

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----o0o-----

LUẬN VĂN THẠC SĨ

**THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN BƯỚC ĐẦU ĐỊNH HƯỚNG BIỆT HÓA
TẾ BÀO GỐC CUỒNG RỒN THÀNH TẾ BÀO GAN**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số : 60420114

Học viên: Lê Bắc Việt

Lớp: K16-Sinh học

GVHD: TS. Nguyễn Huy Hoàng

Hà Nội, tháng 12 năm 2014

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu - ĐHTN

<http://www.lrc-tnu.edu.vn/>

LỜI CẢM ƠN

Em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Huy Hoàng – Trưởng Phòng Hệ gen học chức năng - Viện Nghiên cứu hệ gen, người thầy - người anh đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ và chia sẻ những khó khăn cùng em trong suốt quá trình làm việc và hoàn thành luận văn.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn đặc biệt đến TS. Nguyễn Văn Hạnh và Ths. Vi Đại Lâm, cán bộ Phòng Công nghệ phôi – Viện Công nghệ sinh học đã luôn theo sát giúp đỡ và chỉ bảo cho em trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm. Qua đây, em cũng rất biết ơn tất cả các cô, các chị thuộc Phòng Hệ gen học chức năng và Phòng Công nghệ phôi đã chỉ bảo em rất nhiều điều trong thời gian thực hiện viết luận văn tốt nghiệp.

Em cũng chân thành cảm ơn các thầy, các cô giáo tham gia giảng dạy tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền đạt cho em những kiến thức bổ ích trong suốt hai năm học qua.

Cuối cùng, em xin gửi những lời tri ân tới bố mẹ, những người thân trong gia đình và bạn bè xung quanh đã chia sẻ những khó khăn thử thách trong cuộc sống và công việc để em có được kết quả này.

Em xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2014

Học viên

Lê Bắc Việt

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH VÀ BẢNG BIỂU	vii
MỞ ĐẦU.....	1
PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1. TẾ BÀO GỐC	4
1.1. Định nghĩa tế bào gốc	4
1.2. Các đặc tính của tế bào gốc.....	4
1.3. Phân loại tế bào gốc	4
1.3.1. Phân loại tế bào gốc theo khả năng biệt hóa.....	5
1.3.2. Phân loại tế bào gốc theo vị trí thu nhận	5
1.3.3. Phân loại khác	7
1.4. Lợi ích của tế bào gốc dây rốn so với các nguồn tế bào khác.....	8
1.5. Tế bào gốc trung mô (TBGTM) phân lập từ lớp Wharton-Jelly (WJ) dây rốn (hWJSCs-human Wharton-Jelly Stem Cells).....	9
1.5.1. Cấu tạo dây rốn.....	9
1.5.2. Các nghiên cứu về phương pháp phân lập, nuôi và biệt hóa hWJSCs	10
1.5.2.1. Nghiên cứu về các phương pháp phân lập và nuôi cấy hWJSCs	10
1.5.2.2. Các nghiên cứu về biệt hóa hWJSCs.....	12
1.5.3. Các chỉ thị phân tử của hWJSCs.....	14
1.5.4. Tính ổn định di truyền của TBG và phương pháp xác định tính ổn định di truyền	14
1.6 Biệt hóa tế bào gốc bằng chuyển gen.....	15
1.6.1 Gen <i>HNF-4α</i>	16

1.6.2 Biệt hóa tế bào gốc trung mô bằng chuyển gen.....	17
PHẦN II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.1 Đối tượng nghiên cứu.....	20
2.1.1 Nguyên liệu.....	20
2.1.2 Thiết bị.....	20
2.1.3 Hóa chất.....	21
2.2 Phương pháp nghiên cứu.....	22
2.2.1 Thu nhận và xử lý dây cuống rốn.....	22
2.2.2 Phân lập tế bào gốc trung mô cuống rốn.....	24
2.2.2.1 Phương pháp phân lập tế bào.....	24
2.2.2.2 Phương pháp cấy chuyển tế bào.....	24
2.2.2.3 Phương pháp nhuộm sắc thể.....	25
2.2.3 Tách chiết RNA tổng số.....	25
2.2.4 Định lượng RNA trong mẫu tách chiết.....	26
2.2.5 Điện di trên gel agarose.....	27
2.2.6 Khuếch đại trình tự mã hóa (CDS) của gen <i>HNF-4α</i> bằng RT-PCR.....	28
2.2.7 Tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn.....	29
2.2.8 Nhân dòng trình tự mã hóa của gen <i>HNF-4α</i> và đọc trình tự.....	30
2.2.9. Biến nạp vào tế bào <i>E.coli</i> DH5 α	31
2.2.10 Thiết kế vector chuyển gen biểu hiện trong TBGTM.....	32
2.2.11 Nhiễm (transfection) vector tái tổ hợp vào TBGTM cuống rốn.....	33
2.2.12 Kiểm tra khả năng biểu hiện của các chỉ thị trong tế bào gốc.....	33

PHẦN III. KẾT QUẢ VÀO THẢO LUẬN.....	34
3.1 Phân lập và nuôi cấy tế bào.....	34
3.2 Phân tích nhiễm sắc thể TBGTM.....	37
3.3 Tách chiết RNA tổng số.....	39
3.4 Định lượng RNA tổng số	40
3.5 Đánh giá đặc tính di truyền của TBGTM sau phân lập bằng RT-PCR.....	41
3.6 Khuếch đại trình tự mã hóa (CDS) của gen <i>HNF-4α</i>	45
3.7 Nhân dòng trình tự mã hóa của gen <i>HNF-4α</i> và đọc trình tự	47
3.7.1 Nhân dòng trình tự mã hóa của gen <i>HNF-4α</i>	47
3.7.2 Kết quả phân tích trình tự gen	49
3.8 Thiết kế vector chuyển gen biểu hiện trong TBGTM.....	50
3.9 Đánh giá hiệu quả của quá trình chuyển gen	51
PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	55
4.1 Kết luận	55
4.2 Kiến nghị.....	55
PHẦN V. TÀI LIỆU THAM KHẢO	56
PHỤ LỤC	61

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
cDNA	Complement deoxyribonucleic acid
Bp	Base pair
Kb	Kilo base
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CHT	Collagenase / hyaluronidase trypsin
CT	Collagenase/ trypsin
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham 12 medium
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EGF	Epidermal growth factor
FBS	Fetal bovine serum
HSC	Hemapoietic stem cell
hWJSCs	Tế bào gốc phân lập từ lớp Wharton's jelly dây rốn người
ICM	Inner cell mass
IVF	<i>In vitro</i> fertilization
ITS	Insulin – transferin - selenium
ICSI	Intracytop plasmide sperm injecti
TBGTM	Tế bào gốc trung mô
RT – PCR	Reverse-transcription Polymerase chain reaction
TBG	Tế bào gốc
WJ	Wharton's jelly
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultra violet (tia cực tím)
CDS	Coding sequence (trình tự mã hóa)
TAE	Tris-axit axetic-EDTA
OD	Optical density (mật độ quang)
NST	Nhiễm sắc thể
hUCM	human Umbilical Cord Matrix

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH VÀ BẢNG BIỂU

Hình 1	Cấu tạo của dây rốn
Hình 2	Cấu trúc vector biểu hiện pCMV-GFP
Hình 3	Mẫu dây rốn trước khi xử lý
Hình 4	Phân lập mảnh mô dây rốn trên đĩa nuôi
Hình 5	Tế bào bắt đầu mọc từ đĩa nuôi không bổ sung FBS
Hình 6	Tế bào phát triển thành những mảng song song, cuộn xoắn và gói lên nhau
Hình 7	Tế bào mọc kín đĩa nuôi
Hình 8	Nhiễm sắc thể ở lần cấy chuyển thứ 2
Hình 9	Điện di đồ tách chiết RNA tổng số
Hình 10	Điện di đồ RT-PCR mẫu TBGTM sau phân lập (A) và đối chứng dương – tế bào gốc ung thư gan (B)
Hình 11	Điện di đồ RT-PCR khuếch đại CDS của gen <i>HNF-4α</i>
Hình 12	Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid pTZ57R/T tái tổ hợp bằng <i>EcoRI</i>
Hình 13	Trình tự được đọc bằng môi vector (T7 promoter và T7 terminator)
Hình 14	Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid pCMV-GFP tái tổ hợp bằng <i>NheI</i> và <i>EcoRI</i>
Hình 15	Điện di đồ RT-PCR mẫu nuôi cấy 4 tuần sau chuyển gen
Bảng 1	Trình tự oligonucleotide các môi được sử dụng
Bảng 2	Thành phần phản ứng RT-PCR khuếch đại CDS gen <i>HNF-4α</i>
Bảng 3	Thành phần phản ứng gắn nhãn dòng CDS gen <i>HNF-4α</i>
Bảng 4	Thành phần phản ứng cắt với enzyme <i>NheI</i> và <i>EcoRI</i>
Bảng 5	Kết quả đo mật độ quang (OD) của các mẫu RNA tách chiết
Bảng 6	Thống kê biểu hiện của các chỉ thị phân tử trong tế bào gốc
Bảng 7	Sự biểu hiện của các chỉ thị phân tử trong TBGTM sau các lần cấy chuyển

MỞ ĐẦU

Tế bào gốc (TBG) là tế bào tiềm năng trong cơ thể. Khả năng biệt hóa cho phép TBG có thể phân chia phát triển thành tất cả các loại tế bào chuyên hóa. Với đặc điểm này, TBG có thể được khai thác với nhiều ứng dụng.

Nhiều nghiên cứu ứng dụng TBG trong lĩnh vực y sinh học đã được thực hiện nhằm điều trị các bệnh nan y khác nhau như: tiểu đường, liệt do chấn thương tuỷ sống, suy tim do tổn thương cơ tim, một số bệnh ung thư và bệnh lý gen.... Đặc biệt, trong chuyên khoa huyết học, TBG có thể điều trị trên 70 loại bệnh lý huyết học khác nhau liên quan đến tổn thương cơ quan tạo máu, một số bệnh di truyền bẩm sinh về chuyển hoá và suy giảm miễn dịch, ung thư máu.... TBG còn được sử dụng trong các chuyên ngành khác như: thẩm mỹ, trong nghiên cứu dược lý [39,40]. Nói cách khác, TBG mở ra một hướng phát triển, biện pháp chữa trị mới với những căn bệnh đến giờ vẫn vô phương cứu chữa, thấp sáng hy vọng về tiềm năng y học của kỹ thuật tái sinh.

Trước đây, nguồn TBG sử dụng cho các nghiên cứu chủ yếu là TBG phôi [1]. Nhưng vì phải lấy các TBG này từ phôi cho nên phần lớn các Giáo hội công giáo và chính trị gia đã phản đối gay gắt vì cho rằng đây là vấn đề xâm phạm đến đạo đức, niềm tin tôn giáo [1]. Để tìm hướng giải quyết mới cho vấn đề này, các nhà khoa học đã tìm ra TBG từ nhiều nguồn khác nhau, trong đó có TBG từ người trưởng thành. TBG trưởng thành là TBG đa năng, có khả năng biệt hóa thành nhiều dòng tế bào khác nhau. Tuy nhiên, việc thu thập TBG gặp phải khó khăn khi lượng tế bào thu được rất ít, có thể ảnh hưởng đến sức khỏe, già và khó biệt hóa [2]. Người ta cũng đã tìm thấy một loại TBG đa năng trong dây rốn của trẻ sơ sinh (TBG nhũ nhi), đây được cho là một phát hiện quan trọng vì có thể thu thập TBG từ dây rốn - vốn được coi là một loại rác thải y tế [2].

TBG dây rốn cũng có đầy đủ tính chất của một TBG đa năng như TBG tủy xương (TBG tủy xương thuộc loại TBG trưởng thành) [11]. Hiệu quả ứng dụng trong lâm sàng cao hơn vì việc thu thập TBG dây rốn khá dễ dàng, an toàn, không ảnh hưởng đến sức khỏe của mẹ và con, có thể chủ động kiểm soát tình trạng nhiễm các bệnh truyền nhiễm như HIV, viêm gan B, viêm gan C qua việc xét nghiệm trước sinh đối với sản phụ,... (<http://www.baomoi.com/Thai-phu-luu-y-Te-bao-goc-tu-day-ron-la-gia-tri-nhat/82/11092699.epi>). Bên cạnh đó, tế bào gốc có khả năng biệt hóa và khả năng tự làm mới. Biệt hóa là khả năng tạo ra các tế bào chuyên hóa trong cơ thể trong khi tự làm mới là quá trình duy trì tính gốc không đổi qua các thế hệ tế bào [3][35]. Nhờ đó, biệt hóa tế bào gốc thành các dạng tế bào chuyên hóa khác đang là hướng nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng cao. Gần đây, một số nghiên cứu biệt hóa các tế bào gốc cuống rốn thành tế bào gan đã mở ra hy vọng cho hàng trăm triệu bệnh nhân viêm gan và ung thư gan [4,5]. Tuy nhiên, cho đến nay, cơ chế chính xác của quá trình biệt hóa thành từ TBGTM cuống rốn thành tế bào gan vẫn cần phải được làm rõ hơn. Bên cạnh những tác nhân môi trường trong các môi trường biệt hóa tế bào gốc như dexamethasone hay yếu tố sinh trưởng như FGF (fibroblast growth factor) [41], một số yếu tố phiên mã, ví dụ như gen *HNF-4 α* , cũng đang được tập trung nghiên cứu. Từ đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài **“Thiết kế vector biểu hiện bước đầu định hướng biệt hóa tế bào gốc cuống rốn thành tế bào gan”** để hoàn thiện quy trình thiết kế vector biểu hiện và chuyển vector vào tế bào gốc cuống rốn bước đầu biệt hóa thành tế bào gan phục vụ cho các nghiên cứu sau này. Để hoàn thành được đề tài này, chúng tôi cần thực hiện những mục tiêu như sau:

1. Phân lập và nuôi cấy TBGTM từ mẫu cuống rốn.
2. Nhân dòng trình tự mã hóa gen *HNF-4 α* ở người và tái tổ hợp trong vector biểu hiện trong tế bào động vật.

3. Kiểm tra khả năng biểu hiện của *HNF-4 α* trong TGBTM sau chuyển gen

Cuối cùng, nghiên cứu được thực hiện trích kinh phí từ đề tài “*Derivation of hepatocyte-like cells from human umbilical cord matrix stem cell by HNF-4 α transfection*” do quỹ TWAS, và đề tài nghiên cứu cơ sở cấp cho TS. Nguyễn Văn Hạnh.