, thời gian cảm ứng IPTG, nồng độ vi khuẩn (OD), nhiệt độ nuôi cấy) khác nhau để lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất. Sau đó, chạy điện di mẫu trên gel polyacrylamid để kiểm tra kết quả. Mỗi giếng tra 15  $\mu$ l mẫu để so sánh biểu hiện của kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20 trong những điều kiện khác nhau.

IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside) là chất cảm ứng đối với T7 lac promoter. Promoter này điều khiển trực tiếp quá trình biểu hiện gen mã hóa kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20. IPTG có tác động trực tiếp và rất lớn đến khả năng tổng hợp protein tái tổ hợp [5]. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của dải nồng độ IPTG (từ 0,1 - 0,6 mM) lên biểu hiện kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu CD20.

Mật độ quang học (kí hiệu là OD) cũng ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp protein tái tổ hợp kháng CD20. OD thể hiện hàm lượng tế bào trong môi trường nuôi cấy. Chỉ số OD cao tương ứng với hàm lượng tế bào nhiều. Nếu lượng tế bào quá ít, khi cảm ứng bằng IPTG, lượng protein tái tổ hợp tổng hợp được nhưng ở mức thấp. Nếu lượng tế bào quá nhiều, tức là các tế bào đã bắt đầu chuyển sang giai đoạn suy thoái, khả năng biểu hiện protein ngoại lai kém, do đó lượng protein đích biểu hiện thấp. Vì vậy, để lựa chọn mật độ quang học thích hợp, chúng tôi đã bố trí thí nghiệm về thời gian nuôi hoạt hóa là 2, 3 và 4 giờ. Thời gian nuôi hoạt hóa 3 giờ là hiệu quả nhất.

Sau khi tối ưu được các điều kiện, tiến hành biểu hiện gen ở những điều kiện chuẩn và tinh sạch thành công protein tái tổ hợp.

## KẾT LUẬN

Đã tối ưu được điều kiện biểu hiện kháng thể anti-CD20 trong vi khuẩn *E.coli* chủng BL21 (DE3)Star: nhiệt độ nuôi cấy 37°C; thời điểm cảm ứng OD<sub>600</sub> của dịch nuôi đạt 0,8; nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,6 mM, thu mẫu sau 5 giờ cảm ứng.

Đã tinh sạch thành công protein tái tổ hợp hay kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên CD20.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Lã Thị Huyền*. Nghiên cứu tạo kháng thể tái tổ hợp kháng CD25 để ứng dụng trong y học. Luận án Tiến sĩ Y học. 2009.
2. *Claudia De Lorenzo, Angela Arciello, Rosanna Cozzolino, Donald B. Palmer, Paolo Laccetti, Renata Piccoli, and Giuseppe D'Alessio*. A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res.* 2004. 64, pp.4870-4874.
3. *Escherichia coli*. [http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/Escherichia\\_coli#Laboratory\\_E.\\_coli\\_strains](http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/Escherichia_coli#Laboratory_E._coli_strains). 2010.
4. *Fisher, R. I.* Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Seminars in Oncology.* 2003, 30, pp.3-9.
5. *Fusion Protein Production*. Stockinger Lab. 2001.
6. *Ginaldi, L, De Martinis, M, Matutes, E, Farahat, N, Morilla, R, Catovsky, D.* Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of Clinical Pathology.* 1998, 51, pp.364-369.
7. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227, pp.680-685.
8. The leukemia and lymphoma. Society Fighting Blood Cancer. Facts. 2010-2011.