

TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ PHỔI, CYFRA 21.1

LÊ ĐÌNH CHẮC

Đại học Hồng Đức, Thanh Hoá

LÃ THỊ HUYỀN, LÊ QUANG HUẤN

Viện Công nghệ sinh học

Ung thư phổi có thể phân 2 dạng: ung thư tế bào nhỏ (small cell lung cancer, SCLC) và ung thư tế bào không nhỏ (non-small cell lung cancer, NSCLC). Các kháng nguyên thường được sử dụng như những chỉ thị để chẩn đoán ung thư phổi là: kháng nguyên xuất hiện trên các tế bào thần kinh (neuron specific enolase, NSE), kháng nguyên xuất hiện trên tế bào mầm (carcinoembryonic antigen, CEA), cytokeratin 19, kháng nguyên xuất hiện ở các tế bào vảy (squamous cell carcinoma antigen, SCC), kháng nguyên CA 125 và kháng nguyên polypeptide đặc hiệu mô (TPA) [1, 2].

NSE là một izoenzyme của enolaza được cấu tạo bởi 2 chuỗi polypeptide gần như đồng nhất, mỗi chuỗi có khối lượng phân tử là 39kDa và được tạo ra trong các neuron thần kinh trung tâm và ngoại biên, trong các khối u ác tính có nguồn gốc thần kinh ngoại bì. Ngoài ra, NSE còn được tìm thấy trong các tế bào hồng cầu, huyết tương và các tiểu cầu. CEA là một glucoprotein có khối lượng phân tử khoảng 180 kDa được tạo ra trong quá trình phát triển của phôi và bào thai. CEA là một trong các chỉ thị được phát hiện có liên quan tới các khối u trong ung thư đại tràng, ung thư vú, ung thư dạ dày và ung thư phổi. SCC là một protein có khối lượng phân tử 48 kDa và có sự tương đồng rất cao với các chất ức chế protease thuộc họ serpin. Nồng độ của SCC trong huyết thanh được sử dụng trong chẩn đoán các bệnh ung thư cổ tử cung, ung thư thực quản, ung thư đầu, ung thư cổ và đặc biệt là ung thư phổi. CA 125 là một protein có khối lượng phân tử khoảng 200 kDa và thường được sử dụng làm chỉ thị trong chẩn đoán ung thư buồng trứng, ung thư vú và ung thư phổi. TPA cũng giống như CEA là các dấu hiệu đã được biết đến từ lâu. Xác định hàm

lượng TPA thông qua xác định hàm lượng hỗn hợp các cytokeratins 8, 18 và 19 [3].

CYFRA 21.1 là một chỉ thị mới, đặc hiệu cho các ung thư phổi dạng NSCC. Kháng nguyên CYFRA 21.1 là một phân đoạn của cytokeratins 19 (CK19), tồn tại dưới dạng hòa tan trong huyết thanh, nên CYFRA21.1 được xem là một kháng nguyên rất hữu ích trong chuẩn đoán bệnh ung thư phổi khi sử dụng kháng thể đơn dòng kháng lại CK19 [4, 5].

Để tạo kháng thể tái tổ hợp kháng lại kháng nguyên CYFRA21.1 sử dụng trong chẩn đoán sớm bệnh ung thư phổi, chúng tôi đã nhân bản gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21.1 từ bệnh phẩm bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi. Trong công trình này chúng tôi thông báo kết quả tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa kháng nguyên CYFRA21.1 từ máu bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi dạng NSCLC.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tách chiết ARN từ máu theo Kit S.N.A.P của hãng Invitrogen. Quy trình nhân đoạn gen CK19 từ RNA tổng số được tiến hành theo kit "one-step RT-PCR" của hãng Invitrogen với cặp môi CYFRAF: 5'-aagctaaccatgcagaacctcaacgac cgc-3' và CYFRAR: 5'-ttattggcaggtcaggagaaga gcc.

Phương pháp gắn sản phẩm PCR vào vector Topo-TA-PCRTM2.1 tiến hành theo kit của hãng Invitrogen.

Xác định trình tự gen được tiến hành theo phương pháp của Sanger và cs 1981, trên máy xác định trình tự gen tự động ABI PRISM® 3100-Avant tại Viện Công nghệ Sinh học.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách ARN tổng số từ máu bệnh nhân ung thư phổi

Trong đề tài này, mẫu máu (sau đây gọi là bệnh phẩm) của bệnh nhân đã chẩn đoán mắc bệnh ung thư phổi bằng các phương pháp miễn dịch được sử dụng làm nguyên liệu tách chiết ARN tổng số. ARN tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% (hình 1).



Hình 1. Ảnh điện di ARN tổng số trên gel agarose 1%

Giếng 1, 2, 3. ARN tổng số tách chiết từ máu bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi

Theo lý thuyết, quá trình sao mã (transcription) ở sinh vật nhân chuẩn xảy ra trong nhân và tạo ra các ARN vận chuyển (tARN), ARN ribosome (rARN) và ARN thông tin (mARN). Trong ba loại ARN này thì rARN thường được tổng hợp nhiều hơn cả và có các thành phần là rARN 28S, rARN 18S, rARN 5,8S. Do đó, khi điện di ARN tổng số có thể xuất hiện ba băng sáng hơn trên các đường chạy điện di, tương ứng với các rARN 28S, 18S và 5,8S. Tuy nhiên, để đánh giá chất lượng mẫu ARN tách chiết người ta quan tâm tới hai băng rARN 28S và rARN 18S vì sự xuất hiện các băng này thể hiện mẫu ARN tách được khá nguyên vẹn. Như vậy, có thể khẳng định rằng chúng tôi đã tách chiết được ARN tổng số từ bệnh phẩm khá nguyên vẹn bảo đảm cho các nghiên cứu tiếp theo. Theo tính toán lý thuyết mARN chỉ chiếm tỉ lệ nhỏ (2-8%) trong mẫu ARN tổng số nhưng cũng đủ để nhân bản gen quan tâm khi sử dụng phản ứng RT-PCR với khuôn (template) là mẫu ARN tổng số.

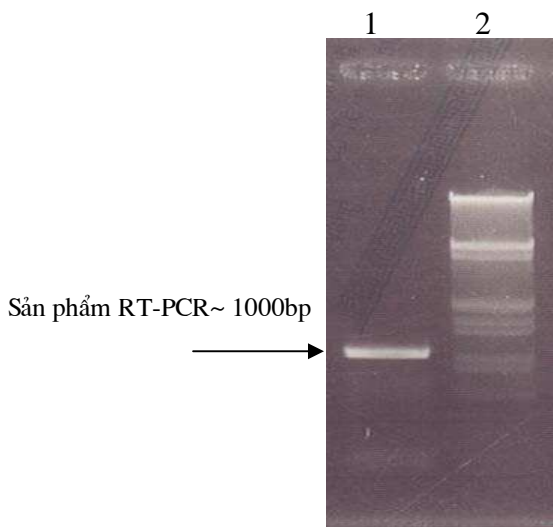
2. Nhân bản gen mã hoá kháng nguyên CYFRA21.1

Theo nguyên tắc, một gen mã hoá cho một protein phải được phiên mã thành mARN trước khi được dịch mã. Ở sinh vật nhân chuẩn, cấu trúc của đa số các gen thường bao gồm các đoạn intron không mã hoá xen kẽ với các đoạn exon mã hóa. Gen CK19 gồm 6 exon xen kẽ 5 vùng intron [6]. Do đó, quá trình phiên mã thường tạo ra các phân tử mARN có kích thước lớn gọi là các tiền mARN. Các tiền mARN này được hiệu chỉnh sau dịch mã: loại bỏ các đoạn trình tự intron, tạo mũ đầu 5' và gắn đuôi poly A ở đầu 3', cuối cùng là tạo ra phân tử mARN hoàn chỉnh. Tiếp theo, phân tử mARN sẽ được chuyển ra ngoài tế bào chất để tham gia vào quá trình dịch mã tạo ra các phân tử protein. Vì thế, khi chúng ta muốn tạo ra một protein tái tổ hợp mà nguồn gen từ các sinh vật nhân chuẩn thì phải nhân bản gen mã hoá cho protein đó từ mARN hoàn chỉnh. Một cách khác, chúng ta có thể tạo thư viện cDNA sau đó nhân bản gen mong muốn từ thư viện này.

Trong nghiên cứu của mình, chúng tôi tiến hành nhân cDNA mã hoá cho CYFRA21.1 từ mARN có trong ARN tổng số thu được ở trên thông qua phản ứng RT-PCR.

Phản ứng RT-PCR, trên cơ sở của phản ứng PCR, gồm hai giai đoạn chính. Đó là giai đoạn tổng hợp cDNA (complementary DNA) nhờ sự xúc tác của enzym phiên mã ngược và mỗi (thường thì các oligo T được sử dụng như là các môi nhân gen, hoặc cũng có thể sử dụng mỗi ngẫu nhiên - ADN random primer) và giai đoạn thứ hai là giai đoạn tổng hợp ADN trên sợi khuôn là cDNA. Ở giai đoạn thứ nhất, hầu hết các loại mARN đều tạo nên cDNA của chúng. Trong giai đoạn thứ hai, các cDNA mang trình tự mã hoá cho protein mong muốn được khuếch đại nhiều lần dưới tác dụng của *Taq*-ADN polymerase và cặp mồi đặc hiệu.

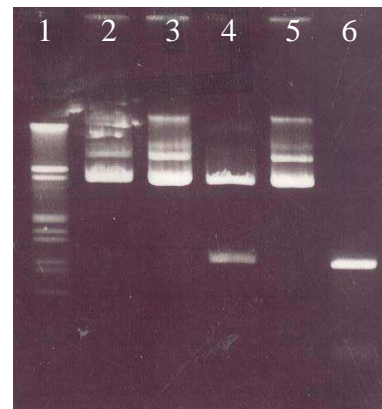
Phản ứng RT-PCR được tiến hành trên máy PCR với chu trình nhiệt như sau: bước 1: 50°C, 30 phút; bước 2: 94°C, 2 phút; bước 3: 94°C, 15 giây; bước 4: 57°C, 30 giây; bước 5: 72°C, 1 phút 30 giây; bước 6: lặp lại 30 chu kỳ từ bước 3; bước 7: 72°C, 8 phút; sau đó sản phẩm giữ ở 4°C. Sản phẩm phản ứng RT-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 2).



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose 1%
Giếng 1. Sản phẩm RT-PCR; 2. Thang ADN chuẩn 1 kb.

Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy trên đường chạy thứ nhất xuất hiện một băng sáng đậm, so với thang ADN chuẩn thì băng này có kích thước khoảng trên 1000 bp. Kết quả này không mâu thuẫn với tính toán lý thuyết về độ dài của gen CYFRA21.1. Như vậy, chúng tôi cho rằng gen mã hoá cho CYFRA21.1 đã được nhân bản. Tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần phải tách dòng và xác định được trình tự gen đã nhân bản và so sánh với trình tự gen CYFRA21.1 đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế.

Kết quả tách dòng gen CYFRA21.1 và cắt kiểm tra bằng enzym giới hạn *EcoRI* được thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Kiểm tra kết quả tách dòng gen CYFRA21.1 trên gel agarose 1%

Ghi chú: giếng 1. Thang ADN chuẩn 1kb; 2, 3. ADN plasmid chứa gen CYFRA21.1; 4. ADN plasmid cắt enzym *EcoRI*; Giếng 6: Sản phẩm RT-PCR.

Trên ảnh điện di (hình 3) ta thấy ADN plasmid tách từ khuẩn lạc trắng được chọn ra để xử lý bằng enzym *EcoRI* đã xuất hiện một đoạn ADN có kích thước tương đương kích thước của sản phẩm phản ứng RT-PCR và có kích thước vào khoảng hơn 1000 bp khi so với ADN chỉ thị (Marker ADN λ cắt với enzym *HindIII* và *EcoRI*).

Như vậy, có thể khẳng định rằng sản phẩm RT-PCR đã gắn được vào vectơ tách dòng pCR 2.1, nói cách khác kết quả tách dòng gen mã hoá CYFRA21.1 đã được thực hiện thành công, tuy nhiên để khẳng định cần xác định trình tự nucleotit của sản phẩm RT-PCR.

Trình tự nucleotide sản phẩm nhân bản RT-PCR đã được xác định cụ thể như sau:

```

AAGCTAACCA  TGCAGAACCT  CAACGACCGC  CTGGCCTCCT  ACCTGGACAA  GGTGCACGCC  CTGGAGGCAG
CCAACAGCAA  GCTGGAGGTG  AAGCTCCGTG  ACTAGTACCA  GAAGCAGGGG  CACAGGCCCT  CCCACAAC TA
CAGCCACTAC  TACAGGACCA  TCGAGGACCT  GCGGGACAAG  ATTCTTGGTG  CCACCATTGA  GAACGCCAGG
ATTGTCCTGC  AGATCAACAA  TGCTCAACTG  GCTGCACATG  ACTTCTGAAC  CAAGTTTGGT  TTGAGTGT TT
GGGTGCTGGA  TGAGGTGACC  CTGGCCAGGA  CTGATCTGGA  GGCACAGATC  AAAGGCCTGA  AGGAAGAGCT
GGCCTACCTG  AAGAAGAAGC  ATGAGGAGGA  AATCAATGCC  CTGAGGGGCC  AAGTGGGAGA  CCAGGTCCAT
GTGAGGGTGG  ATTCAGCTCG  GACCTGCCAA  GATCCTGAGT  GACAGGCAA  GCCAATATGA  GATCATGGCC
AAGCAGAACT  GGAAGGATGC  TGAAGCCTGG  TTCACCAGCT  GGAAGGACAC  TGGCAGAAAC  AGAGGCATGC
GCCACATAGA  GCAGCTCCAG  ATAAGCAGGT  CCGAGGTCAC  TGACCTGCAG  TGCACCCTCC  AGGGTCTTGA
GATTGAGCTG  CACTCGCAGC  TCAGCGTGAA  AGCTCCCTTA  GAAGGCACAC  TGGCAGAAAC  AGAGGCATGC
TTTGGAGCCC  AGCTGGTGCA  GATCCAGGCA  CTGATCAGCA  GTATTGAAGC  CCAGCTGGGC  GATGTGCGAG
CTGATGGGTG  GTGGCAGAAT  CAGGAGTACC  AGCGGCTCCT  GGAGCAGGAG  ATCGCCACCT  ATCGCAGCCT
GCTTGAGGGC  CAGGAAGATC  ATTACAACAA  CCTGTCCACC  TCCAAGGTCC  TCTGAGGCTG  CAGGCTCTGG
GGCCTCTGCT  CAGCTCAAAG  CACGTCTCCT  GGGTAGGAGG  ATGGGAAGGA  AGAGACCCTT  ACCCCTGGCT
CTTCTCCTGA  CCTGCCAATA  A

```

Trình tự nucleotide của sản phẩm thu được có độ tương đồng là 99,82% khi so sánh với trình tự nucleotide của gen CYFRA21.1 có số đăng ký AB041270 đã được công bố trong Ngân hàng gen quốc tế. Sự sai khác được xác định tại một vị trí nucleotide G766C (G được thay thế bởi C).

Từ các kết quả trên có thể khẳng định rằng chúng tôi đã nhân bản được gen CYFRA21.1 mã hóa cho kháng nguyên cytokeratin CYFRA21.1 từ bệnh phẩm của bệnh nhân ung thư phổi.

Như chúng ta đã biết cytokeratin là họ các polypeptit đa gen. Người ta đã xác định được trên 20 loại cytokeratin biểu hiện trong các tế bào biểu mô bình thường, tế bào khối u và các tế bào nuôi cấy [8]. CK19 với khối lượng phân tử khoảng 40 kDa được sử dụng như một chỉ thị về sự di chuyển của các tế bào biểu mô để chẩn đoán sự di căn của các ung thư. CYFRA21.1 là một phân đoạn của CK19 tồn tại dưới dạng hòa tan trong huyết thanh, nên CYFRA21.1 được xem là một kháng nguyên rất hữu ích trong chẩn đoán ung thư phổi và đã được chứng minh là rất thích hợp trong chẩn đoán ung thư tế bào hình vảy của phổi [8, 9]. Như vậy, với kết quả nhân bản được gen CYFRA21.1 từ bệnh phẩm đã ủng hộ kết luận bệnh nhân đã mắc bệnh ung thư phổi.

III. KẾT LUẬN

1. RNA tổng số được tách từ bệnh phẩm ung

thư phổi có độ tinh sạch cần thiết cho các thí nghiệm tiếp theo. Đã nhân bản thành công gen mã hoá cho kháng nguyên CYFRA21.1 bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi CYFRAF/CYFRAR.

2. Đã tách dòng và xác định trình tự nucleotide gen mã hoá cho kháng nguyên CK19. Kích thước đoạn gen đã tách dòng là 1001 bp và có độ tương đồng là 99,82% so với trình tự gen mã hoá cho kháng nguyên CYFRA21.1 đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế với số đăng ký AB041270.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Sanger F. et al.**, 1981: *Nature*, 290: 457-465.
2. **Debus E. et al.**, 1984: *Am J. Pathol*, 114: 121-130.
3. **Broers J. L. et al.**, 1988: *Cancer Res*, 48: 3221-3229.
4. **Akoun G. et al.**, 1985 : *Chest*, 87: 39-43.
5. **Ebert W. et al.**, 1989: *frztl Lab*, 35: 1-10.
6. **Wu F. et al.**, 2002: *International Journal of Oncology*, 20: 31-37.
7. **Stieber P. et al.**, 1993: *Cancer Res*, 53: 61-66.
8. **Satoh H. et al.**, 1997: *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.*, 16: 597-604.

CLONING AND SEQUENCING OF GENE CODING ANTIGEN OF LUNG CANCER, CYFRA 21-1

LE DINH CHAC, LA THI HUYEN, LE QUANG HUAN

SUMMARY

Cytokeratin 19 (CK19), with a molecular weight of 40 kDa, is the specific cytoskeletal structure of simple epithelia. CK19 has been used as a marker of circulating epithelial cells to diagnose cancer metastasis since it is probably one of the most suitable markers for cancer. One of the fragments of CK19, CYFRA 21-1, has been introduced as a tumor marker for primary lung cancer and proven suitable for the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung.

We have amplified the gene encoding for CYFRA 21-1 from the lung cancer samples by RT-PCR technology with the specific primers. The gene sequence has a length of 1001 bp and its homology with the gene sequence CYFRA 21.1 (accession number AB041270) from the GenBank data is 99.82%. This sequence has one point mutation G766C when compared with CYFRA 21-1 gene sequence from the GeneBank.

Ngày nhận bài: 27-8-2008