

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

**LÊ THỊ MINH PHÚC**

**NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ TÁI TỔ  
HỢP ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN HER2  
TRONG *ESCHERICHIA COLI***

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội - 2010

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

**LÊ THỊ MINH PHÚC**

**NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ TÁI TỔ  
HỢP ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN HER2  
TRONG *ESCHERICHIA COLI***

Ngành: Sinh học  
Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm  
Mã số: 60.42.30

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. LÊ QUANG HUẤN**

Hà Nội - 2010

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới PGS. TS. Lê Quang Huân người thầy đã hướng dẫn, chỉ bảo tận tình ngay từ những bước đi đầu tiên và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành khóa luận tốt nghiệp này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ, dạy bảo tận tình của các cô chú, anh chị và các bạn đồng nghiệp trong phòng Công nghệ tế bào động vật – Viện Công nghệ Sinh học.

Nhân dịp này tôi xin cảm ơn các thầy, cô giáo Trường Đại học Thái Nguyên; Viện Sinh thái tài nguyên sinh vật và Viện Công nghệ Sinh học đã dạy bảo và giúp đỡ tôi trong thời gian học tập, nghiên cứu.

Bên cạnh đó tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè tôi đã tạo mọi điều kiện và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

*Hà Nội, ngày 30 tháng 08 năm 2010*

**Học viên**

**Lê Thị Minh Phúc**

# MỤC LỤC

<b>LỜI MỞ ĐẦU</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Chương I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1. BỆNH UNG THƯ VÚ .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1. Giới thiệu chung về bệnh ung thư và ung thư vú	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2. Tình hình UTV trên thế giới và Việt Nam.....	2
1.3. Triệu chứng và bệnh sinh .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4. Phân loại UTV .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.5. Điều trị .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2. KHÁNG NGUYÊN HER2 ĐẶC HIỆU TẾ BÀO UTV</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1. Khái quát về gen <i>HER2</i> và kháng nguyên <i>HER2</i>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2. Cấu trúc của <i>HER2</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3. Mô hình cơ chế gây UTV của <i>HER2</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4. Các nghiên cứu về đột biến trên <i>HER2</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5. <i>HER2</i> và UTV .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3. KHÁI QUÁT CHUNG VỀ KHÁNG THỂ - KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1. Cấu tạo chung của kháng thể (Immunoglobulin)	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2. Kháng thể đơn dòng.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3. Kháng thể đơn chuỗi – Mảnh kháng thể.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4. KỸ THUẬT PHAGE DISPLAY</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1. Giới thiệu chung .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2. Thực khuẩn thể M13.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3. Tạo thư viện phage display .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4. Sàng lọc với thư viện phage .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

**5. CÁC HẠT NANO VÀNG VÀ ỨNG DỤNG ..... Error! Bookmark not defined.**

5.1. Tổng hợp các hạt nano vàng ..... Error! Bookmark not defined.

5.2. Các ứng dụng của các hạt nano ..... Error! Bookmark not defined.

**Chương II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU Error! Bookmark not defined**

**1. VẬT LIỆU ..... Error! Bookmark not defined.**

1.1. Sinh phẩm ..... Error! Bookmark not defined.

1.2. Môi ..... Error! Bookmark not defined.

1.3. Hóa chất và trang thiết bị ..... Error! Bookmark not defined.

**2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ..... Error! Bookmark not defined.**

2.1. Các phương pháp thao tác với DNA ..... Error! Bookmark not defined.

2.2. Các phương pháp thao tác với protein tái tổ hợp Error! Bookmark not defined.

2.3. Các kỹ thuật phage display ..... Error! Bookmark not defined.

**Chương III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN ..... Error! Bookmark not defined.**

**1. KẾT QUẢ TẠO KHÁNG NGUYÊN HER2 TÁI TỔ HỢP Error! Bookmark not defined**

1.1. Kết quả tách dòng gen mã hóa kháng nguyên HER2 Error! Bookmark not defined.

1.2. Tách chiết DNA plasmid và xác định trình tự nucleotide gen *HER2* Error! Bookmark not defined.

1.3. Kết quả thiết kế vector biểu hiện kháng nguyên HER2 Error! Bookmark not defined.

1.4. Kết quả biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên HER2 Error! Bookmark not defined.

**2. KẾT QUẢ GÂY MIỄN DỊCH GÀ BẰNG HER2 Error! Bookmark not defined.**

**3. KẾT QUẢ TẠO THƯ VIỆN scFv VÀ CHỌN DÒNG scFv ĐẶC HIỆU**

**HER2 ..... Error! Bookmark not defined.**

3.1. Kết quả thu nhận gen mã hóa scFv từ gà đặc hiệu  
HER2 ..... 56

3.2. Kết quả tạo kháng thể phage đặc hiệu  
HER2 ..... 61

**4. KẾT QUẢ GẮN KHÁNG THỂ VỚI HẠT VÀNG ĐỂ TẠO KIT CHẨN**

**ĐOÁN ..... Error! Bookmark not defined.**

4.1. Chức năng hóa về mặt sinh học của các hạt nano vàng bởi protein BSA.....63

4.2. Kết quả xác định phổ hấp thụ của phức hệ kháng thể-vàng.....65

**KẾT LUẬN** ..... **Error! Bookmark not defined.**

**KIẾN NGHỊ** ..... **Error! Bookmark not defined.**

**PHỤ LỤC** ..... **Error! Bookmark not defined.**

## **THUẬT NGỮ VIẾT TẮT**

STT	Ký hiệu	Tên đầy đủ
1	aa	Amino acid

1	Amp	Ampicillin
2	AuNPs	Gold Nanoparticles (Các hạt nano vàng)
3	bp	Base pair (Cặp bazônito)
4	ddNTP	Dideoxynucleotide
5	dNTP	Deoxynucleotide
6	DNA	Acid deoxyribonucleic
7	EDTA	Ethylen Diamine Tetra acetic Acid
8	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Thí nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn enzyme)
9	EtBr	Ethidium Bromide
10	HRP	Horseradish peroxidase
11	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside
12	Ka	Kanamycin
13	Kb	Kilo base pair
14	kDa	Kilo Dalton
15	KTĐĐ	Kháng thể đơn dòng
16	LB	Môi trường Lauria Betani
17	NIR	Near Infrared Region
18	NPs	Nanoparticles
19	OD	Optical Density (mật độ quang học)
20	PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi trùng hợp)
21	PEG	Polyethylen Glycol
22	SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
23	TAE	Tris - Acetate - EDTA
24	TE	Tris - EDTA
25	UTV	ung thư vú
26	v/p	Vòng/phút

## LỜI MỞ ĐẦU

HER2 là một loại thụ thể thuộc họ các yếu tố phát triển biểu mô (Human Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), có hoạt tính tyrosine kinase, đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và biệt hoá tế bào. Cho đến nay, vẫn chưa tìm thấy ligand đặc hiệu của HER2 tuy nhiên nó có thể tạo dimer với bản thân nó hoặc với các thụ thể khác trong họ để hình thành đồng thụ thể (coreceptor) thúc đẩy các con đường truyền tín hiệu. Sự khuếch đại gen *HER2* trên nhiễm sắc thể 17 dẫn đến sự tăng biểu hiện thụ thể HER2 trên bề mặt tế bào ung thư vú. Biểu hiện quá mức HER2 có thể biến đổi tế bào thành dạng ác tính và làm tăng quá trình hình thành khối u. Theo nhiều nghiên cứu gần đây, khoảng 25-30% bệnh nhân ung thư vú cho thấy có sự khuếch đại gen *HER2* hoặc biểu hiện quá mức gen này trong các tế bào ung thư. Đặc điểm này làm cho HER2 trở thành một marker hữu hiệu để chẩn đoán sớm ung thư cũng như đích tấn công của liệu pháp điều trị miễn dịch.

Ung thư vú hiện nay đang là một trong hai loại ung thư chiếm tỷ lệ cao nhất trong các bệnh ung thư ở nữ giới. Điều trị ung thư vú cũng như nhiều loại ung thư khác theo các liệu pháp truyền thống như hoá trị liệu và xạ trị liệu mặc dù hiệu quả tiêu diệt khối u cao nhưng lại có một nhược điểm rất lớn, đó là tác dụng lên cả các cơ quan bình thường xung quanh (non-targeted effect). Mặt khác, các phương pháp này đa phần chỉ áp dụng đối với trường hợp các khối u đã phát triển và ở giai đoạn muộn nên có hiệu quả điều trị thấp. Những nghiên cứu gần đây về các chỉ thị sinh học trong ung thư vú đã mở ra một hướng điều trị mới, thông minh và đầy triển vọng, liệu pháp điều trị tấn công đích (targeted therapy), có thể loại bỏ gần như hoàn toàn nhược điểm của các liệu pháp truyền thống. Một trong số thuốc có bản chất kháng thể đặc hiệu HER2 đã được FDA chấp thuận để điều trị cho các bệnh nhân ung thư vú dương tính với HER2 ở giai đoạn cuối là Herceptin.

Để góp phần nghiên cứu nhằm tạo các bộ kit chẩn đoán và các loại thuốc có hiệu quả điều trị cao đối với dạng ung thư vú dương tính với HER2 chúng tôi tiến hành đề tài: ***“Nghiên cứu tạo kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kháng nguyên HER2 trong *Escherichia coli*”***.

Đề tài được thực hiện tại phòng Công nghệ tế bào động vật – cụm phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen – Viện Công nghệ sinh học – Viện khoa học và công nghệ Việt Nam.



# Chương I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

## 1. BỆNH UNG THƯ VÚ

### 1.1. Giới thiệu chung về bệnh ung thư và ung thư vú

Ung thư là tên chung dùng để gọi một nhóm bệnh gồm trên 200 loại khác nhau về nguồn gốc của tế bào, nguyên nhân gây bệnh và cách thức điều trị nhưng có những đặc điểm chung đó là sự phân chia không kiểm soát được của tế bào, khả năng tồn tại và phát triển ở các cơ quan và tổ chức lạ [1,2,26].

Ung thư xảy ra như kết quả của các đột biến hay những thay đổi bất thường trong các gen chịu trách nhiệm cho việc điều hòa sự phát triển của các tế bào và giữ cho các tế bào luôn khỏe mạnh.

Ung thư là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 3 sau bệnh tim mạch và đột quỵ ở các nước phát triển và là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 2 sau bệnh tim mạch ở Mỹ (<http://www.cdc.gov>). Những nghiên cứu đã thống kê là có khoảng 10 triệu ca mắc mới, 6 triệu ca tử vong và 22 triệu người chung sống với ung thư trên khắp thế giới năm 2000. Những con số này tương ứng với việc tăng tỷ lệ mắc và tử vong lên khoảng 22% so với những tỷ lệ này của năm 1990. Người ta ước lượng rằng con số các ca mắc ung thư mới trên khắp thế giới sẽ là 12.3 và 15.4 triệu người vào năm 2010 và 2020 theo thứ tự. Năm 2008, ước tính ở Mỹ có tổng số 1.437.180 ca ung thư mới và 565.650 ca tử vong.

#### Ung thư vú

Là một khối u ác tính được phát triển từ các tế bào vú. Thông thường UTV hoặc là khởi phát trong các tế bào có khả năng sản sinh sữa của tiểu thùy tuyến vú, hoặc là trong các ống dẫn sữa từ các tiểu thùy ra núm vú. Ít phổ biến hơn, UTV có thể khởi phát trong các mô đỡ nơi chứa các mô liên kết dạng sợi và các mô mỡ của vú.

### 1.2. Tình hình UTV trên thế giới và Việt Nam

#### UTV trên thế giới

UTV là một trong những ung thư thường thấy nhất ở nữ giới và là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ hai sau ung thư phổi. Ở các nước, tỷ lệ phụ nữ mắc UTV gia tăng đều đặn hàng năm, tính chung trên toàn thế giới UTV ở phái nữ được xếp vào hạng nguy cơ hàng đầu. Theo thống kê, tỉ lệ tử vong do UTV ở phụ nữ tại Nhật Bản, *Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên*