

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----***-----

Lê Phương Hoàng Anh

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN, TỐI ƯU LÊN MEN VÀ TINH
CHẾ INTERLEUKIN-2 NGƯỜI TÁI TỔ HỢP DẠNG CẢI
BIẾN TRONG *ESCHERICHIA COLI***

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

GS. TS. Trương Nam Hải

Hà Nội 2013

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tới GS. TS. Trương Nam Hải – Trưởng phòng Phòng Kỹ thuật di truyền, Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt thời gian tôi hoàn thành khóa luận.

Tiếp đến tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới các thầy, cô của trường Đại học Thái Nguyên, Viện Sinh thái và Tài Nguyên sinh vật, các thầy, cô của Viện Công nghệ sinh học đã nhiệt tình giảng dạy cho tôi trong suốt thời gian tham gia khóa học.

Tôi xin chân thành cảm ơn toàn thể các cán bộ nghiên cứu, nhân viên của phòng Kỹ thuật di truyền - Viện Công nghệ sinh học và Công ty TNHH Vắc xin và Sinh phẩm số 1 (Vabiotech) trực thuộc Bộ Y Tế-Việt Nam đã tận tình chỉ bảo động viên và cho tôi những lời khuyên quý giá trong công việc cũng như cuộc sống.

Và sau cùng, bằng tình cảm chân thành tôi xin được gửi lời cảm ơn tới người thân và gia đình, những người đã hết lòng ủng hộ và động viên tôi trong suốt thời gian tôi học tập và công tác.

Hà Nội, ngày 02 tháng 12 năm 2013

Học viên cao học

Lê Phương Hoàng Anh

MỤC LỤC

| | |
|---|----|
| MỞ ĐẦU..... | 1 |
| Chương 1 – TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 3 |
| 1.1 Tổng quan về ung thư..... | 3 |
| 1.1.1 Ung thư | 3 |
| 1.1.2 Tình hình ung thư ở Việt Nam và trên thế giới. | 7 |
| 1.1.3 Các phương pháp điều trị ung thư | 10 |
| 1.1.4 Liệu pháp chữa trị ung thư bằng miễn dịch. | 11 |
| 1.2 Interleukin 2..... | 12 |
| 1.2.1 Cấu trúc gene và protein của Interleukin 2..... | 12 |
| 1.2.2 Hoạt tính sinh học. | 13 |
| 1.2.3 Interleukin trong chữa trị ung thư..... | 15 |
| 1.3 Hệ biểu hiện <i>E. coli</i> | 16 |
| 1.3.1 Hệ biểu hiện <i>E. coli</i> BL21. | 17 |
| 1.3.2 Vector biểu hiện pET22b(+). | 18 |
| 1.4 Sắc ký và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) | 20 |
| 1.5 Tối ưu hóa nuôi cấy tăng sản lượng IL-2 bằng phần mềm thiết kế thí nghiệm Design Expert 7.0. | 23 |
| Chương 2 - VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP | 25 |
| 2.1 Vật liệu | 25 |
| 2.1.1 Các chủng vi sinh vật, plasmid | 25 |
| 2.1.2 Hóa chất, enzyme, phần mềm..... | 25 |
| 2.1.3 Máy móc | 25 |
| 2.2 Phương pháp..... | 25 |
| 2.2.1 Tách chiết DNA plasmid từ <i>E. coli</i> | 26 |
| 2.2.2 Điện di DNA trên gel agarose. | 27 |
| 2.2.3 Lên men tạo sản phẩm IL-2 với dòng tế bào vi khuẩn tái tổ hợp <i>E. coli</i> BL21. 27 | |
| 2.2.4 Phương pháp giải trình tự gene..... | 28 |

| | | |
|---------------------------------------|--|----|
| 2.2.5 | Tối ưu hóa điều kiện lên men bằng phần mềm Design expert 7.0. | 28 |
| 2.2.6 | Phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamide..... | 30 |
| 2.2.7 | Phương pháp kiểm tra protein bằng phản ứng đặc hiệu kháng nguyên kháng thể Western Blot. | 31 |
| 2.2.8 | Phá tế bào bằng phương pháp siêu âm và xử lý mẫu protein IL-2 trước khi tinh chế. | 32 |
| 2.2.9 | Tinh chế protein bằng hệ sắc ký đảo pha RP-HPLC. | 33 |
| 2.2.10 | Xác định độ tinh khiết của sản phẩm IL-2 tái tổ hợp sau khi tinh sạch. 33 | |
| 2.2.11 | Phương pháp xác định hàm lượng IL-2 bằng ELISA..... | 34 |
| Chương 3 – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | | 36 |
| 3.1 | Giải trình tự gene mã hóa cho IL-2 đã được cải biến..... | 36 |
| 3.2 | Biểu hiện gene <i>il2</i> trong chủng vi khuẩn tái tổ hợp <i>E. coli</i> BL21..... | 38 |
| 3.3 | Tối ưu điều kiện lên men <i>E. coli</i> sản xuất IL-2 tái tổ hợp dạng cải biến bằng phần mềm design expert. | 39 |
| a. | Khảo sát các yếu tố | 40 |
| b. | Tối ưu bằng phần mềm | 41 |
| 3.4 | Tinh sạch IL-2 từ dòng tế bào <i>E. coli</i> | 46 |
| 3.5 | Xác định độ sạch của mẫu IL-2 sau tinh chế bằng phần mềm Quantity One..... | 48 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... | | 50 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO..... | | 51 |

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| | |
|-------------------|---|
| Bp | base pair (cặp bazơ) |
| IARC | International Agency for Research on Cancer (Cơ quan nghiên cứu Quốc tế về Ung thư) |
| IFN | interferon |
| TNF | tumor necrosis factor (là một cytokine tham gia vào quá trình làm chết tế bào ung thư). |
| Amp | Ampicilin |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| RNA | Ribonucleic acid |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| EtBr | Ethidium bromide |
| IPTG | Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside |
| LB | Luria-betani medium |
| MCS | Multiple cloning site |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| TAE | Tris Acetate EDTA |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate |
| BSA | Bovine serum albumin (Huyết thanh bò) |
| dH ₂ O | distilled water (nước khử trùng) |
| v/p | vòng trên phút. |
| M | mol/L |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

| | |
|--|----|
| Hình 1. 1 Hình ảnh hiển vi biểu thị tế bào ung thư vú và tế bào vú thường..... | 6 |
| Hình 1. 2 Mẫu ung thư tế bào thận RCC giải phẫu. Nhiều tế bào thận bị thay thế bởi tế bào ung thư..... | 8 |
| Hình 1. 3: Ung thư hắc tố da..... | 8 |
| Hình 1. 4 Hai mươi loại ung thư phổ biến..... | 9 |
| Hình 1. 5 Cấu trúc không gian của Interleukin 2..... | 12 |
| Hình 1. 6: Sự kích thích tăng sinh và biệt hóa của IL-2 lên tế bào T..... | 14 |
| Hình 1. 7: Cơ chế hoạt động của Interleukin 2..... | 15 |
| Hình 1. 8: Sơ đồ cấu trúc vector pET22b+..... | 19 |
| Hình 1. 9: Cơ chế kiểm soát biểu hiện gene nhờ chất cảm ứng IPTG..... | 20 |
| Hình 1. 10: Mô hình một hệ thống HPLC..... | 21 |
| Hình 1. 11: Mô hình mô tả sự hấp thụ và thời một đoạn peptide ở pha tĩnh của sắc ký đảo pha. | 22 |
| Hình 2. 1: Công cụ RSM-CCD của phần mềm thiết kế thí nghiệm Design Expert 7.0..... | 29 |
| Hình 3. 1: Kết quả điện di kiểm tra plasmid trên gel Agarose..... | 37 |
| Hình 3. 2: Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện IL-2 của một số dòng tế bào vi khuẩn tái tổ hợp mang plasmid pET22-IL-2..... | 39 |
| Hình 3. 3: Sơ đồ tối ưu lên men vi khuẩn tái <i>E. coli</i> tái tổ hợp sản xuất IL-2..... | 40 |
| Hình 3.4: Sơ đồ biểu thị kết quả khảo sát ảnh hưởng của từng nhân tố riêng rẽ (nhiệt độ biểu hiện, thời gian biểu hiện, nồng độ chất cảm ứng IPTG) của dòng tế bào tái tổ hợp <i>E. coli</i> B121 mang vector biểu hiện pET22b-IL-2..... | 41 |
| Hình 3. 5: Chi tiết thiết kế và hàm lượng IL-2 của sau khi thực hiện 20 thí nghiệm..... | 42 |
| Hình 3. 6: Kết quả tiến hành 20 thí nghiệm đánh giá bằng phương pháp ELISA và điện di SDS– PAGE..... | 43 |
| Hình 3. 7: Đồ thị mô hình 20 thí nghiệm của phần mềm Design Expert 7.0..... | 44 |
| Hình 3. 8: Kết quả biểu hiện các dự đoán mà phần mềm đưa ra..... | 45 |
| Hình 3. 9: Kết quả tiền xử lý tinh chế phá tế bào thu dịch thô IL-2..... | 47 |
| Hình 3. 10: Kết quả tinh chế IL-2 bằng hệ thống sắc ký lỏng cao áp HPLC..... | 48 |
| Hình 3. 11: Xác định thành phần độ tinh khiết của protein..... | 49 |

DANH MỤC CÁC BẢNG

| | |
|---|----|
| Bảng 1. 1 Một số oncogene và tumor suppressor genes liên quan đến ung thư ở người | 4 |
| Bảng 2.1 Công thức chế 1 bản gel acrylamide..... | 30 |
| Bảng 3. 1: Điều kiện biểu hiện của các giải pháp mà phần mềm đưa ra nhằm tìm ra điều kiện tối ưu cho lên men..... | 45 |
| Bảng 3. 2: Thông số phân tích băng protein xác định độ tinh khiết của sản phẩm bằng phần mềm Quantity One | 49 |

MỞ ĐẦU

Cytokine là một sản phẩm trong hệ miễn dịch, được nhiều loại tế bào tiết ra. Về chức năng chúng có tác dụng đa hướng, đa năng và tác dụng ngược trở lại chính tế bào tiết ra chúng. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng cytokine có sự liên quan không chỉ với nguyên nhân gây ra ung thư mà còn liên quan tới khả năng chữa trị các bệnh ung thư này. Việc lựa chọn đúng các yếu tố liên quan đến quá trình hình thành và phát triển ung thư mang tính quyết định đến việc sử dụng cytokine trong điều trị bệnh. Hiện nay có nhiều loại cytokine được phát triển thành các dược phẩm thương mại. Trong số đó Interleukin-2 người tái tổ hợp là một trong những loại cytokine được thương mại hóa sớm nhất và được cấp phép sử dụng bởi cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ (US Food and Drug Administration-FDA) cấp phép sử dụng trong điều trị (1992). IL-2 có khả năng chữa trị ung thư vú, ung thư phổi,... và đặc biệt là hai loại ung thư hắc tố da và ung thư biểu mô tế bào thận.

Trước đây để có được IL-2 tinh khiết sử dụng trong điều trị, sản phẩm này thường được tách chiết từ các dòng tế bào T tự nhiên hay bằng việc nuôi cấy các tế bào động vật, ví dụ như tế bào ung thư hạch bạch huyết dòng Daudi. Mặc dù vậy IL-2 sản xuất theo con đường này có một số hạn chế đó là lượng IL-2 tách chiết ra thấp không đáp ứng đủ nhu cầu, hoạt tính sinh học riêng khá thấp (10^5 đến 10^6 U/mg), và thường tạo thành sản phẩm có dạng glycosyl hóa cao, tạo hiệu ứng không mong muốn tới sản phẩm khi sử dụng trong điều trị. Do vậy hướng tạo IL-2 người bằng công nghệ mới hơn là Công nghệ DNA tái tổ hợp đã được mở ra nhằm tạo ra được lượng lớn IL-2.

Trên thế giới, sản phẩm IL-2 thương mại chủ yếu được sản xuất dựa trên công nghệ DNA tái tổ hợp. Sản phẩm thương mại Proleukin (Aldesleukin) của công ty Chiron (Hoa Kỳ) sản xuất nhờ biểu hiện trong vi khuẩn *Escherichia coli* là một ví dụ. Trong quá trình sản xuất nhằm tăng hoạt tính và tăng tính an toàn cho sản phẩm trình tự amino acid của IL-2 đã được cải biến. Tên hóa học của sản phẩm là des-alanyl-1, serein-125 human interleukin-2 mang ý nghĩa đột biến mất alanine ở vị trí

amino acid số 1, thay thế Cysteine ở vị trí 125 bằng Serine. Hiện nay công ty Chiron đang bán IL-2 tái tổ hợp với giá 680 USD/mg.

Tại Việt Nam, việc sử dụng IL-2 tái tổ hợp nói riêng và sản phẩm protein tái tổ hợp sử dụng trong điều trị nói chung vẫn còn đang bị bỏ ngỏ. Mặc dù việc nghiên cứu về DNA tái tổ hợp đã được phát triển từ hơn 10 năm trở lại đây song vẫn chưa có sản phẩm tái tổ hợp nào được triển khai áp dụng hoàn toàn quá trình nghiên cứu đến quá trình sản xuất. Ngoài ra sản phẩm Proleukin đã hết hạn bảo hộ độc quyền, do đó đây là một cơ hội để chúng tôi có thể nghiên cứu và tạo được sản phẩm Interleukin-2 người tái tổ hợp của Việt Nam, dùng trong điều trị ung thư với hi vọng sản phẩm đạt chất lượng tốt và giá thành rẻ hơn so với sản phẩm nhập khẩu. Chính vì vậy trong nghiên cứu của mình chúng tôi thực hiện đề tài: “**Nghiên cứu biểu hiện, tối ưu lên men và tinh chế IL-2 người tái tổ hợp dạng cải biến trong *E. coli***” nhằm tạo ra được một sản phẩm Interleukin-2 có trình tự amino acid giống với sản phẩm Proleukin đã được FDA Hoa Kỳ công nhận, có khả năng chữa ung thư. Mục tiêu của đề tài là nâng cao năng suất tổng hợp cũng như tinh sạch IL-2 dạng cải biến với chi phí thấp để có thể đưa sản phẩm IL-2 người tái tổ hợp tiêu thụ trên thị. Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Dự án: “**Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất Interleukin-2 người tái tổ hợp trên dòng tế bào *E. coli***” Mã số KC.04.DA02/11-15, và được ứng dụng kết quả thu được từ nghiên cứu và triển khai của các đề tài:

- (1) Đề tài khoa học công nghệ cấp Nhà nước: “*Nghiên cứu tạo Interleukin-2 tái tổ hợp dùng cho điều trị ung thư*” (Mã số: KC.04.33) do Viện Công nghệ sinh học chủ trì, giai đoạn 2005-2007.
- (2) Đề tài khoa học công nghệ cấp Nhà nước: “*Nghiên cứu đánh giá hiệu lực của Interleukin-2 tái tổ hợp sản xuất tại Việt Nam dùng trong hỗ trợ điều trị ung thư*” (Mã số: KC.04.21/06-10) do Viện Công nghệ sinh học chủ trì, giai đoạn 2009-2010.

Chương 1 – TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Tổng quan về ung thư

1.1.1 Ung thư

Ung thư từ lúc bắt đầu hình thành đến lúc xuất hiện trải qua nhiều bước, nhiều chu trình trao đổi chất và hoạt động bất thường. Các khối u ác tính hay còn gọi là ung thư được biểu thị bởi các đặc tính: phát triển không ngừng, không theo mục đích, không theo mong muốn, không kiểm soát và phá hoại, ức chế quá trình sinh trưởng của các tế bào thường [17].

Tất cả sinh vật đều được tạo ra từ các tế bào sống, các tế bào này cần phải được phân chia và tăng sinh về số lượng trong thời kỳ sinh trưởng và phát triển cũng như để thay thế các tế bào đã chết hoặc bị phá hủy. Quá trình đó người ta gọi là chu trình tế bào (hay còn gọi là sự phân chia tế bào và sự sinh trưởng của tế bào). Quá trình này thường được điều khiển bởi các gene nằm trong DNA trong nhân tế bào. Những gene này được di truyền từ bố mẹ và tế bào được thừa hưởng những đặc tính riêng biệt bao gồm kích thước, màu sắc, trọng lượng và những kiểu hình. Khi ở trạng thái bình thường các quá trình phát triển của tế bào trong mô được kiểm soát rất cân bằng. Dạng ung thư sẽ được tạo thành khi sự kiểm soát bằng di truyền bị mất hoặc bị phá hủy trong một hoặc nhiều tế bào, từ đó các tế bào dạng ung thư tiếp tục phân chia nhiều lần và phát triển. Lượng lớn các tế bào phân chia không theo chu trình đó sẽ gây hại đến các tế bào và mô bình thường của cơ thể, mất kiểm soát dừng phân chia, đó chính là ung thư. Nguyên nhân gây ra ung thư mà chúng ta biết đến bây giờ bao gồm nguyên nhân trực tiếp hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến các gene điều khiển quá trình phân chia tế bào [37]. Những tế bào bình thường có cơ chế giúp dừng quá trình phân chia. Tế bào ở những mô như mô da, máu hoặc dòng tế bào ở miệng, cổ họng hay ở dạ dày có thời gian sống ngắn nên việc phân chia xảy ra thường xuyên và luôn luôn phải được thay thế mới. Tương tự như vậy, sau khi bị chấn thương, hay bệnh tật thì có một số tế bào bị chết, các tế bào xung quanh chỗ bị