

KẾT QUẢ NHÂN BẢN VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ ĐOẠN EPITOPE CỦA GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN CYFRA21-1

Lê Đình Chấn¹

TÓM TẮT

Ung thư phổi là một trong những căn bệnh hiểm nghèo do sự tăng sinh không bình thường của tế bào, thường gặp ở nam giới, chủ yếu là lứa tuổi 50-70. Nghiên cứu nguồn gốc và sự phát triển của tế bào ung thư phổi dạng không phải tế bào nhỏ, người ta nhận thấy ung thư có liên quan chặt chẽ với sự xuất hiện hàm lượng kháng nguyên đặc trưng CYFRA21-1 trong máu, nước mô, huyết thanh. Do vậy việc tìm và xác định được trình tự gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 là cần thiết, làm cơ sở cho việc biểu hiện, thu protein CYFRA21-1 tái tổ hợp để phục vụ cho việc tạo KIT chẩn đoán sớm ung thư phổi dạng không phải tế bào nhỏ đem lại cơ hội sống cho bệnh nhân.

Trong nghiên cứu này, trình tự nucleotide, trình tự amino acid đoạn epitope của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 đã được nhân bản và xác định trình tự với sự tương đồng là 100% với trình tự amino acid trên Ngân hàng dữ liệu quốc tế mang mã số K1C19- HUMAN-P08727.

Từ khóa: *Ung thư phổi, gen mã hóa, CYFRA21-1, K1C19- HUMAN-P08727.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi (UTP) là một trong những căn bệnh hiểm nghèo do sự tăng sinh không bình thường của tế bào, thường gặp ở nam giới, chủ yếu là lứa tuổi 50-70, đặc biệt liên quan đến những người đã hoặc đang hút thuốc lá. Đồng thời, UTP cũng là căn bệnh có tỉ lệ tử vong lớn thường gặp ở người. Vì vậy, việc phát hiện sớm UTP có ý nghĩa sống còn với bệnh nhân.

Thực tế, trong y học đã có rất nhiều phương pháp được sử dụng để chẩn đoán UTP (sinh thiết phổi, nội soi phổi, thử đờm, chọc nước màng phổi, chụp quang tuyến cắt lớp ...) và một số phương pháp điều trị UTP (hóa trị liệu, phẫu thuật, xạ trị ...) [1]. Tuy nhiên, khi phát hiện UTP thì thường đã muộn hoặc quá muộn, vì một số căn bệnh khác (viêm phế quản, viêm phổi, lao, ...) cũng có những triệu chứng tương tự UTP.

Nghiên cứu tế bào ung thư cũng như nguồn gốc và sự phát triển của tế bào ung thư, người ta nhận thấy ung thư có liên quan chặt chẽ với sự xuất hiện hàm lượng các kháng nguyên đặc trưng ung thư trong máu, nước mô, huyết thanh [2], [5], [6]. Điều này đã mở ra hướng nghiên cứu mới trong chẩn đoán và điều trị ung thư trên thế giới và trong nước.

¹ TS. Giảng viên khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Hồng Đức

Hiện nay, nhiều chỉ thị kháng nguyên ung thư được biết đến và có thể sử dụng để phát hiện ung thư như : CEA, NES, CA125, CYFRA21-1, HER-2/neu ... [10], [12], [13], [14], [15] trong đó, kháng nguyên CYFRA21-1 là một chỉ thị điển hình cho bệnh UTP dạng không phải tế bào nhỏ (non small cell lung carcinoma - NSCLC) do sự tăng hàm lượng CYFRA21-1 nhanh chóng trong dịch cơ thể khi tế bào biểu mô phổi tăng sinh bất thường [2], [3], [7], [8], [11]. Vì vậy, phát hiện sớm được sự tăng hàm lượng CYFRA21-1 trong máu sẽ góp phần chẩn đoán sớm được UTP và kháng nguyên CYFRA21-1 có thể được sử dụng như là một chỉ thị đặc hiệu để chẩn đoán sớm, từ đó định hướng điều trị hiệu quả UTP dạng NSCLC.

Việc nghiên cứu tạo kháng nguyên tái tổ hợp CYFRA21-1 trong UTP là một trong những hướng nghiên cứu mới nhằm xây dựng bộ KIT chẩn đoán, theo dõi và định hướng điều trị kịp thời bệnh UTP dạng NSCLC, góp phần vào những thành tựu đáng kể trong y học và sinh học.

Trong bài viết này, chúng tôi trình bày kết quả của việc nhân bản và tách dòng đoạn epitop của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

- Gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 (Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen tế bào Động vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) cung cấp.

- Cặp mồi sử dụng để biểu hiện đoạn gen mã hóa epitope kháng nguyên CYFRA21-1

ExpcyF: 5' -CATATGGGCAGGTC-3'

ExpcyR: 5' -CTCGAGGTCCATGAGCCGCTGGTAC-3'

- Vector tách dòng PCR2.1-TOPO do hãng Invitrogen cung cấp. Cặp mồi M13F/M13R để xác định đoạn gen CYFRA21-1 có trong *E. coli* có trình tự như sau:

M13F: 5' -GTAAAACGACGGCCAG-3'

M13R: 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'

- Dòng tế bào *E. coli* DH5 α do Trung tâm Công nghệ Protein của Vương Quốc Anh (MRC-Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) cung cấp. Cặp mồi LabF/R dùng để nhân bản, khuếch đại thư viện thực khuẩn sau mỗi vòng sàng lọc, trình tự cụ thể như sau:

LabF: 5' -CAGGAACAGCTATGAC- 3'

LabR: 5' -GAATTTTCTGTATGAGG- 3'

- Helper phage M13K07 (Invitrogen, CA, USA).

- Bộ KIT tách dòng "TA-Topo Cloning KIT; KIT tách plasmid từ vi khuẩn của hãng QIAGEN; KIT real time-PCR của Roche; KIT tinh sạch thu đoạn DNA từ gel agarose của hãng Bioscience; KIT Big Dye Terminator sequencing ...".

- Các enzym: *Taq DNA polymease*, *Nde I*, *EcoR I*, *Xho I*, *T₄ DNA ligase*, ... Các sinh phẩm này do hãng BioLabs cung cấp.

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Để thực hiện thành công việc nhân bản và tách dòng đoạn epitop của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1, chúng tôi sử dụng một số các phương pháp sau:

3.1. Phương pháp nhân bản gen bằng PCR

Thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Nồng độ	Thể tích(μ l)
Dung dịch đệm	10X	2,5
Mồi xuôi	10 pmol/ μ l	1
Mồi ngược	10 pmol/ μ l	1
DNA khuôn	10-100 ng/ μ l	1
<i>Taq-polymerase</i>	5 unit/ μ l	0,5
dNTPs	10nM	2,5
MgCl ₂	25mM	2,5
BSA 1X	1mg/ml	4
Bổ sung H ₂ O		10

Chạy máy PCR với chu trình nhiệt sau: Biến tính DNA ở 94°C: 2 phút, thực hiện 30 chu kỳ phản ứng với chu trình nhiệt: 94°C - 45 giây, Tm 55°C - 45 giây, 72°C - 1 phút; kéo dài ở 72°C - 8 phút để hoàn tất phản ứng; sau đó mẫu được giữ ở 4°C.

3.2. Phương pháp điện di

Trong điện trường theo chiều từ cực âm đến cực dương, các DNA có kích thước lớn hoặc mạch thẳng sẽ chuyển động chậm hơn các DNA dạng siêu xoắn hoặc kích thước bé. Trong một phạm vi nhất định của nồng độ gel agarose, kích thước phân tử tỉ lệ nghịch với quãng đường dịch chuyển của DNA trên gel agarose. DNA trên gel agarose được phát hiện bằng cách nhuộm với Ethidium Bromide (EtBr) và quan sát dưới tia UV.

3.3. Phương pháp xác định trình tự nucleotide

Đây là phương pháp sử dụng dideoxynucleotide (ddNTP) có đánh dấu huỳnh quang để làm ngừng các mạch đơn DNA đang được tổng hợp một cách ngẫu nhiên. Enzym *DNA - polymerase* xúc tác gắn các nucleotide vào mạch đơn DNA đang tổng hợp ở vị trí 3'-OH, khi gặp ddNTP (không có nhóm 3'-OH) thì phản ứng tổng hợp bị ngừng lại.

Kết quả phản ứng tổng hợp nên các đoạn DNA dài, ngắn khác nhau 1 nucleotide, có thể phân tách nhờ điện di trên gel agarose, phát hiện các ddNTP đã đánh dấu nhờ tia laze.

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Nhân bản vùng mã hóa epitope kháng nguyên CYFRA21-1

Khi nghiên cứu CYFRA21-1 với vai trò là kháng nguyên đặc hiệu UTP dạng NSCLC, epitope của kháng nguyên này được quan tâm chủ yếu.

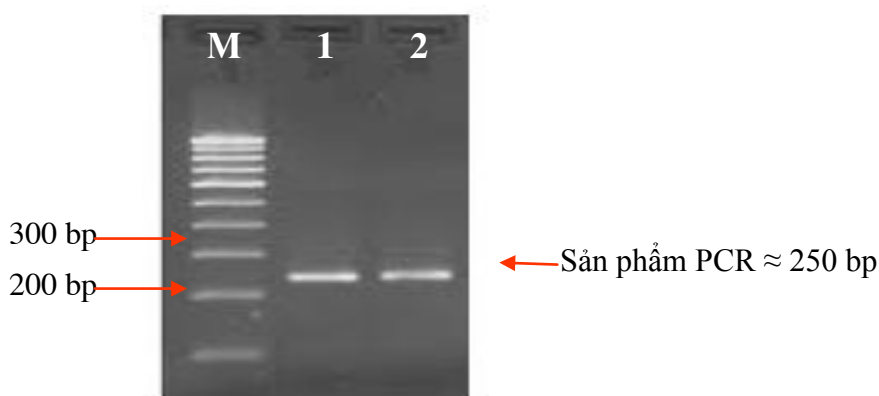
Từ kết quả nghiên cứu sử dụng các phân tử kháng thể để nhận ra vùng epitope kháng nguyên của Cytokeratin, người ta nhận thấy, vùng epitope kháng nguyên CYFRA21-1 nằm trong khoảng amino acid từ 311 đến 368 trên phân tử Cytokeratin 19. Kết quả này cũng đã được khẳng định trong một nghiên cứu sử dụng hai kháng thể đơn dòng: Ks 19.1 (kháng thể nhận biết các amino acid từ vị trí 311 đến 335 trên Cytokeratin 19) và BM19-21 (kháng thể nhận biết các amino acid từ vị trí 346 đến 367) [9]. Từ các kết quả của các nghiên cứu trên và dựa vào trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa CYFRA21-1 thu được cũng như vị trí vùng epitope kháng nguyên đã được xác định, cặp môi để nhân bản đoạn gen chứa vùng epitope kháng nguyên CYFRA21-1 làm cơ sở cho việc biểu hiện protein CYFRA21-1 đã được thiết kế.

Để tạo điều kiện thuận lợi trong việc tạo vector tái tổ hợp mang đoạn gen mã hóa epitope kháng nguyên CYFRA21-1 biểu hiện protein CYFRA21-1 trong *E. coli*, các môi đặc hiệu có chứa trình tự nhận biết của hai enzym cắt hạn chế *Nde* I và *Xho* I đã được sử dụng để dàng hơn trong việc gắn gen *Cyfra21-1* vào các vị trí tương ứng của vector biểu hiện pET-21a(+) nhằm thu protein CYFRA21-1 tái tổ hợp phục cho các nghiên cứu sau này.

Trong nghiên cứu này, vector biểu hiện pET-21a(+) được sử dụng để thu protein CYFRA21-1 tái tổ hợp phục cho các nghiên cứu tiếp theo.

Thành phần của phản ứng nhân bản đoạn gen mã hóa epitope kháng nguyên CYFRA21-1 gồm:

DNA khuôn (Sản phẩm PCR có trình tự đã được xác định khoảng 400 bp thu được ở trên), dNTPs, môi ExpcyF và ExpcyR, enzym *Taq*-DNA polymerase, dung dịch đệm, dung dịch $MgCl_2$, nước với tỷ lệ thích hợp trong tổng thể tích 25 μ l. Chu trình nhiệt: 1 chu kỳ 94°C thời gian 4 phút; 25 chu kỳ (94°C thời gian 30 giây, 54°C thời gian 30 giây, 72°C thời gian 60 giây); 72°C thời gian 5 phút và lưu ở 4°C. Sau khi nhân bản đoạn gen chứa epitope kháng nguyên CYFRA21-1, chúng tôi tiến hành kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 0,8% đã được kiểm tra (Hình 4.1).



Hình 4.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose

Làn chạy M: Thang DNA chuẩn 100 bp

Làn chạy số 1 và số 2: Sản phẩm PCR

Kết quả điện di trên gel agarose ở hình 4.1 cho thấy, trên làn chạy số 1 và số 2 có một băng sáng đậm với kích thước khoảng 250 bp. Kích thước này phù hợp với những tính toán về chiều dài đoạn chứa vùng epitope của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1, chứng tỏ đoạn gen mã hóa cho vùng epitope kháng nguyên CYFRA 21-1 đã được nhân bản thành công với cặp môi ExpcyF/R.

Để thuận lợi cho việc thiết kế vector biểu hiện và lưu giữ nguồn gen, đoạn gen thu được đã được gắn vào vector tách dòng.

4.2. Tách dòng đoạn gen mã hóa vùng epitope kháng nguyên CYFRA21-1

Nhờ hoạt tính của *Taq-polymerase*, sản phẩm PCR có thêm nucleotide A tự do ở đầu của gen Vector tách dòng pCR2.1 được tạo ra dưới dạng mạch thẳng với hai nucleotide Thymine tự do bổ sung với nucleotide Adenin. Dưới tác dụng của enzym *topoisomerase*, sản phẩm PCR được gắn vào vector, quy trình tách dòng được thực hiện bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm phản ứng PCR vào vector tách dòng pCR2.1 (Invitrogen).

Phản ứng gắn sản phẩm PCR vào vector tách dòng được thực hiện với mục đích tạo vector tái tổ hợp mang đoạn DNA cần tách dòng. Nguyên tắc của phản ứng này là dựa trên việc tạo ra một gốc Adenin tự do đầu 3' trên sản phẩm của enzym *Taq* mà không phụ thuộc vào trình tự khuôn, trong khi đó một gốc Thymine tự do được thiết kế trên vector tách dòng pCR2.1. Điều này cho phép sản phẩm PCR có thể gắn vào vector dễ dàng hơn khi có mặt của enzym xúc tác.

Trong phản ứng gắn sản phẩm PCR vào vector tách dòng, enzym *topoisomerase* (có trong bộ "TA Cloning KIT"), sẽ bám vào DNA tại một vị trí đặc hiệu và cắt bỏ liên kết phosphodiester ở đầu 5'-CCCTT trên một chuỗi đơn của vector, đồng thời tạo nên liên kết cộng hóa trị giữa gốc phosphat đầu 3' của chuỗi vừa bị cắt với tyrosine tại vị trí 274 của enzym *topoisomerase* bằng chính năng lượng của liên kết phosphodiester.

Tiếp theo, liên kết giữa gốc phosphat của DNA và tyrosine của enzym bị phá vỡ nhờ tác động của nhóm 5'-OH của sợi đơn đã bị cắt trước đó, điều này sẽ làm chuyển hướng phản ứng và giải phóng enzym *topoisomerase*. Với các thao tác như trên, chúng tôi thu được vector tái tổ hợp mang đoạn gen DNA mã hóa epitope kháng nguyên CYFRA21-1 đã thu được.

Sau đó, sản phẩm PCR khi được gắn với vector tách dòng sẽ được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng TOP10, tiếp theo, dòng tế bào chứa plasmid tái tổ hợp mang gen đích bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc với cặp mồi M13F/R đã được chọn. Các dòng đã chọn được tách chiết plasmid và điện di kiểm tra trên gel agarose.

Với cách tiến hành như vậy, dòng vector tái tổ hợp mang đoạn gen mã hóa vùng epitope kháng nguyên CYFRA21-1 đã được chọn.

Sau đó, đoạn gen mã hóa vùng epitope kháng nguyên CYFRA21-1 được xác định trình tự trên máy ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer trình tự nucleotide và trình tự amino acid của đoạn gen thu được trong vector tách dòng pCR được thể hiện trên hình 4.2

```

CATATGGGCAGGTCCGAGGTTACTGACCTGCGGGCGCACCCCTTCAGGGTCT
TGAGATTGAGCTGCAGTCACAGCTG 75
  H M G R S E V T D L R R T L Q G L E I E L Q S Q L
AGCATGAAAGCTGCCTTGGAAGACACACTGGCAGAAACGGAGGGCGCGCT
TTGGAGCCCAGCTGGCGCATATCCAG 150
  S M K A A L E D T L A E T E A R F G A Q L A H I Q
GCGCTGATCAGCGGTATTGAAGCCCAGCTGGGCGATGTGCGAGCTGATAG
TGAGCGGCAGAATCAGGAGTACCAG 225
  A L I S G I E A Q L G D V R A D S E R Q N Q E Y Q
CGGCTCATGGACCTCGAGTGA                                     246
  R L M D L E *
    
```

Hình 4.2. Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn của đoạn gen mã hóa vùng epitope kháng nguyên CYFRA21-1

Kết quả phân tích trình tự amino acid cho thấy, đoạn gen đã gắn vào vector tách dòng đúng theo tính toán và có độ tương đồng là 100% với trình tự amino acid trên Ngân hàng dữ liệu quốc tế mang mã số K_1C19- HUMAN-P08727. Kết quả này có đủ độ tin cậy để biểu hiện và thu protein CYFRA21-1 phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

5. KẾT LUẬN

Đoạn epitope của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 với cặp mồi đặc hiệu đã được nhân bản thành công.

Đoạn epitope của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 đã được tách dòng và xác định trình tự. Trình tự amino acid đoạn epitope của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 thu được có độ tương đồng là 100% với trình tự amino acid đoạn epitope

của gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21-1 đã được công bố trên Ngân hàng dữ liệu quốc tế mang mã số K1C19- HUMAN-P08727.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Alissa K., Greenberg M. D. (2007), “*Biomarkers for lung cancer*”, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 13 (4), pp. 249-255.
- [2] Ando S., Suzuki M., Yamamoto N., Iida T. and Kimura H. (2004), “*The prognostic value of both neuron-specific enolase (NSE) and CYFRA21-1 in small cell lung cancer*”, *Anticancer Research*, 24, pp 1941-1946.
- [3] Barlési F., Gimenez C., Torre J. P., Doddoli C., Mancini J., Greillier L., Roux F. and Kleisbauer J. P. (2004), “*Prognostic value of combination of CYFRA21-1, CEA and NSE in patients with advanced non-small cell lung cancer*”, *Respir. Med*, 98(4), pp. 357-362.
- [4] Bộ môn ung thư - Đại học Y Hà Nội (1999), *Ung thư học*, Nxb Y học, Hà Nội.
- [5] Buccheri G., Ferrigno D. (2001), “*Lung tumor markers of Cytokeratin origin: an overview*”, *Lung Cancer*, 34(1 2), pp. 65-69.
- [6] Buccheri G., Ferrigno D. (2001), “*Cytokeratin-derived markers of lung cancer*”, *Expert Rev Mol Diagn*, 1(3), pp. 315-322.
- [7] Cabrera-Alarcon J. L., Carrillo-Vico A., Santotoribio J. D., Leon-Justel A., Sanchez-Gil R., Gonzalez-Castro A. and Guerrero J. M. (2011), “*CYFRA21-1 as a tool for distant metastasis detection in lung cancer*”, *Clin. Lab*, 57(11-12), pp. 1011- 1014.
- [8] Cedrés S., Nuñez I., Longo M., Martinez P., Checa E., Torrejón D. and Felip E. (2011), “*Serum tumor markers CEA, CYFRA21-1, and CA-125 are associated with worse prognosis in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC)*”, *Clin. Lung Cancer*, 2(3), pp. 1720-1729.
- [9] Dohmoto K., Hojo S., Fujita J., Ueda Y., Bandoh S., Yamaji Y., Ohtsuki Y., Dobashi N. and Takahara J. (2000), “*Mechanisms of the release of CYFRA21-1 in human lung cancer cell lines*”, *Lung Cancer*, 30(1), pp. 55-63.
- [10] Gube M., Taeger D., Weber D. G., Pesch B., Brand P., Johnen G., Müller-Lux A., Gross IM., Wiethage T., Weber A., Raithel HJ., Kraus T. and Brüning T. (2011), “*Performance of biomarkers SMRP, CA125, and CYFRA21-1 as potential tumor markers for malignant mesothelioma and lung cancer in a cohort of workers formerly exposed to asbestos*”, *Arch. Toxicol*, 85(3), pp. 185-192.
- [11] Gu J., Wang X., Zhao H., Zhu S., Wen Y., Xu H., Li L., Chen J. and Zhou Q. (2010), “*Diagnosis value of the detection of CYFRA21-1 in non-small cell lung cancer*”, *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 13(12), pp.1118-1121.

- [12] Huang W. W., Tsao S. M., Lai C. L., Su C. C. and Tseng C. E. (2010), “*Diagnostic value of Her-2/neu, CYFRA21-1, and carcinoembryonic antigen levels in malignant pleural effusions of lung adenocarcinoma*”, *Pathology*, 42(3), pp. 224-228.
- [13] Jin B., Huang A. M., Zhong R. B. and Han B. H. (2010), “*The value of tumor markers in evaluating chemotherapy response and prognosis in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer*”, *Chemotherapy*, 56 (6), pp. 417-423.
- [14] Molina R., Filella X., Augé J. M., Fuentes R., Bover I., Rifa J., Moreno V., Canals E., Vinolas N., Marquez A., Barreiro E., Borrás J. and Viladiu P. (2003), “*Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors*”, *Tumour Biol*, 24(4), pp. 209-218.
- [15] Patel J. L., Erickson J. A., Roberts W. L. and Grenache D. G. (2010), “*Performance characteristics of an automated assay for the quantitation of CYFRA21-1 in human serum*”, *Clin. Biochem*, 43(18), pp. 1449-1452.

RESULTS OF EPITOPE SEGMENT REPLICATION AND SEQUENCE DETERMINATION OF ANTIGEN GENES CYFRA21-1

Le Dinh Chac

ABSTRACT

Lung cancer is one of the serious diseases caused by the abnormal proliferation of cells, commonly found in men aged 50-70 . When studying the origin and development of lung cancer non-small cells, researchers have found that cancer is closely associated with the antigen concentration characterized CYFRA21-1 in the blood, tissue water and serum. Therefore, it is necessary that the gene encoding the antigen CYFRA21-1 be found and sequenced to serve as the basis for the obtainment of CYFRA21-1 recombinant protein which helps create KIT used for an early diagnosis of pulmonary cancer of non-small cell form. This would in turn help save life for patients.

In this study, sequenced nucleotides and amino acid of epitope segments of genes encoding antigens CYFRA21-1 and 100% these nucleotides and amino acid are 100% to similar the amino acid sequence in the International Data Bank coded K1C19- HUMAN-P08727.

Key words: *Lung cancer, gene encoding, CYFRA21-1, K1C19- HUMAN-P08727.*