

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



Nguyễn Thị Minh Thu

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT INTERLEUKIN-2 NGƯỜI TÁI TỔ HỢP
DẠNG CẢI BIẾN TRÊN DÒNG TẾ BÀO *ESCHERICHIA COLI*
TRONG ĐIỀU KIỆN GMP

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, 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan toàn bộ kết quả trong khóa luận là do chính tôi trực tiếp thực hiện.

Các số liệu và kết quả được công bố trong khóa luận là hoàn toàn trung thực, chính xác và chưa được công bố ở bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2015

Học viên cao học

Nguyễn Thị Minh Thu

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới **GS. TS. Trương Nam Hải** và **TS. Phùng Thu Nguyệt**, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt thời gian tôi học tập và nghiên cứu.

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 gia đình và bạn bè, những người đã hết lòng ủng hộ và động viên tôi trong suốt thời gian tôi học tập và công tác.

Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2015

Học viên cao học

Nguyễn Thị Minh Thu

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC HÌNH	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tình hình ung thư ở Việt Nam và trên thế giới	4
1.2. Các phương pháp điều trị ung thư	5
1.3. Tổng quan về Interleukin-2	6
1.3.1. Cấu trúc của Interleukin-2	6
1.3.2. Cơ chế hoạt động và chức năng sinh học của Interleukin-2	8
1.3.3. Vai trò của Interleukin-2 trong điều trị ung thư	9
1.4. Hệ biểu hiện <i>E. coli</i>	12
1.4.1. Hệ biểu hiện <i>E. coli</i> BL21	13
1.4.2. Vector biểu hiện pET22b(+)	14
1.4. Lên men sản xuất protein tái tổ hợp trên hệ thống lên men Bioreactor	16
1.4. Tinh sạch protein bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao	17
1.5. Xác định hoạt tính sinh học của IL-2 trên dòng tế bào CTLL2	19
1.6. Phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GMP	20
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Vật liệu nghiên cứu	22
2.1.1. Chủng giống và plasmid	22
2.1.2. Hóa chất	22
2.1.3. Máy móc và thiết bị	22
2.1.4. Các môi trường và dung dịch	24
2.1.4.1. Môi trường sử dụng trong biểu hiện protein	24
2.1.4.2. Dung dịch sử dụng trong tiền tinh chế protein Interleukin-2	24
2.1.4.3. Dung dịch sử dụng trong chạy hệ thống sắc ký HPLC	24

2.1.4.4. Dung dịch sử dụng trong điện di SDS - PAGE	24
2.1.4.5. Dung dịch sử dụng để hiện kết quả điện di SDS – PAGE.....	25
2.1.4.6. Dung dịch sử dụng trong phản ứng Western blot	26
2.1.4.7. Dung dịch sử dụng trong phương pháp ELISA.....	26
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.2.1. Biểu hiện protein Interleukin-2 tái tổ hợp trong tế bào <i>E. coli</i> ở các hệ thống lên men 5 và 10 lít	27
2.2.2. Phá tế bào <i>E. coli</i> và xử lý IL-2 thô (tiền tinh chế).....	27
2.2.3. Tinh chế IL-2 bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC	28
2.2.4. Xác định hoạt tính sinh học protein Interleukin-2 trên dòng tế bào CTLL2 ..	29
2.2.5. Kiểm tra tính đặc hiệu của protein bằng phương pháp Western blot.....	32
2.2.6. Kiểm tra độ sạch bằng phần mềm Quantity One	33
2.2.7. Kiểm tra nội độc tố bằng LAL kit.....	33
2.2.8. Xác định hàm lượng protein trong mẫu tinh chế bằng phương pháp ELISA .	34
2.2.9. Điện di SDS-PAGE	35
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	37
3.1. Tối ưu lên men chủng <i>E. coli</i> BL21 IL-2 trên quy mô nồi lên men 5 và 10 lít .	38
3.1.1. Lên men chủng <i>E. coli</i> BL21-IL2 trong hệ thống lên men 5 lít.....	38
3.1.2. Khảo sát thành phần dinh dưỡng và nồng độ chất cảm ứng	39
3.1.3. Lên men chủng <i>E. coli</i> BL21-IL2 ở quy mô hệ thống lên men 10 lít đợt 1	42
3.1.4. Lên men chủng <i>E. coli</i> BL21-IL2 ở hệ thống lên men 10 lít đợt 2	46
3.2. Xử lý tiền tinh chế thu hồi IL-2 từ sinh khối tế bào lên men.....	49
3.3. Tinh chế IL-2 bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC	50
3.4. Xác định hoạt tính sinh học của IL-2 trên dòng tế bào CTLL2	53
3.5. Xác định độ tinh sạch của protein IL-2 tái tổ hợp sau tinh chế bằng phần mềm Quantity One	55
3.6. Xác định hàm lượng nội độc tố trong sản phẩm IL-2 sau tinh chế.....	57
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	59
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN	65

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfate
AU	Absorbance unit
BSA	Bovine serum albumin (Albumin huyết thanh bò)
CSE	Control standard endotoxin (Nội độc tố chuẩn)
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (Tế bào gây độc)
dH ₂ O	Distilled water (nước khử trùng)
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dOT	Dissolved oxygen tension
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Kỹ thuật chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym)
FBS	Fetal Bovine Serum (Huyết thanh thai bò)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IL-2R	Interleukin-2 Receptor (Thụ thể của IL-2)
kDa	KiloDalton
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium
PBS	Phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
rhIL-2	Recombinant human Interleukin-2 (IL-2 người tái tổ hợp)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS –PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gelelectrophoresis
TBS	Tris buffer saline
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethyl Ethylenediamin
TFA	Trifluoroacetic acid
TMB	Tetramethylbenzidine

TTBS TweenTris buffer saline
VABIOTECH Công ty TNHH Một thành viên Vắc xin và Sinh phẩm số 1

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1. 1: Tế bào NK tiêu diệt tế bào ung thư	6
Hình 1. 2: Cấu trúc không gian của Interleukin-2.....	7
Hình 1. 3: Sự kích thích tăng sinh và biệt hóa của Interleukin-2 lên tế bào T [38]	9
Hình 1. 4: Cơ chế hoạt động của Interleukin-2	9
Hình 1. 5: Sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô thận.....	10
Hình 1. 6: Ung thư hạch tố ác tính	11
Hình 1. 7: Sơ đồ cấu trúc vector pET22b+.....	15
Hình 1. 8: Cơ chế kiểm soát biểu hiện gene nhờ chất cảm ứng IPTG	16
Hình 1. 9: Lên men trên hệ thống Bioreactor tại phòng đạt tiêu chuẩn GMP	17
Hình 1. 10: Hệ thống tinh sạch protein HPLC	18
Hình 3. 1: Sự biểu hiện protein IL-2 tái tổ hợp trong hệ thống lên men 5 lít	38
Hình 3. 2: Khảo sát bổ sung thành phần chất dinh dưỡng và nồng độ IPTG trong quá trình lên men.....	42
Hình 3. 3: Đường cong sinh trưởng của chủng tái tổ hợp E. coli BL21-IL2 đợt 1	43
Hình 3. 4: Điện di Protein tổng số khi biểu hiện chủng E. coli BL21-IL2 trong hệ thống lên men 10 lít đợt 1.....	45
Hình 3. 5: Đường cong sinh trưởng của chủng tái tổ hợp E. coli BL21-IL2 đợt 2.....	47
Hình 3. 6: Điện di Protein tổng số khi biểu hiện chủng E. coli BL21-IL2 trong hệ thống lên men 10 lít đợt 2.....	48
Hình 3. 7: Kiểm tra sản phẩm tiền tinh chế của 2 đợt lên men trong hệ thống 10 lít	49
Hình 3. 8: Sắc ký đồ tinh chế IL-2 trên hệ thống HPLC.....	51
Hình 3. 9: Kết quả kiểm tra protein IL-2 sau khi tinh sạch bằng hệ thống HPLC.....	52
Hình 3. 10: Biểu đồ thể hiện sự kích thích tăng sinh tế bào CTLL-2 của các mẫu IL-2 tái tổ hợp.....	53
Hình 3. 11: So sánh hoạt tính sinh học riêng của các mẫu IL-2	55
Hình 3. 12: Kiểm tra độ tinh sạch của protein IL-2 bằng Quantity One.....	56
Hình 3. 13: Kết quả độ tinh sạch của IL-2 xác định bằng phần mềm Quantity One	56

Hình 3. 14: Hình ảnh kết quả sau khi dừng phản ứng đông gel.....57

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3. 1: Giá trị OD mẫu thu được sau quá trình lên men.....40

Bảng 3. 2: Giá trị EC50 và hoạt tính riêng của các mẫu IL-2.....54

MỞ ĐẦU

Sức khỏe cộng đồng và ung thư là những vấn đề ngày càng được quan tâm ở hầu hết các quốc gia trên thế giới. Trong đó, ung thư là nguyên nhân chủ yếu gây tử vong cho người bệnh và đang có xu hướng ngày càng gia tăng. Theo ghi nhận của tổ chức Y tế Thế giới (năm 2012), trên thế giới có 14,1 triệu ca ung thư mới được phát hiện và 8,2 triệu người chết vì ung thư. Ước tính tới năm 2030, mỗi năm sẽ có thêm 25 triệu ca mới mắc bệnh. Tại Việt Nam, theo thống kê của Bộ Y tế, trong năm 2010 số ca mắc ung thư mới tăng lên tới 126.307, ước tính đến năm 2020 số ca mắc ung thư mới là 190.000 ca. Nguyên nhân chính gây ung thư là do môi trường bên ngoài cùng với chế độ sinh hoạt hằng ngày chiếm tới 90%.

Hiện nay các phương pháp như phẫu thuật, hóa trị, xạ trị...vẫn là những phương pháp phổ biến nhất trong điều trị ung thư trên thế giới. Tuy nhiên, chúng còn một số nhược điểm như là có thể gây tổn thương cho các tế bào lành, ảnh hưởng không tốt tới sức khỏe người bệnh. Ngoài các phương pháp điều trị trên thì liệu pháp miễn dịch là phương pháp chữa trị hứa hẹn mang lại hiệu quả cao. Liệu pháp này có thể tiêu diệt tế bào ung thư, khống chế khả năng phát triển nhanh chóng của khối u và không làm tổn thương các tế bào khỏe mạnh, tăng cường khả năng miễn dịch cho bệnh nhân, kéo dài tuổi thọ và nâng cao chất lượng sống. Do đó, liệu pháp miễn dịch được coi là liệu pháp xanh vì có hiệu quả điều trị rõ rệt, không có tác dụng phụ, an toàn và dung nạp tốt, mở ra một hình thức điều trị hoàn toàn mới cho bệnh nhân ung thư.

Liệu pháp miễn dịch sử dụng cytokine để kích hoạt hệ thống miễn dịch nhằm nhận biết và tiêu diệt các tác nhân gây bệnh. Interleukin-2 (IL-2) là một cytokine được tiết bởi tế bào lympho T đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Cytokine này tham gia vào quá trình kích thích hệ thống miễn dịch sản sinh ra các dòng tế bào T, đồng thời kích thích sự tăng sinh và biệt hóa các dòng tế bào NK và các đại thực bào nhằm tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể. IL-2 đã được sử dụng điều trị hiệu quả hai loại ung thư biểu mô thận và ung thư da. Ngoài ra, IL-2 còn được sử dụng hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư khác như ung thư

phổi, ung thư bạch cầu, ung thư buồng trứng,... và có khả năng kích hoạt hệ thống miễn dịch để chống bệnh nhiễm HIV.

Năm 1992, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã cho phép sử dụng IL-2 tái tổ hợp trong điều trị ung thư. Hiện nay, chế phẩm IL-2 với tên thương phẩm Proleukin® (Aldesleukin) đã được sản xuất bởi hãng Chiron và thương mại hóa trên toàn thế giới, tuy nhiên giá thành của Proleukin® còn khá cao (khoảng 2,5 nghìn USD/ống 1,3 mg). Tại Việt Nam, việc sử dụng IL-2 tái tổ hợp nói riêng và sản phẩm protein tái tổ hợp trong điều trị nói chung vẫn còn bị bỏ ngỏ và chưa có sản phẩm protein tái tổ hợp được triển khai áp dụng hoàn toàn từ quá trình nghiên cứu đến quá trình sản xuất. Để chủ động việc sản xuất IL-2 tái tổ hợp trong nước và giảm giá thành sản xuất với chi phí thấp phục vụ cho việc điều trị bệnh ung thư tại Việt Nam, việc nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất IL-2 tái tổ hợp và chuyển giao sang công ty để sản xuất thử nghiệm là rất cần thiết.

Trong quá trình nghiên cứu sản xuất IL-2 người tái tổ hợp, trình tự amino acid của IL-2 đã được cải biến nhằm tạo ra được sản phẩm Interleukin-2 có trình tự giống với sản phẩm Proleukin đã được FDA công nhận. Ngoài ra, việc cải biến trình tự amino acid sẽ làm tăng hoạt tính và tăng tính an toàn cho sản phẩm. Sản phẩm Proleukin còn có tên hóa học là desalanyl-1, serein-125 human interleukin-2 tương ứng đột biến mất alanine ở vị trí amino acid số 1, thay thế cysteine ở vị trí 125 bằng serine. Để chuyển giao công nghệ sản xuất IL-2 tái tổ hợp từ quy mô phòng thí nghiệm sang phòng sản xuất đạt tiêu chuẩn GMP, chúng tôi đã tiến hành tối ưu biểu hiện protein IL-2 trong hệ thống lên men 5 và 10 lít tại Viện Công nghệ sinh học và công ty VABIOTECH. Sau đó, sản phẩm lên men được tiến hành tiền xử lý và tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sản phẩm Interleukin-2 sau tinh chế được tiến hành xác định hoạt tính sinh học và kiểm tra một số chỉ tiêu về độ sạch và độ an toàn, để đáp ứng yêu cầu của sản phẩm tái tổ hợp sử dụng trong điều trị trên người với giá thành thấp hơn thương phẩm Proleukin.

Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu sản xuất Interleukin-2 người tái tổ hợp dạng cải biến trên dòng tế bào *Escherichia coli* trong điều kiện GMP”**. Đề tài được thực hiện tại Công ty Vacxin và Sinh phẩm số