

THU NHẬN KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ PHỔI, CYFRA 21-1, BẰNG KỸ THUẬT GIEN

LÊ THỊ MINH PHÚC, NGUYỄN XUÂN HƯNG,
LÃ THỊ HUYỀN, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG HIỀN, LÊ QUANG HUÂN

1. GIỚI THIỆU

Ung thư là một thuật ngữ chung chỉ hơn 200 loại bệnh khác nhau gây ra bởi sự tăng sinh quá mức của các tế bào không bình thường. Sự tăng sinh này không tuân theo các cơ chế kiểm soát sinh trưởng của cơ thể. Đó là kết quả của hàng loạt các biến đổi bất thường trong cơ chế sinh sản của tế bào.

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 là *ung thư biểu mô phế quản*. UTP thường được chia làm hai loại chính: **UTP tế bào nhỏ** (small-cell carcinoma hay SCC) và **UTP tế bào không nhỏ** (non small-cell carcinoma hay NSCC), tùy thuộc vào hình dạng tế bào dưới kính hiển vi. Mỗi loại ung thư phát triển và lan theo những cách khác nhau [1, 2, 3, 4].

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 triển 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 hơn UTP tế bào nhỏ (khoảng 80%) và nó thường phát triển và lan chậm hơn và được đặt tên theo loại tế bào từ đó ung thư phát triển: *Ung thư tế bào tuyến* (adenocarcinoma, AC): xuất phát từ tế bào tuyến nhầy trong thành phế quản, chiếm tỉ lệ khoảng 35 - 40% các loại UTP. Đây là dạng UTP phổ biến nhất ở phụ nữ và những người không hút thuốc. *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 tỉ lệ khoảng 30% - 35% các loại UTP. *Ung thư tế bào lớn* (large-cell carcinoma; LCC): hình thành gần bề mặt phổi, chiếm tỉ lệ khoảng 10-15% các loại UTP [5, 6].

Hiện nay, trên thế giới tỉ 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, chiếm tỉ 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%).

Ung thư phổi được chẩn đoán dựa vào các triệu chứng (Ho; ho ra máu; khô khè; hụt hơi; khó chịu trong lúc thở; đau ngực; có các triệu chứng của **bệnh viêm phổi**; khó chịu trong lúc

nuốt; khàn giọng; sụt cân và chán ăn; ngoài ra, có thể có các triệu chứng do di căn, như là tới não, tới xương, ...) và bệnh sử, cũng như tiền sử hút thuốc. Có nhiều phương pháp khác nhau để chẩn đoán ung thư phổi, như là: thử đờm; sinh thiết phổi; nội soi phổi; nội soi trung thất; chọc lấy nước màng phổi; chụp quang tuyến cắt lớp, hoặc/và các phương pháp để phát hiện di căn khi nghi ngờ. Tuy nhiên, nhiều bệnh khác cũng có thể có một số triệu chứng tương tự.

Vì vậy, sử dụng các kháng thể đơn dòng để xác định các kháng nguyên đặc trưng ung thư phổi có ý thực tiễn rất thiết thực. Các kháng nguyên thường được sử dụng trong chẩn đoán ung thư phổi như carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin 19 (CYFRA 21-1), (10), neuron specific enolase (NSE), CA125,... Trong đó các kháng nguyên CYFRA 21-1 và TPA đặc trưng cho ung thư phổi tế bào không nhỏ. Các KIT chẩn đoán tạo ra từ kháng thể đơn dòng đặc hiệu các kháng nguyên này đang được sử dụng để chẩn đoán ung thư phổi [8, 9].

Tuy nhiên, để tạo được kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên đích Cyfra21-1 thì việc thu nhận kháng nguyên này đóng vai trò rất quan trọng. Chính vì vậy, chúng tôi ddawtj nhiệm vụ thu nhận kháng nguyên Cyfra21-1 bằng kỹ thuật gien làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Gien mã hóa cho epitope của kháng nguyên Cyfra 21-1 đã tách dòng trong vector PCR 2.1. Cặp mồi sử dụng; Vector tách dòng PCR 2.1, vector biểu hiện pET-21a(+); Các chủng *E.coli* TOP10, BL21 (DE3). Các enzym *Taq DNA Polymerase*, *NdeI*, *XhoI*,...Ampicillin, X-gal, cao nấm men, Tryptone, Agar, IPTG, Tris-bazơ, EDTA, SDS, EtBr, Chloroform, Isoamylalcohol, Agarose...

Sử dụng các phương pháp trong sinh học phân tử (PCR, cắt gán gen, biến nạp, điện di, ách dòng gen, xác định trình tự nucleotide của các gien đã tách dòng, tinh sạch protein, khối phổ,...) của Sambrook [7].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách dòng đoạn gien mã hóa phần quyết định kháng nguyên của Cyfra 21-1

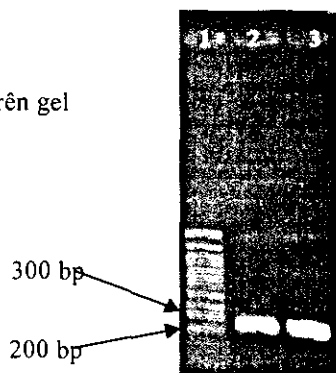
Phản ứng nhân bản gien mã hóa Cyfra 21-1 từ vector PCRđ2.1 được thực hiện với cặp mồi có vị trí nhận biết của các enzym giới hạn *NdeI* và *XhoI* như sau: ExpcyF: 5'–catatgggcaggtcc–3' ExpcyR: 5'–ctcgaggtccatgagccgctgtac–3'

Thành phần của phản ứng gồm: DNA khuôn, dNTPs, mồi EXPCYF và EXPCYR, enzym *Taq-DNA polymerase*, dung dịch đệm, dung dịch $MgCl_2$ nước với tỉ lệ thích hợp trong tổng thể tích 25 μ l. Chu trình nhiệt: 94°C 4 phút; 25 chu kì (94°C 30 giây, 54°C 30 giây, 72°C 60 giây); 72°C 5 phút và lưu ở 4°C.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm phản ứng PCR trên gel agarose ,8% được trình bày trên hình 1.

Hình 1. Kiểm tra kết quả phản ứng PCR trên gel agarose

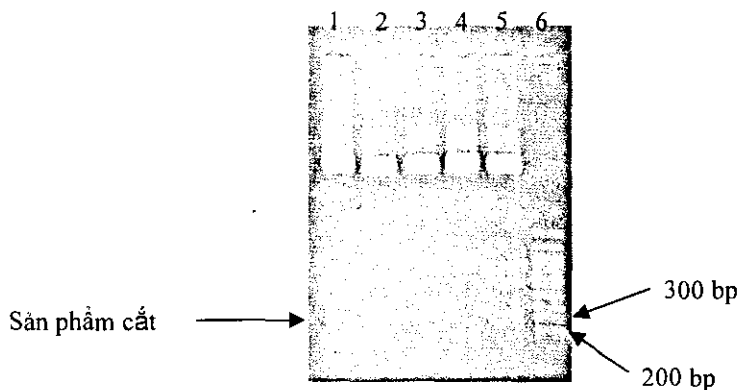
- 1: Thanh DNA chuẩn 100 bp
2, 3: Sản phẩm phản ứng PCR



Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy trên đường chạy số 2 và 3 có một băng sáng đậm với kích thước lớn hơn 200 bp. Kích thước này phù hợp với tính toán lí thuyết. Tuy nhiên, để thuận lợi cho việc gắn vào vectơ biểu hiện và để xác định các vị trí nhận biết của các enzym giới hạn, sản phẩm PCR được gắn vào vectơ tách dòng PCR 2.1. Sau đó, biến nạp vectơ tách dòng vào vi khuẩn *E.coli* chủng TOP 10.

Chọn ngẫu nhiên các chủng biến nạp để tách chiết ADN plasmid mang sản phẩm PCR, kiểm tra các plasmide bằng các enzym giới hạn, chúng tôi đã chọn được các plasmide mang sản phẩm PCR với các vị trí nhận biết của các enzym giới hạn *NdeI* và *XhoI* theo đúng thiết kế (hình 2). Kết quả này còn được khẳng định khi xác định trình tự nucleotide (hình 3).

Trên ảnh điện di ta thấy các plasmid tách chiết từ khuẩn lạc 8, 9, 10 đã được xử lí bằng *NdeI* và *XhoI* đều xuất hiện băng có kích thước tương đương với sản phẩm PCR. Như vậy có thể khẳng định rằng các plasmid đó là sản phẩm PCR với hai vị trí gắn của *NdeI* và *XhoI* đã được gắn vào vectơ tách dòng PCR 2.1.



Hình 2. Kết quả cắt kiểm tra vectơ tái tổ hợp bằng *NdeI* và *XhoI*

Đường chạy 1-5: plasmid của khuẩn lạc số 2, 6, 7, 8, 12 đã xử lí bằng *NdeI* và *XhoI*.

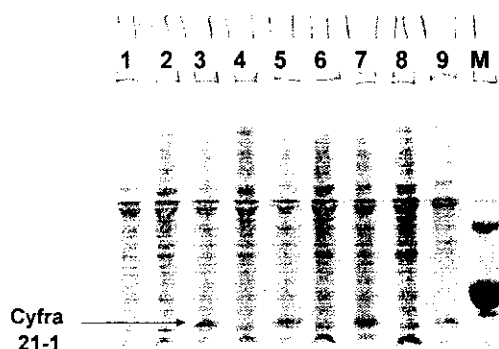
Sản phẩm khuếch đại đoạn gen mã hoá Cyfra21-1 được xác định trình tự nucleotide cụ thể như sau:

CATATGGGCA	GGTCCGAGGT	TACTGACCTG	CGGCGCACCC	TTCAGGGTCT
TGAGATTGAG	CTGCAGTCAC	AGCTGAGCAT	GAAAGCTGCC	TTGGAAGACA
CACTGGCAGA	AACGGAGGCG	CGCTTTGGAG	CCCAGCTGGC	GCATATCCAG
GCGCTGATCA	GCGGTATTGA	AGCCCAGCTG	GGCGATGTGC	GAGCTGATAG
TGAGCGGCAG	AATCAGGAGT	ACCAGCGGCT	CATGGACCTC	GAGCACCACC
ACCACCACCA	CTGA			

Trình tự này có sự tương đồng 100% so với trình tự nucleotide mã hoá cho đoạn Cyfra 21-1 đã được công bố trong Ngân hàng gen quốc tế (số đăng kí AK293479) khi sử dụng phần mềm FASTA. Trình tự amino axit tương ứng là:

MGRSEVTDLRRTLQGLEIELQSQLSMKAALEDTLAETEARFGAQLAHIQALISGIEA
QLGDVRADSERQNEQYQRLMDLEHHHHHH

Đoạn gen mã hoá Cyfra21-1 được gắn vào vectơ pET-21a(+) giữa các vị trí enzym giới hạn *NdeI* và *XhoI* để tạo vectơ biểu hiện. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E.coli* chủng TOP 10 và nuôi cấy trên môi trường có kháng sinh ampicillin. Sau đó, tách ADN plasmid và biến nạp vào chủng vi khuẩn biểu hiện BL21 (DE3), chủng biến nạp BL21(DE3) được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng chứa 100 µ/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 OD₆₀₀ = 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 trước 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 giờ, 3 giờ, 5 giờ và 20 giờ. Tế bào thu tại các thời điểm khác nhau được xử lí để kiểm tra protein bằng điện di trên gel polyacrylamide theo phương pháp của Laemmli [10] (kết quả điện di protein được thể hiện trên hình 3).



Hình 3. Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp

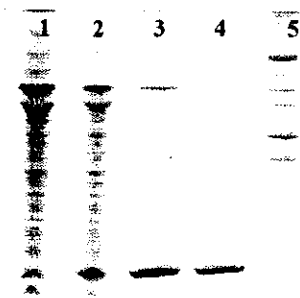
1: Mẫu trước cảm ứng

2, 4, 6, 8: Mẫu trước cảm ứng sau 2 giờ, 3 giờ, 5 giờ và 20 giờ

3, 5, 7, 9: Mẫu cảm ứng bằng IPTG sau 2 giờ, 3 giờ, 5 giờ và 20 giờ

M: lysozyme, 14 kDa

Theo lí thuyết, 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, thì các mẫu không cảm ứng và có cảm ứng được xếp theo cặp cùng thời gian thu mẫu (2 giờ, 3 giờ, 5 giờ, 20 giờ). Từ ảnh điện di ta thấy rằng: ở cùng thời gian thu mẫu thì tất cả các mẫu được cảm ứng bằng IPTG xuất hiện một băng thấp hơn lysozyme rất đậm hơn 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 kí ái lực trên cột Ni-NTA agarose. Kết quả tinh sạch được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide (hình 3).



Hình 3. Sản phẩm protein sau khi tinh sạch trên cột ái lực Ni-NTA
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

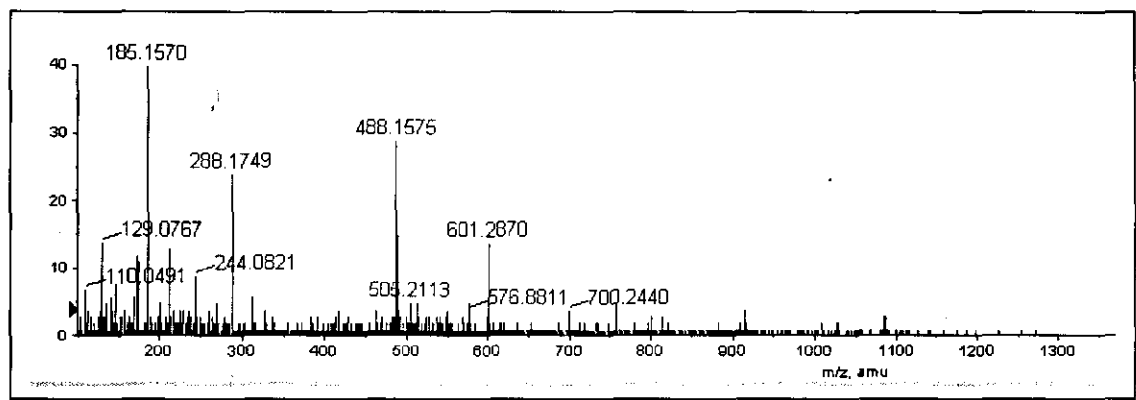
Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm sau khi tinh sạch lần thứ hai trên cột Ni-NTA chỉ xuất hiện một băng với kích thước phân tử lớn hơn 8 kDa. Như vậy có thể sơ bộ kết luận rằng gen Cyfra 21-1 đã được biểu hiện thành công, sản phẩm thu được mang đuôi His-tag. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn chúng tôi đã tiến hành phân tích cấu trúc bậc nhất của sản phẩm bằng kĩ thuật khối phổ.

Bảng 1. Kết quả xử lí đoạn Cyfra21-1 bằng trypsin theo tính toán lí thuyết

Vị trí cắt	Các mảnh peptide nhận được	Số amino axit	Khối lượng
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

Trong qua trình phân tích khối phổ, sản phẩm sẽ được xử lí bởi trypsin. Như vậy nếu sản phẩm sau tinh sạch trên cột sắc kí Ni-NTA mà chúng tôi thu được là Cyfra 21-1 thì khi xử lí với trypsin sẽ được cắt thành các mảnh có kích thước khác nhau. Theo lí 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 Cyfra 21-1 với trình tự các amino axit: MGRSEVTDLRRTLQGLEIELQSQLSMKAALEDTLAETEARFGAQLAHIQALISGIEAQLGDVRADSERQNQEYQRLMDLEHHHHHHH thì khi xử lí với Trypsin ta sẽ nhận được các mảnh peptide với khối lượng tương ứng (bảng 1).

Kết quả phân tích khối phổ được trình bày tại hình 4 và bảng 2



Hình 4. Kết quả phân tích khối phổ

Bảng 2. Kết quả các mảnh peptide nhận được khi phân tích khối phổ

Vị trí cắt	Enzim sử dụng	Trình tự peptide tạo ra sau cắt	Chiều dài peptide	Khối lượng peptide
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		LMDLEHHHHHHH	11	1442.577

Kết quả phân tích khối phổ đã ủng hộ việc biểu hiện thành công gen mã hoá đoạn kháng nguyên Cyfra21-1 đặc hiệu ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ.

4. KẾT LUẬN

Đã thiết kế thành công vector biểu hiện kháng nguyên Cyfra 21-1 tái tổ hợp trên cơ sở vector gốc pET-21a(+) và gen Cyfra 21-1 trong vector tách dòng PCR 2.1.

Đã biểu hiện thành công gen Cyfra 21-1 tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* chủng BL21 (DE3) Star ở điều kiện nhiệt độ 37°C và nồng độ chất cảm ứng IPTG 1 mM.

Tính chính xác của protein biểu hiện được đảm bảo bằng phép phân tích khối phổ.

Đã tinh sạch được protein Cyfra 21-1 với độ tinh sạch cao.

Lời cảm ơn. Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài KC-10.09/06.10 và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ gen của Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Daniel Vanel, David Stark - Imaging Strategies in Ocology, Martin Dunitz Ltd., 1993.
2. Vivian Barak, Helena Goike, Katja W. Panaretakis, Roland Einarsson - Clinical utility of cytokeratins as tumor markers, *Clinical Biochemistry* **37** (2004) 529-540.
3. Grenier J., Pujol J. L., Guilleux F., Daures J. P., Pujol H., Michel F. B. - Cyfra 21-1, a new marker of lung cancer, *Nucl. Med. Biol.* **21** (3) (1994) 471-476.
4. Pierre A Coulombe, M Bishr Omary - Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments, *Cell Biology* **14** (2002) 110-122.
5. Michele R. Stone, Andrea O'Neill, Dawn Catino - Robert J. Bloch, Specific Interaction of the Actin-binding Domain of Dystrophin with Intermediate Filaments Containing Keratin 19, *Molecular Biology of the Cell* **16** (2005) 4280-4293.
6. Kazutaka Dohmoto, Satoko Hojo, Jiro Fujita, Yutaka Ueda, Shuji Bandoh, Yasufumi Yamaji , Yuji Ohtsuki, Naomi Dobashi, Jiro Takahara - Mechanisms of the release of CYFRA 21-1 in human lungcancer cell lines, *Lung Cancer* **30** (2000) 55-63.
7. Sambrook J. - Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2nd ed. cold spring harbor laboratory press, 1989.
8. Stieber, P., et al. - CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer, *Cancer* **72** (1993) 707.
9. William Pao et al. - EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib, *PNAS*. **101** (36) (2004) 13306-13311.
10. Laemmli UK - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227** (1970) 680-685.

SUMMARY

OBTAIN LUNG CANCER ANTIGEN, CYFRA 21-1, BY GENE TECHNOLOGY

Lung cancer belongs to the most leading cancer types in our society and is the cause of the most cancer deaths around the world. "Non-small-cell lung carcinoma" (NSCLC) appears with 70 to 80% of the cases and represents a heterogeneous group of cancers consisting mainly of three kinds of NSC. The early detection of cancer is the most important step to increase the