Tác giả tự giới thiệu kết quả nghiên cứu

NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG SẢN XUẤT ERYTHROPOIETIN BẰNG CÁCH ĐỒNG CHUYỂN GEN epo VÀ GEN gfp VÀO TẾ BÀO CHO-K1

Tác giả: ***Trần Thị Như Mai, Bùi Ngọc Thúy, Phạm Thị Hoàng Oanh, Lê Trầm Nghĩa Thư, Quan Quốc Đăng, Đỗ Minh Sĩ***

Đơn vị chủ quản: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. HCM

Thời gian thực hiện: từ tháng 02/2011 cho đến nay.

TÓM TẮT: Erythropoietin (EPO) là một hormone tạo máu. Nó kích thích tủy xương sản xuất hồng cầu ở động vật hữu nhũ và được sử dụng trong điều trị thiếu máu liên quan đến bệnh suy thận mãn tính và điều trị ung thư. Để tăng năng suất trong sản xuất EPO thì việc chọn lọc được những dòng tế bào biểu hiện EPO cao là điều rất cần thiết. Vì vậy, phương pháp đồng chuyển được sử dụng để chuyển pEPO và pGFP(*) vào tế bào CHO-K1(**) bằng lipofectamine. Tỉ lệ phù hợp cho việc chuyển gen là 1pGFP:3pEPO với 1µg lượng DNA tổng. Sau khi có sự biểu hiện protein tạm thời, tế bào được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc với 100 µg/ml zeocin trong hai tuần nhằm chọn lọc được những tế bào có vector nguyên vẹn đã sáp nhập ổn định vào DNA tế bào chủ. Sau đó, dựa vào sự biểu hiện của GFP, các tế bào biểu hiện EPO cao được phân tách bằng phương pháp FACS(1). Cuối cùng, nồng độ EPO được tiết ra từ các tế bào chuyển gen ổn định được định lượng bằng phương pháp ELISA(2) gián tiếp trước và sau khi chạy FACS. Lượng EPO sản xuất đã tăng đáng kể từ 8,1 đến 20,4 pg/tế bào/ngày ở lần chạy FACS1 và 24,6 ở lần chạy FACS2.

1. MỞ ĐẦU

Suy thận mạn (Chronic kidney disease - CKD) là hội chứng thận mất chức năng dần dần và ngày càng nặng theo thời gian. Nguyên nhân chủ yếu của thiếu máu là sự thiếu hụt sản sinh EPO do suy thận mạn. Ngoài ra còn do những yếu tố góp phần như thiếu sắt, các yếu tố liên quan đến mất máu, bệnh viêm, nhiễm khuẩn.

EPO đã được đưa vào sản xuất thương mại và mang lại lợi nhuận khổng lồ, ví dụ như công ty Genentech's (Vacaville, CA, Mỹ), chỉ với một mặt hàng duy nhất là thuốc chữa bệnh thiếu máu do suy thận EPOGEN (AMGEN), bản chất là EPO tái tổ hợp sản xuất từ tế bào CHO đã thu lợi trung bình hàng năm là 6,5 tỉ USD. EPO tái tổ hợp người được dùng để điều trị thiếu máu ở bệnh nhân suy thận mạn từ năm 1986 dưới tên là Epo, Epoetin, Eprex.

Nhu cầu EPO ở Việt Nam hiện nay rất lớn nên cần có một sản phẩm EPO có chất lượng tương đương và giá thành hợp lý. Do đó việc tạo ra một dòng tế bào biểu hiện mức EPO cao như một nguồn nguyên liệu ban đầu trong công nghệ sản xuất EPO là cần thiết. Tuy nhiên, theo phương pháp truyền thống - tạo dòng tế bào đơn bằng phương pháp pha loãng tới hạn đòi hỏi rất nhiều thời gian và có thể mất đi một số lượng đáng kể các tế bào có biểu hiện EPO cao. Nghiên cứu đã rút ngắn thời gian và tăng năng suất trong việc phân tách các tế bào có biểu hiện mức độ cao.

2. VẬT LIỆU-PHƯƠNG PHÁP

2.1. Tế bào, vector, hóa chất, thiết bị

Tế bào CHO-K1 (ATCC CCL61), hóa chất dùng để nuôi cấy tế bào Ham's F12, chuyển gen lipofectamin, ELISA, FACS của

(*): Green Fluorescent Protein; (**): Chinese Hamster Ovary

(1): Flousescence Activated Cell Sorting; (2): Enzyme - Link Immuno Sorbent Assay

các hãng Sigma, Fermentas, Invitrogen… được pha tùy theo mục đích sử dụng và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách dòng tế bào theo phương pháp flow cytometry

Phương pháp flow cytometry được sử dụng để tách những tế bào biểu hiện cao dựa trên sự phát sáng của protein huỳnh quang. Các tế bào đã được tách ra này được kiểm tra sự biểu hiện EPO bằng phương pháp ELISA. Để chắc chắn thu được những tế bào mong muốn, những tế bào có mức độ biểu hiện cao, các tế bào sau chuyển gen được phân loại 2 lần bằng phương pháp flow cytometry và tiến hành kiểm tra EPO biểu hiện sau mỗi lần phân loại.

2.2.2. Đánh giá sự biểu hiện EPO bằng phương pháp ELISA gián tiếp

Phương pháp ELISA gián tiếp được sử dụng để kiểm tra sự biểu hiện tạm thời và sự biểu hiện ổn định của gen EPO. Phương pháp này được sử dụng để xác định số lượng EPO được tạo ra trên một ngày của một tế bào để phân tách những tế bào biểu hiện EPO ở mức cao.

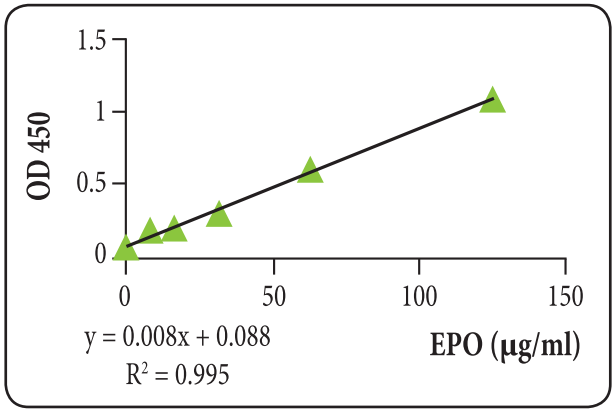
2.2.3. Phân tích dữ liệu

Dữ liệu được phân tích bằng phương pháp thống kê ANOVA với phần mềm SPSS ver.19. Các kết quả được chia thành 2 nhóm. Nhóm thứ nhất, sau khi chuyển gen vào các tế bào, mức EPO của các tế bào chuyển gen tạm thời và ổn định được kiểm tra để lựa chọn một nhóm có sự biểu hiện EPO cao nhất. Nhóm thứ hai, sau khi lựa chọn các tế bào biểu hiện EPO cao nhất, các tế bào này được sàng lọc theo phương pháp flow cytometry và sau đó kết quả được phân tích để đánh giá mức EPO sau khi sàng lọc.

3. KẾT QUẢ

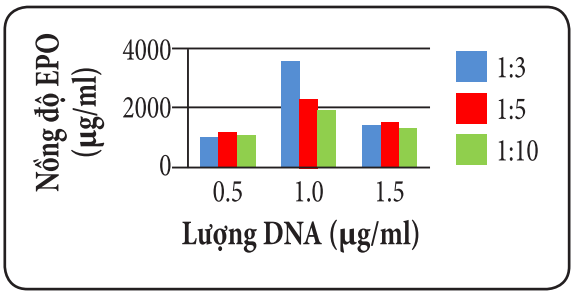
3.1. Xác định hàm lượng EPO bằng phương pháp ELISA

Môi trường nuôi cấy tế bào chuyển gene ổn định được thu nhận sau 72 giờ để tiến hành làm ELISA nhằm xác định hàm lượng EPO do tế bào tiết ra. Đồ thị tuyến tính y = 0.008x + 0.088 (hình 3.1) đã được xây dựng từ giá trị OD (Giá trị mật độ quang) của các nồng độ chuẩn EPO từ 0-500 ng/ml nhằm đo hàm lượng EPO thu được từ các mẫu tế bào nuôi cấy.



Hình 3.1. Đồ thị biểu diễn kết quả OD_{450} theo các nồng độ EPO chuẩn

So sánh nồng độ trung bình EPO được sản xuất giữa các dòng tế bào, kết quả cho thấy tổng lượng DNA dùng trong chuyển gen cho hiệu quả tốt nhất là 1µg, trong đó, dòng tế bào có tỉ lệ GFP:EPO là 1:3 sản xuất EPO nhiều nhất (hình 3.2). Do đó, dòng tế bào này được chọn sử dụng cho thí nghiệm kế tiếp.

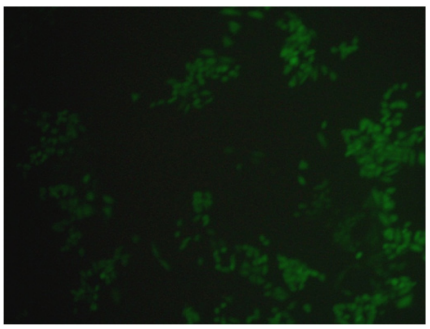


Hình 3.2. Biểu đồ so sánh nồng độ EPO được tiết giữa các dòng tế bào chuyển gen theo tỉ lệ và lượng DNA

3.2. Sàng lọc tế bào biểu hiện EPO cao

Sau khi chuyển gen thành công, tiến hành thu nhận những tế bào biểu hiện EPO mạnh. Theo kết quả của thí nghiệm trên, dòng tế bào có tỉ lệ GFP:EPO là 1:3 được sử dụng để sàng lọc ra những tế bào biểu hiện EPO mạnh.

Phương pháp FACS được sử dụng để thu nhận những tế bào biểu hiện EPO mạnh bằng cách phân lập những tế bào biểu hiện GFP. Những tế bào biểu hiện GFP được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (hình 3.3). Nồng độ EPO của mẫu sẽ được tính toán theo công thức x = (y + 0.088)/0.008 (Bảng 3.1).

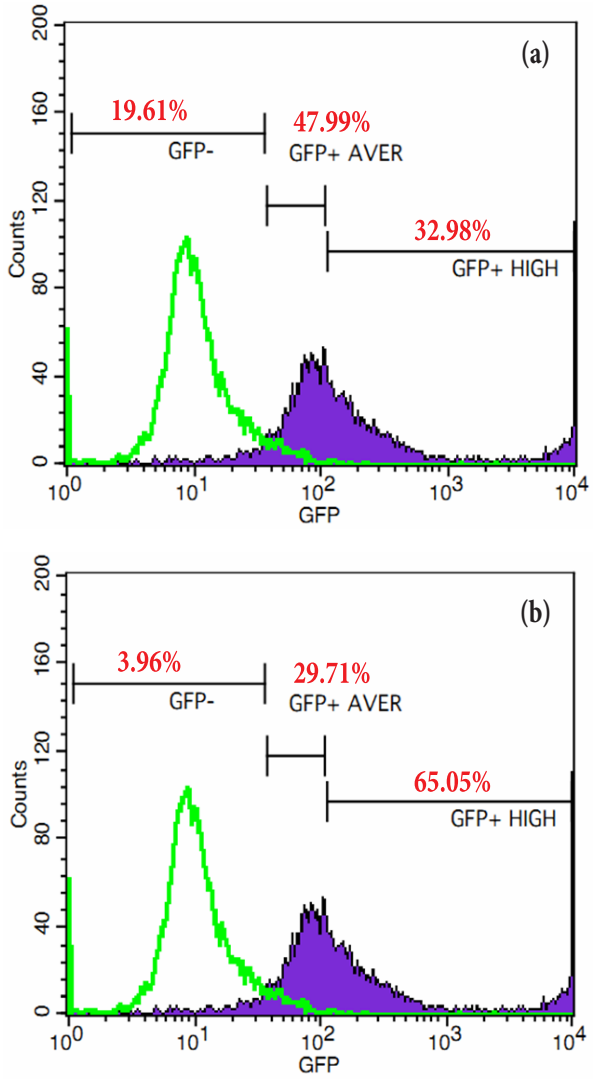


Hình 3.3. Tế bào chuyển gen biểu hiện *gfp* sau 10 ngày chọn lọc

Tế bào được đưa vào máy FACS để thu nhận những tế bào có biểu hiện GFP. Việc sàng lọc được lập lại 2 lần. Tế bào trước và sau mỗi lần sàng lọc đều được đánh giá khả năng tiết EPO thông qua phương pháp ELISA. Tế bào sau khi thu nhận sẽ được nuôi duy trì trong môi trường Ham/F12 có bổ sung 5% FBS, 50 µg/ml Zeocin.

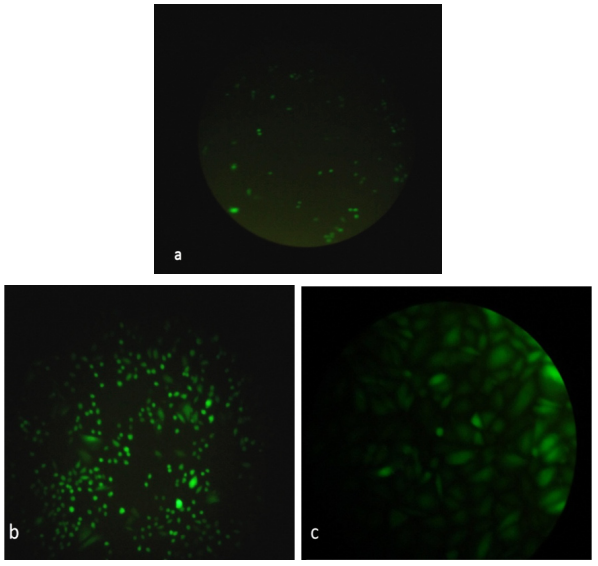
Bảng 3.1. Nồng độ EPO được sản xuất tương ứng với các dòng tế bào chuyển gen theo tỉ lệ và lượng DNA (µg/ml)

GFP : EPO	Lượng DNA (µg)		
	0.5	1	1.5
1:3	974.5 ± 141.6	3602.62 ± 205.9	1503.9 ± 197.0
1:5	1131.9 ± 232.9	2783.18 ± 411.4	1557.9 ± 191.2
1:10	1079.5 ± 197.4	2343.83 ± 220.4	1357.3 ± 608.5
Chứng trắng	0.018	0.096	0.102



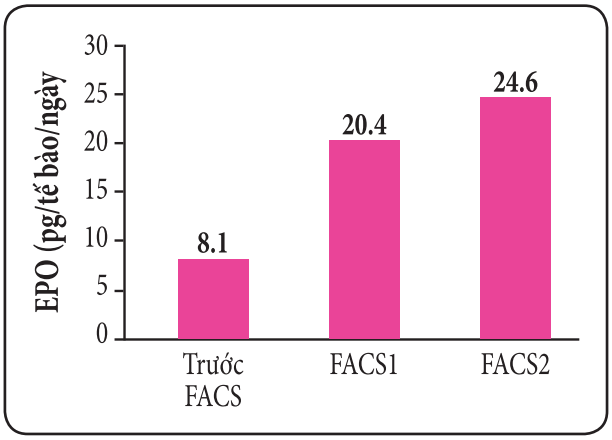
Hình 3.4. Kết quả sàng lọc bằng phương pháp FACS (a: lần 1, b: lần 2)

Kết quả FACS và quan sát tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy, trước khi sàng lọc, trong quần thể tế bào, tỉ lệ tế bào không biểu hiện GFP đạt 19,6%, tỉ lệ tế bào biểu hiện GFP đạt khoảng 80%, trong đó 47,99% tế bào biểu hiện GFP ở mức trung bình, 32,98% tế bào biểu hiện GFP ở mức cao, mức độ phát sáng không ổn định ở các tế bào. Sau khi sàng lọc, tỉ lệ tế bào không biểu hiện GFP giảm mạnh (đạt 3,96%), tỉ lệ tế bào phát huỳnh quang tăng rõ rệt, đạt khoảng 95%, trong đó, tỉ lệ tế bào biểu hiện GFP ở mức trung bình giảm (đạt 29,71%), tỉ lệ tế bào biểu hiện GFP cao tăng (đạt 65,05%) (hình 3.4 a, b), cường độ phát sáng mạnh (hình 3.5). Điều này cho thấy sau 2 lần sàng lọc, dòng tế bào thu được hầu hết biểu hiện GFP.



Hình 3.5. Tế bào biểu hiện GFP trước và sau FACS
a. Trước FACS; b. FACS lần 1; c. FACS lần 2

Nồng độ EPO được sản xuất cũng tỉ lệ thuận với mức độ biểu hiện GFP của dòng tế bào (hình 3.6). Vì mật độ tế bào trong các đĩa nuôi qua các lần sàng lọc không bằng nhau nên nồng độ EPO ng/ml được chuyển sang đơn vị pg EPO/tế bào/ngày. Sau lần sàng lọc đầu tiên, lượng EPO tiết ra của 1 tế bào trong 1 ngày tăng mạnh (8,1 đến 20,4 pg EPO/tế bào/ngày). Sau lần sàng lọc thứ 2, lượng EPO tiết ra tiếp tục tăng nhẹ (20,4 đến 24,6 pg EPO/tế bào/ngày). Điều này cho thấy, dòng tế bào biểu hiện GFP càng mạnh, nồng độ EPO được tiết ra càng cao.



Hình 3.6. Lượng EPO do 1 tế bào tiết trong 1 ngày trước và sau FACS

4. KẾT LUẬN

Đồng chuyển thành công gen *epo* và GFP vào dòng tế bào CHO-K1 và chọn được tỉ lệ 1 GFP : 3 EPO và nồng độ gen chuyển 1 µg cho kết quả tốt nhất để tiến hành sàng lọc tế bào biểu hiện EPO bằng phương pháp FACS. Sau khi sàng lọc tế bào, lượng EPO tiết ra tăng từ 20,4 đến 24,6 pg EPO/tế bào/ngày. Những dòng tế bào biểu hiện EPO ở mức cao này có thể được sử dụng như một nguồn nguyên liệu để sản xuất EPO theo quy mô lớn sau này. Như vậy chỉ trong một thời gian ngắn là 3 tuần, đã thu được những dòng tế bào biểu hiện EPO ở mức cao bằng phương pháp FACS, nhanh hơn rất nhiều so với phương pháp tạo dòng tế bào bằng phương pháp pha loãng tới hạn (10-12 tuần) (Thu, 2010) và lượng protein tiết ra cao hơn rất nhiều 20,4 đến 24,6 pg EPO/tế bào/ngày so với 2,055 ± 0,015 pg EPO/tế bào/ngày (Thu, 2010).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carlos Alberto Penno, Yoshinori Kawabe, Akira Ito and Masamichi Kamihira, Production of Recombinant Human EPO and EPO/Fc Fusion Proteins by Chinese Hamster Ovary Cells, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, 2010, Volume 16, 197-202, DOI: 10.1007/978-90-481-3892-0_32
2. Florian Wurm and Alain Bernard, Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production, Current Opinion in Biotechnology, Volume 10, Issue 2, 1 April 1999, Pages 156-159
3. Lê Trầm Nghĩa Thư, Sản xuất Erythropoietin thông qua quá trình chuyển gen trên tế bào CHO-K1 (CHINESE HAMSTER OVARY), Tạp chí Khoa học và Phát triển 2010 2010, 8(3):498 - 504.
4. Lê Trầm Nghĩa Thư, Tạo dòng ổn định tế bào CHO-K1 mang gene tPA (tissue plasminogen activator), Tạp chí Công nghiệp 2010, 4(3): 52-58.
5. Spivak JL, Recombinant human erythropoietin and the anemia of cancer, Blood, 1994 84: 997-1004
6. Spivak JL., "The biology and clinical applications of recombinant erythropoietin), Seminars on oncology, 1998 Jun;25(3 Suppl 7):7-11
7. Wurm, F. M., "The industry's workhorses-Mammalian expression systems," Modern biopharmaceuticals, Wiley-VCH, Weiheim, 3, pp. 723–759 (2005).❐

Ai thắng ai?

Một luật sư nổi tiếng đi săn vịt trời ở ngoại ô thành phố. Ông ta bắn được một con vịt nhưng nó lại rơi vào một nông trại. Luật sư trèo qua hàng rào vào bên trong nông trại, một nông dân trên chiếc xe máy cày chặn lại ông lại:

- Ông vào đây làm gì?

- Tôi đã bắn được một con vịt, nó rơi vào đây và tôi đến để lấy lại nó.

- Nhưng đây là đất của tôi, và ông không thể làm như vậy được.

- Tôi là luật sư giỏi nhất thành phố đấy, nếu ông không để tôi lấy con vịt tôi sẽ đưa ông ra tòa.

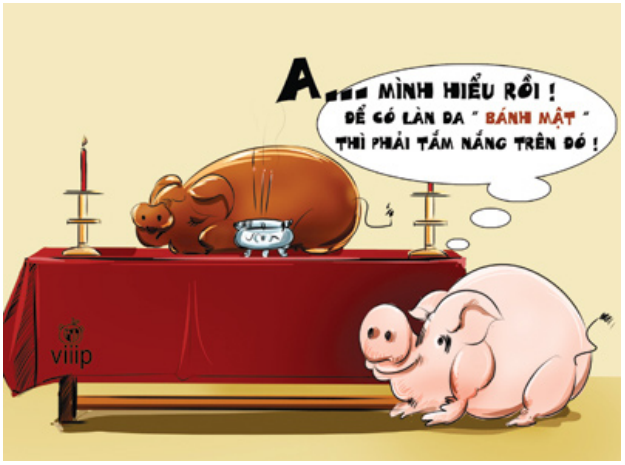
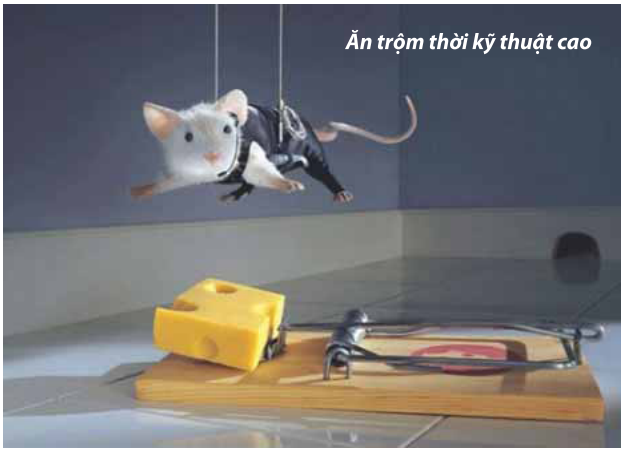
- Hình như ông không biết luật lệ ở đây, chúng tôi giải quyết những mâu thuẫn nhỏ bằng một trò chơi - Người nông dân cười rồi nói.

- Nó như thế nào - Viên luật sư hỏi.

- Là như vầy, trước tiên tôi sẽ đá ông ba cái và sau đó ông đá lại tôi cũng ba cái, cứ như vậy cho tới khi một người không còn chịu nổi nữa.

Viên luật sư nghĩ thầm và quyết định chơi trò đó, ông ta nghĩ rằng có thể dễ dàng hạ gục người nông dân già kia. Người nông dân tiến tới gần luật sư, đá cho ông ta ba cái trời giáng bổ nhào. Viên luật sư đầy căm hờn, loạng choạng đứng dậy nói:

- Và bây giờ lão già kia, tới lượt ta rồi.

- Không, tôi xin chịu thua rồi. Ông lấy con vịt đi - Người nông dân mỉm cười nói.

(Sưu tầm)