

BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN CD25 TÁI TỔ HỢP TRONG VI KHUẨN *E. COLI*

Lã Thị Huyền, Nguyễn Phương Hoa, Đặng Thị Thu, Lê Quang Huân

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

CD25 hay IL-2R α (tiểu phần α của thụ thể IL-2) xuất hiện với nồng độ cao trên bề mặt các tế bào ung thư máu (ung thư dạng Hodgkin, ung thư dòng tủy mạn tính, ung thư tế bào tua, ung thư tế bào T người trưởng thành,...), các tế bào T gây bệnh (bệnh tự miễn và bệnh nhân ghép tạng), CD25 là đích để tiêu diệt các tế bào gây bệnh và tế bào bệnh lý. Đặc biệt hơn, CD25 còn tồn tại ở dạng tự do với hàm lượng cao trong huyết thanh của các bệnh nhân như một marker cho việc chẩn đoán và tiên lượng bệnh. Nghiên cứu này thực hiện nhằm thu được lượng lớn CD25 của người tái tổ hợp. Do vậy, chúng tôi tiến hành PCR nhân bản đoạn gen mã hóa cho phần ngoại bào của CD25, tách dòng xác định trình tự. Vector biểu hiện pET-22b(+)/CD25 được thiết kế và biểu hiện thành công thu protein CD25 tái tổ hợp ở chủng biểu hiện BL21(DE3) với điều kiện nuôi cấy trong môi trường LB ở 30°C khi OD₆₀₀ đạt 0,8, các tế bào được cảm ứng với IPTG nồng độ cuối cùng 1 mM và thu mẫu sau 5 h cảm ứng. Mẫu protein CD25 được tinh sạch nhờ cột sắc kí Ni-resin và xác định cấu trúc bậc nhất bằng kĩ thuật khối phổ. Kết quả thu được kháng định chắc chắn chúng tôi đã thu nhận được protein CD25 tinh sạch bằng công nghệ gen, đảm bảo cho các nghiên cứu xa hơn.

Từ khóa: CD25, *E. coli*, pET-22b(+), tái tổ hợp, ung thư máu

ĐẶT VẤN ĐỀ

CD25 là tiểu phần α trong hệ thụ thể của Interleukin-2 (IL-2). Ở người, gen mã hóa cho phân tử này nằm trên nhiễm sắc thể số 10 tại vị trí 10p15-p14. Protein CD25 mới được tổng hợp có 272 amino acid (aa) bao gồm phần tín hiệu tiết 21 aa và 251 aa còn lại thuộc phân tử protein trưởng thành. Ba phần của thụ thể α là: phần ngoài màng, trong màng và trong tế bào gồm 219, 19 và 13 aa tương ứng (Waldmann, 1991; Murakami, 2004). Các tiểu phần γ và β tham gia cấu trúc nên nhiều thụ thể của các interleukin khác, riêng tiểu phần α (CD25) chỉ tham gia vào cấu tạo thụ thể của IL-2. Khi tiểu phần CD25 xuất hiện sẽ làm tăng ái lực liên kết của hệ thụ thể với IL-2 lên 100 lần. Do đó, nhờ có CD25 mà các tế bào được kích thích tăng sinh và biệt hóa, tăng khả năng tạo ra và tiết các kháng thể.

Là một phân tử tín hiệu miễn dịch chìa khóa, với vai trò của mình CD25 là một phân tử đích hữu ích trong y học. Vì thực tế, tiểu phần CD25 không được biểu hiện trên các tế bào T nghỉ và các tế bào lympho B. CD25 chỉ biểu hiện trên các tế bào lympho và mono sau khi được kích thích và cả trên các tế bào ác tính không được kích thích. Đặc biệt, gần như tất cả các bệnh nhân ung thư máu tế bào T người trưởng thành (adult T-cell leukemia, ATL) nhiễm virus HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus-1) và các bệnh nhân ung thư máu tế bào dạng

tóc (hairy cell leukemia, HCL) đều biểu hiện một lượng lớn IL-2R α trên bề mặt tế bào (Ambrosetti *et al.*, 1993b; Horiuchi *et al.*, 1997; Waldmann, 2002). Protein CD25 cũng đã được chứng minh tồn tại trong một số các bệnh ung thư máu: B-CLL (B-cell chronic lymphoblastic leukemia), ALL (acute lymphoblastic leukemia), bệnh Hodgkin, non-Hodgkin (Burton, Kay, 1994; Waldmann, 2002; 2007), ...

Trong một số bệnh do tế bào T, như là đảo thái mảnh ghép hoặc các bệnh tự miễn, tiểu phần CD25 được biểu hiện là kết quả của sự hoạt hóa tế bào T và các tế bào T này chỉ định vị trong vùng bệnh lý, ví dụ chất lỏng hoạt dịch trong bệnh viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis). Sử dụng các kháng thể đặc hiệu CD25, đích chọn lọc của những bệnh này sẽ làm tổn hại tối đa các tế bào bệnh lý và ít ảnh hưởng nhất đối với các tế bào không biểu hiện CD25. Bằng sự kết hợp giữa cơ chế phong tỏa trực tiếp và cơ chế gây độc tế bào, các kháng thể kháng CD25 đã đạt được hiệu quả tác động của mình (Takeshita *et al.*, 1992).

Đặc biệt, CD25 còn được giải phóng khỏi bề mặt tế bào và tồn tại trong huyết thanh ở dạng tự do. CD25 trong huyết thanh tỷ lệ với sự biểu hiện bề mặt tế bào của nó (Junghans, Waldmann, 1996). Chính vì vậy, hàm lượng CD25 trong huyết thanh của bệnh nhân tiền điều trị phản ánh hoạt động, tiến triển của

các bệnh ung thư, quá trình tái ghép cũng như một số bệnh tự miễn.

Dựa trên vai trò và đặc điểm sinh học của CD25, chúng tôi tiến hành thiết kế vector và biểu hiện thu protein kháng nguyên CD25 tái tổ hợp nhằm ứng dụng chúng trong nghiên cứu chẩn đoán và điều trị các bệnh liên quan tới kháng nguyên bề mặt CD25.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hóa chất sinh phẩm

Các cDNA nhân từ các mẫu ung thư máu (được lưu giữ tại phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học); Vector biểu hiện pET-22b(+) (Novagen); cặp môi EXCD25F/EXCD25R được thiết kế và tổng hợp chứa trình tự nhận biết của các enzyme hạn chế có trình tự cụ thể như sau: EXCD25F: 5'- AGCTAGCGAGCTCTGTGACGA TGACCCG -3'; EXCD25R: 5'- GTGCTCGAGAG GCTTCTTTCACCTG -3'. Môi trường nuôi cấy tế bào *E. coli* là môi trường LB (1% tryptone, 0,8% NaCl, 0,5% cao nấm men và 1,5% agar đối với môi trường thạch); Các hóa chất và enzyme sử dụng trong thí nghiệm đều là những hóa chất của các hãng có uy tín như: enzyme *EcoRI* và *XhoI*, *T4-ligase* (New England Biolabs), Kit tách dòng "Topo-TA cloning Kit" (Invitrogen); Kit "Big Dye Terminator sequencing kit" (ABI, Mỹ), Kit tinh sạch DNA từ gel agarose (QIAGEN), và các hóa chất khác đều là những hóa chất tinh khiết được sử dụng trong sinh học phân tử và công nghệ gen.

Phương pháp

Phương pháp PCR được thực hiện với cặp môi đặc hiệu có gắn các vị trí nhận biết của các enzyme hạn chế *EcoRI* và *XhoI*.

Các kỹ thuật phân tử dùng cho tách dòng gen: tách chiết và tinh sạch DNA plasmid, xử lý DNA plasmid với các enzyme hạn chế, gắn nối các đoạn DNA vào vector, điện di trên gel agarose,... được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001).

Phương pháp giải trình tự gen được thực hiện trên máy xác định trình tự ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI, Mỹ), Viện Công nghệ sinh học.

Phương pháp biến nạp vector mang gen *CD25* vào chủng biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) được thực hiện bằng cách tạo tế bào khả biến và sốc nhiệt.

Chọn lọc các dòng mang gen trên môi trường LB thạch chứa ampicillin (100 µg/ml).

Biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên CD25: Khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa chọn lọc LB thạch được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin. Khi OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy đạt 0,6 - 0,8, các tế bào được cảm ứng với IPTG và được nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ thích hợp. Mẫu đối chứng là tế bào không cảm ứng IPTG. Thu tế bào ở thời điểm 3, 5 và 16 h để kiểm tra khả năng biểu hiện của gen *CD25* bằng điện di biến tính trên gel polyacrylamide.

Tinh sạch protein CD25 tái tổ hợp: Protein CD25 tái tổ hợp có chứa đuôi bao gồm 6 aa histidin, do đó chúng có ái lực với Ni²⁺, dùng cột sắc ký ái lực Nikel-resin của hãng Probon và thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất.

Phân tích protein tái tổ hợp bằng phương pháp khối phổ: protein tái tổ hợp thu được được điện di trên gel polyacrylamide, cắt phần gel chứa băng protein đích, thủy phân protein trong gel bằng enzyme trypsin, phân tích thành phần peptide qua hệ thống sắc ký lỏng 1 chiều nanoLC, các mảnh peptide được đưa vào máy khối phổ QSTAR®XL và phân tích phổ khối thu được bằng phần mềm Mascot để nhận dạng protein.

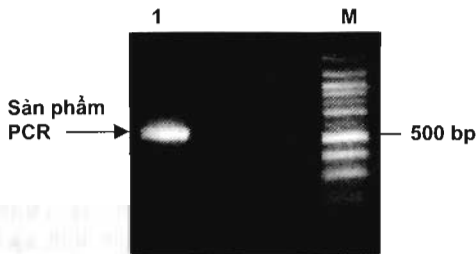
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân bản đoạn gen mã hóa cho vùng hoạt động của CD25

Để gắn hai vị trí nhận biết của các enzyme hạn chế thích hợp cho việc thiết kế vector biểu hiện, cặp môi đặc hiệu cho đoạn gen *CD25* với hai vị trí nhận biết của hai enzyme hạn chế được thiết kế (trình tự được nêu trong phần phương pháp). Đoạn gen đích được nhân bản dựa trên khuôn là cDNA từ các bệnh nhân ung thư máu (Phòng Công nghệ tế bào động vật) và tiến hành theo chu trình nhiệt sau: giai đoạn biến tính 94°C: 2 phút, gen được khuếch đại theo chương trình: 94°C: 45 giây; 60°C: 30 giây; 72°C: 1 phút; lặp lại 30 chu kỳ và sản phẩm được bảo quản ở 4°C. Kết quả nhân bản thể hiện trên hình 1.

Kết quả điện di cho thấy trên đường chạy thứ 1 xuất hiện một băng sáng đậm, so với thang DNA chuẩn thì băng này nằm trong khoảng 500 - 600 bp. Kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết về độ dài của đoạn gen *CD25* nhân bản. Như vậy, chúng tôi cho rằng đoạn gen mã hóa cho vùng hoạt động

của CD25 đã được nhân bản với cặp mồi EXCD25F/R và có hai vị trí nhận biết của hai enzyme mong muốn ở hai đầu của gen. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn điều này và tạo thuận lợi cho việc thiết kế vector biểu hiện, chúng tôi tiến hành gắn gen vào vector tách dòng và xác định trình tự gen đã nhân bản.



Hình 1. Kết quả nhân bản đoạn gen mã hóa cho CD25. M. Thang DNA chuẩn 100 bp; 1. Sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen CD25 với hai vị trí nhận biết của enzyme hạn chế.

Tách dòng và xác định trình tự đoạn gen CD25

Sản phẩm phản ứng PCR được gắn trực tiếp vào vector tách dòng pCR2.1-Topo (Invitrogen), sau đó biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng TOP10, tách chiết DNA plasmid để chọn dòng tái tổ hợp mang đoạn gen đích. Các dòng chọn được được kiểm tra sơ bộ với enzyme hạn chế, sau đó tinh sạch dòng plasmid được chọn và xác định trình tự. Việc xác định trình tự gen CD25 được tiến hành phản ứng bằng kit “Big Dye Terminator sequencing kit” (ABI, Mỹ), chạy trên máy ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer. Kết quả thu được trên hình 2.

Từ kết quả xác định trình tự, bằng các phần mềm sinh học, chúng tôi xác định gen nhân bản có độ tương đồng cao so với gen CD25 gốc, sai khác so với trình tự gen CD25 X01057 trong ngân hàng gen 2 nucleotide (Hình 2, A thay bởi G, T thay bởi C), tuy nhiên những sai khác này chỉ dẫn tới 1 sai khác về trình tự amino acid (Hình 4, amino acid R được thay bởi G). Đoạn gen đã có hai vị trí nhận biết của enzyme hạn chế ở hai đầu đảm bảo cho việc gắn đoạn gen CD25 vào vector biểu hiện pET-22b(+) được dễ dàng, đúng chiều và đúng khung đọc.

Thiết kế vector biểu hiện pET-22b(+)/CD25

Do có hai vị trí cắt của enzyme hạn chế *EcoRI* và *XhoI* ở hai đầu của gen nên sau khi xử lý vector tách dòng tái tổ hợp với hai enzyme trên sẽ thu được

đoạn gen CD25 với kích thước trên 500 bp và các đầu dính cần thiết cho việc gắn vào vector biểu hiện (Hình 3a). Vector pET-22b(+) cũng được cắt mở vòng bằng hai enzyme hạn chế trên (Hình 3b). Đoạn gen CD25 sau khi tinh sạch từ gel agarose sẽ được gắn vào vector pET-22b(+) nhờ enzyme *T4-ligase*. Sản phẩm gắn được biến nạp vào *E. coli* chủng Top10 để chọn dòng, kết quả chọn dòng bằng phương pháp PCR với cặp mồi T7F/R thể hiện ở hình 3c.

Kiểm tra kết quả gắn đoạn gen CD25 vào vector biểu hiện được tiến hành bằng cách sử dụng trực tiếp 3 khuẩn lạc chọn ngẫu nhiên từ đĩa nuôi cấy tiến hành PCR với cặp mồi T7F/R của vector pET-22b(+), ở đường chạy số 3 (Hình 3c) cho thấy sản phẩm PCR xuất hiện một băng đặc hiệu có kích thước khoảng 750 bp. Kích thước này là hoàn toàn phù hợp với tính toán về tổng kích thước của đoạn gen CD25 với một phần của vector. Để kiểm tra chiều và khung đọc của gen, chúng tôi tiến hành xác định trình tự gen trong plasmid tái tổ hợp thu được. Xử lý kết quả xác định trình tự, bằng phần mềm FASTA và NTIVector chúng tôi thu được trình tự amino acid suy diễn của protein CD25 và trình tự dẫn *pelB* thể hiện ở hình 4.

Qua kết quả ở hình 4, chúng tôi có thể kết luận rằng đã gắn thành công đoạn gen CD25 vào vector pET-22b(+) đúng chiều và đúng khung đọc. Protein CD25 thu được dung hợp với trình tự dẫn *pelB*, peptide dẫn này giúp cho protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện sẽ được đưa ra khoang chu chất của tế bào chủ, nhờ đó protein biểu hiện sẽ hạn chế được tác dụng của proteinase nội bào và việc tinh sạch thu protein dễ dàng hơn. Hơn nữa, để phục vụ cho việc tinh sạch, CD25 được dung hợp với 6 gốc histidin có ái lực cao với Ni^{2+} nên giúp cho việc tinh sạch CD25 dễ dàng bằng sắc kí.

Biểu hiện thu protein CD25 tái tổ hợp

Plasmid tái tổ hợp pET-22b(+)/CD25 được đưa vào chủng biểu hiện BL21(DE3) tạo ra dòng tế bào có khả năng biểu hiện CD25 tái tổ hợp. Dòng tế bào có khả năng sản xuất CD25 được nuôi lắc trong môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin 100 μ g/ml ở 30°C, khi OD_{600 nm} = 0,8 hỗn hợp nuôi cấy được cảm ứng với IPTG đạt nồng độ cuối cùng 1 mM, các mẫu thu ở các thời điểm 3, 5 và 16 h. Để kiểm tra khả năng biểu hiện của dòng tế bào thu được, các mẫu được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide, kết quả điện di thể hiện trên hình 5. Qua hình ảnh điện di ta thấy, trên các mẫu cảm

ứng với IPTG có xuất hiện một băng protein mới khác biệt so với các mẫu không cảm ứng và trước khi cảm ứng, băng protein thu được có kích thước tương đương với kích thước theo tính toán lý thuyết. Do đó, có thể khẳng định sơ bộ đã biểu hiện được CD25 và đã tạo ra được dòng tế bào có khả năng tổng hợp CD25 tái tổ hợp.

Sau khi chuẩn điều kiện biểu hiện, chúng tôi cũng chọn được điều kiện để thu lượng CD25 tái tổ hợp cao nhất, cảm ứng IPTG với nồng độ cuối cùng là 1 mM, nuôi lắc ở 30°C và thu mẫu sau 5 h cảm ứng.

Tinh sạch và xác định cấu trúc bậc nhất của kháng nguyên CD25

Sản phẩm biểu hiện sau khi tinh sạch trên cột Nikel được kiểm tra trên gel polyacrilamide (Hình 6). Kết quả cho thấy, sản phẩm sau khi tinh sạch chỉ xuất hiện một băng đậm. Để khẳng định sản phẩm sau khi tinh sạch chính là kháng nguyên CD25 đã được biểu hiện đúng theo thiết kế, chúng tôi đã tiến hành xác định cấu trúc bậc nhất của protein này theo phương pháp khối phổ.

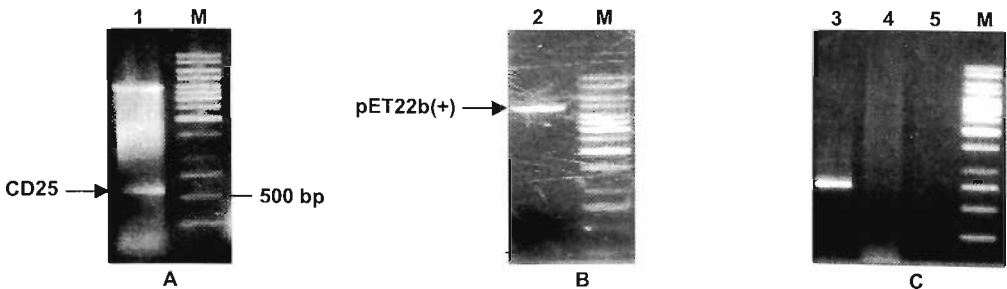
Kết quả xác định cấu trúc bậc nhất của kháng

nguyên CD25: Protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện trong *E. coli* và tinh sạch trên cột Nikel, được xác định cấu trúc bậc 1 theo phương pháp khối phổ để khẳng định protein thu được chính là CD25. Phân tử protein CD25 tái tổ hợp có trình tự amino acid suy diễn từ trình tự nucleotide được thể hiện trên hình 4. Như vậy, khi xử lý với trypsin (trypsin cắt protein sau các gốc K, R) để tiến hành khối phổ, theo lý thuyết, trong số các đoạn peptide được tạo ra, một peptide sẽ có trình tự amino acid như sau: **QVTPQPEEQKER**.

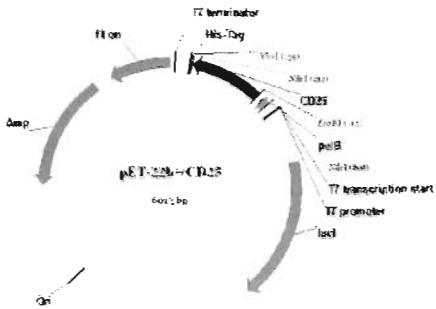
Kết quả khối phổ cho thấy, một trong các peptide được nhận diện có trình tự amino acid đúng theo trình tự của một trong các peptide xuất hiện dưới tác động của trypsin. Điều này có nghĩa là trình tự amino acid của protein thu được sau tinh sạch chính là trình tự amino acid của kháng nguyên CD25 (IL2-R α). Như vậy chúng tôi khẳng định rằng đã biểu hiện thành công thu kháng nguyên tái tổ hợp CD25, kháng nguyên này được ứng dụng để nghiên cứu tạo ra các kit chẩn đoán một số bệnh ung thư máu cũng như những rối loạn của hệ miễn dịch và một số bệnh bất nguồn từ hoạt động quá mức của tế bào T.

```
AGCTAGCGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCCACACGCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGA
AGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGCGGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTG
TACAGGAAACTCTAGCCACTCGTCTCTGGGACAACCAATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAAC
GAAACAAGTGACACCTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAAACCACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCC
AGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCAGTGCAGGGAACCCCCACCATGGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAAT
TTATCATTTTCGTGGTGGGGCAGATGGTTTATTATCAGTGCCTCCAGGGATACAGGGCTCTACACAGAGGTCC
TGCTGAGAGCGTCTGCAAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCAGCTCATATGCACAGGTGA
AATGGAGACCAGTCAAGTTCCAGGTGAAGAGAAGCCTCTCGAGCAC
```

Hình 2. Trình tự đoạn gen CD25.

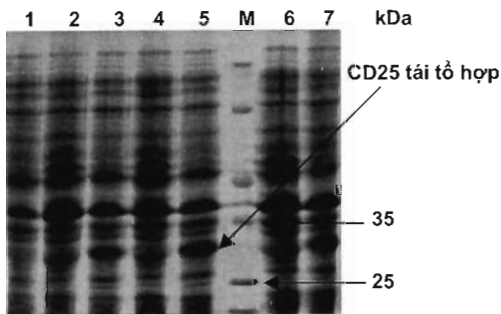


Hình 3. Thiết kế vector biểu hiện. M. Marker DNA 1 kb (Fermantas); 1. Vector pCR2.1-Topo/CD25 cắt với enzyme *EcoRI* và *NotI*; 2. Vector pET22b(+) cắt với enzyme *EcoRI* và *NotI*; 3 - 5. Sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc với cặp môi T7F/R.

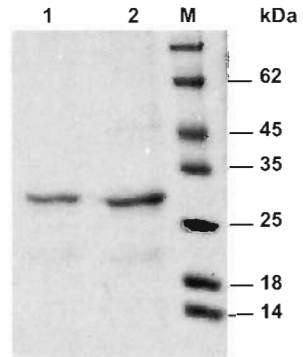


MDIGINSDPNS
 PLASELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCE
 CKRGFRGIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCQCT
 SSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPV
 DQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVY
 YQCQVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQL
 ICTGEMETSQFPGEEKPLEHHHHH*

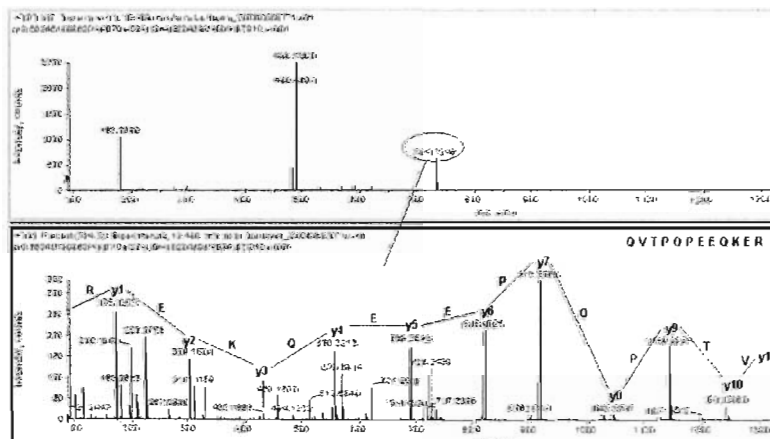
Hình 4. Sơ đồ cấu trúc gen CD25 trong vector pET-22b(+) và trình tự amino acid suy diễn từ trình tự gen.



Hình 5. Điện di protein trên gel SDS-page. M. Protein marker (Fermentas); 1. Mẫu trước cảm ứng; 2, 4, 6. Mẫu nuôi cùng ở các thời điểm 3, 5 và 16 h; 3, 5, 7. Mẫu cảm ứng ở các thời điểm 3, 5 và 16 h.



Hình 6. Kiểm tra sản phẩm protein sau khi tinh sạch trên cột Nikel. 1 - 2. Mẫu protein sau khi tinh sạch trên cột Nikel; M. Marker protein (Fermentas).



Hình 7. Minh họa phổ TOF-MS/MS ion có giá trị $m/z=734,7$ amu (1467 Da) của đoạn peptide QVTPQPEEQKER.

KẾT LUẬN

Đã tách dòng, thiết kế và biểu hiện thành công

đoạn gen mã hóa cho vùng hoạt động ngoại bào của kháng nguyên ung thư máu CD25 trong vi khuẩn *E. coli* chủng BL21(DE3).

Đã xác định được điều kiện biểu hiện tối ưu thu kháng nguyên tái tổ hợp: chùng biểu hiện mang gen CD25 tái tổ hợp được cảm ứng IPTG với nồng độ cuối cùng là 1 mM khi OD_{600 nm} = 0,8; tế bào sau khi cảm ứng được nuôi lác ở 30°C, mức biểu hiện cao nhất sau 5 h cảm ứng.

Bằng phương pháp sắc ký ái lực và khối phổ, chúng tôi đã tinh sạch thành công và khẳng định protein thu được chính là CD25, tiểu phần α của hệ thụ thể IL-2R của người.

Lời cảm ơn: Công trình này đã được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của chương trình KC-10.09/06-10 và hệ thống máy móc của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ambrosetti A, Nadali G, Vinante F, Ricetti MM, Todeschini G, Morosato L, de Sabata D, Bergamo Andreis IA, Chilosi M, Semenzato G (1993b) Soluble interleukin-2 receptor in hairy-cell leukemia: a reliable marker of disease. *Int J Clin Lab Res* 23: 34-37.

Burton J, Kay NE (1994) Does IL-2 receptor expression and secretion in chronic B-cell leukemia have a role in down-regulation of the immune system? *Leukemia* 8: 92-96.

EXPRESSION OF RECOMBINANT CD25 ANTIGEN IN *E. COLI*

La Thi Huyen, Nguyen Phuong Hoa, Dang Thi Thu, Le Quang Huan*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

CD25, also called IL-2R α (the alpha chain of IL-2 receptor) is displayed with an elevated level on the lymphocytic cell surface in blood cancer (Hodgkin's lymphoma, chronic myelogenous leukemia, dendritic cell lymphoma and adult human T cell lymphoma) and on pathogenic T cells in autoimmune diseases and transplant patients). Especially, CD25 is also present as soluble forms at high levels in serum of blood cancer patients, providing a good marker for diagnosis. CD25 may be a prospective target to kill pathogenic cells. Our study aimed at mass production of recombinant CD25. Thus, the human gene coding for the extracellular domain of CD25 was amplified, cloned and sequenced. Vector pET-22b(+)/CD25 has been constructed and expressed successfully the recombinant CD25 in *E. coli* strain BL21(DE3) under conditions inducing with 1 mM IPTG at 30°C in 5 hours when OD_{600 nm} of culture is 0,8. In order to obtain recombinant CD25 antigen we use Ni-resin purification system and the primary structure of recombinant protein was identified by mass spectrometry technique to approve the result. Finally, by gene technology we received purification CD25 protein, which can be used for next experiments.

Keywords: Blood cancer, CD25, *E. coli*, pET-22b(+), recombinant

Horiuchi S, Koyanagi Y, Yanaka Y, Waki M, Matsumoto A, Zhou YW, Yamamoto M, Yamamoto N (1997) Altered interleukin-2 receptor α -chain is expressed in human T-cell leukaemia virus type-1-infected T-cell lines and human peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukaemia patients through an alternative splicing mechanism. *Immunology* 91: 28-34.

Junghans RP, Waldmann TA (1996) Metabolism of Tac (IL-2R α): physiology of cell surface shedding and renal catabolism, and suppression of catabolism by antibody binding. *J Exp Med* 183: 1587-1602.

Murakami S (2004) Soluble interleukin-2 receptor in cancer. *Front Biosci* 9: 3085-3090.

Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N (1992) Cloning of the α -chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257: 379-382.

Waldmann TA (1991) The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 266: 2681-2684.

Waldmann TA (2002) The IL2/IL15 receptor systems: targets for immunotherapy. *J Clin Immunol* 22: 51-56.

Waldmann TA (2007) Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey. *J Clin Immunol* 27: 1-18.

* Author for correspondence: Tel: 84-4-62928397; Fax: 84-4-38363144; E-mail: huanlequang@gmail.com