CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Đơn vị chủ trì: Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NCKH DÀNH CHO CÁN BỘ - GIẢNG VIÊN 2015 - 2016

Tên đề tài: **Nghiên cứu quy trình tinh chế alpha-fetoprotein từ máu cuống rốn người**

Số hợp đồng:

Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Hữu Hùng

Đơn vị công tác: Khoa Nông nghiệp công nghệ cao và Công nghệ sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

Thời gian thực hiện: 12 tháng

TP. Hồ Chí Minh, ngày 30 tháng 12 năm 2016

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Đơn vị chủ trì: Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NCKH DÀNH CHO CÁN BỘ - GIẢNG VIÊN 2015 - 2016

Tên đề tài: **Nghiên cứu quy trình tinh chế alpha-fetoprotein từ máu cuống rốn người**

Số hợp đồng:

Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Hữu Hùng

Đơn vị công tác: Khoa Nông nghiệp công nghệ cao và Công nghệ sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

Thời gian thực hiện: 12 tháng

Các thành viên phối hợp và cộng tác:

STT	Họ và tên	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Ký tên
1	Lê Thị Phương Thảo	Sinh lý động vật	Khoa NNCNC&CNSH, Đại học Nguyễn Tất Thành	

MỤC LỤC

I. TỔNG QUAN 1
I.1. Khái quát về alpha-fetoprotein 1
I.1.1. Gene 1
I.1.2. Cấu trúc phân tử 2
I.1.3. Chức năng 3
I.2. Alpha-fetoprotein và ung thư 4
I.3. Máu cuống rốn người 5
II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP 5
II.1. Nội dung 5
II.2. Hóa chất 7
II.3. Nguyên/vật liệu 10
II.4. Phương pháp 11
II.4.1. Gây đáp ứng miễn dịch thỏ với AFP tạo kháng thể thỏ kháng AFP người 11
II.4.2. Sắc ký ái lực loại albumin 12
II.4.3. Sắc ký trao đổi ion âm 12
II.4.4. Tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP 12
II.4.5. Sắc ký ái lực bắt AFP 14
II.4.6. Sắc ký lọc gel 14
II.4.7. Điện di biến tính (SDS-PAGE) và không biến tính (Native-PAGE) 14
II.4.8. Kỹ thuật western blot 15
II.4.9. Định lượng protein tổng số và protein sau tinh chế 15
III. KẾT QUẢ 15
III.1. Tạo kháng thể IgG thỏ kháng AFP người 15
III.2. Nhận diện AFP trong mẫu huyết tương máu cuống rốn ban đầu bằng western blot .. 16
III.3. Loại albumin khỏi huyết tương máu cuốn rốn 17
III.4. Sắc ký trao đổi ion âm 18
III.5. Kết quả tinh chế IgG thỏ kháng AFP 20
III.6. Bắt AFP bằng cột sắc ký ái lực mang kháng thể IgG thỏ kháng AFP 22
III.7. Tinh chế AFP bằng sắc ký lọc gel 22
III.8. Phân tích hiệu quả tinh chế AFP sau ba bước sắc ký 23

IV. THẢO LUẬN 23
V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 24
TÀI LIỆU THAM KHẢO 26

Danh mục chữ viết tắt

α-ALB	Alpha-albumin
AFP	Alpha-fetoprotein
ALB	Albumin
APS	Ammonium Persulfate
AS	Ammonium Sulfate
BSA	Bovine Serum Albumin
BT	Bình thường
Con A	Concavalin A
CNBr-	Cyanogen bromide-
DBP	Vitamin D binding protein
DEAE	Diethylaminoethyl
E2	Estradiol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FCA	Freund's Complete Adjuvant
FIA	Freund's Incomplete Adjuvant
hAFP	Human alpha-fetoprotein
hALB	Human albumin
HBV	Hepatitis B virus
HbsAg	Hepatitis B surface antigen
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HRP	Horseradish Peroxidase
HT	Huyết thanh
kDa	Kilo Dalton
mAFP	Mouse alpha-fetoprotein

MCR	Máu cuống rốn
mRNA	Messenger Ribose Nucleic Acid
OD	Optical Density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
rAFP	Rat alpha-fetoprotein
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
TBST	Tris Buffered Saline Tween
TEMED	N,N,N',N-Tetramethylethylenediamine

Danh mục bảng biểu, sơ đồ

Bảng 1: So sánh thành phần nucleotide và amino acid của mAFP, rAFP và hAFP 3
Bảng 2: Thành phần gel điện di 8
Bảng 3: Phác đồ gây đáp ứng miễn dịch thỏ với AFP 11
Sơ đồ 1: Quy trình tạo kháng thể IgG thỏ kháng AFP máu cuống rốn người 13
Sơ đồ 2: Quy trình sắc ký ba bước tinh chế AFP từ MCR người 19

Danh mục hình ảnh

Hình 1: Phát hiện IgG kháng AFP trong HT thỏ bằng lai phân tử western blot 16
Hình 2: Kiểm tra sự hiện diện của AFP trong mẫu MCR 17
Hình 3: Sắc ký loại ALB bằng cột sắc ký ái lực Hitrap Blue HP 18
Hình 4: Sắc ký trao đổi ion âm qua cột DEAE 19
Hình 5: Phân tích IgG sau tủa với AS 45% bão hòa bằng SDS-PAGE 20
Hình 6: Phân tích IgG sau tinh chế với cột protein G bằng SDS-PAGE 21
Hình 7: Đánh giá hoạt tính kháng AFP của IgG sau tinh chế với HT MCR bằng western blot 21
Hình 8: Kết quả sắc ký ái lực bắt AFP 22
Hình 9: Phân tích AFP sau sắc ký lọc gel. 23

TÓM TẮT

Alpha-fetoprotein (AFP) là protein huyết thanh liên quan tới sự phát triển của bào thai. Ở người trưởng thành AFP ít được phát hiện nhưng được gia tăng sản xuất trong một số trường hợp bệnh lý như ung thư biểu mô tế bào gan (hepatocellular carcinoma, HCC), xơ gan và một số bệnh lý ung thư khác. AFP đang được sử dụng như một dấu ấn quan trọng cho chẩn đoán huyết thanh học HCC và gần đây AFP còn trở thành mục tiêu cho nghiên cứu chủng ngừa HCC. Máu cuống rốn có khoảng 150 – 250 µg/mL AFP nhưng thường bị bỏ đi trong các bệnh viện. Nghiên cứu này nhằm mục đích tận dụng nguồn thải máu cuống rốn người làm nguyên liệu tinh chế AFP có độ tinh sạch cao. Bằng quy trình sắc ký ba bước gồm sắc ký loại albumin, sắc ký ái lực bắt AFP và sắc ký lọc gel, chúng tôi đã tinh chế thành công AFP với độ sạch trên 95%. Quy trình tinh chế được thiết lập này có thể được thực hiện ở quy mô lớn hơn cho các ứng dụng về sau.

I. TỔNG QUAN

I.1. Khái quát về alpha-fetoprotein

Alpha – fetoprotein là một protein đặc trưng cho phôi, được sản xuất trong giai đoạn phôi sớm bởi gan, túi noãn hoàng và một lượng nhỏ được sản xuất bởi 1 vùng thuộc dạ dày – ruột. Ở người, AFP được sản xuất bởi túi noãn hoàng và gan trong khoảng 1 – 2 tháng đầu của phôi, sau đó chủ yếu là do gan sản xuất; còn ở các loài khác, như chuột, bộ gặm nhấm và gà, sự tổng hợp bởi túi noãn hoàng được tiếp tục cho tới khi sinh.

Hàm lượng cao của AFP được tìm thấy ở nhiều trường hợp lâm sàng, bao gồm mang thai, rối loạn ở gan, đặc biệt là viêm gan mãn tính, và nhiều khối u ác tính, đặc biệt là khối u ở gan, khối u quái, và những dạng này ở dòng ruột sơ cấp. Sự tập trung AFP của người mẹ cao nhất ở mức AFP 150 – 250 ng/mL là ở giữa tam cá nguyệt thứ 3 trong giai đoạn mang thai và sẽ giảm nhanh sau khi sinh. Mức AFP trong huyết thanh thai người cao nhất ở thời kỳ thai nghén tuần thứ 13, có thể đạt tới mức vài mg/mL, và chiếm khoảng 1/3 tổng số protein huyết thanh. Ở người trưởng thành khỏe mạnh, hàm lượng AFP rất thấp, khoảng <20ng/mL.

I.1.1. Gene

Alpha – fetoprotein người (hAFP) là một thành viên của họ gen 3 domain dạng albumin, gồm có: albumin (ALB), protein gắn vitamin-D (DBP), AFP, và alpha-albumin (α-ALB) (McLeod and Cooke, 1989; Lichenstein et al., 1994). Trình tự nucleotide của mRNA hAFP gồm

44 nucleotide ở vùng 5’ không mã hóa, 1830 nucleotide ở vùng mã hóa, và 155 nucleotide ở vùng 3’ không mã hóa. Codon tận cùng TAA được tìm thấy bên cạnh GTT, một codon mã hóa cho Val, biểu thị cho đoạn amino acid ở đầu COOH của hAFP. So sánh giữa mRNA của hAFP, mRNA của mAFP (AFP chuột) và mRNA của hALB (ALB người), thì mRNA của hAFP có thêm 5 codon ở đầu 3’ không mã hóa. Tín hiệu polyA đặc trưng, AATAAA, nằm cách 14 nucleotide về phía ngược lại từ đuôi polyA.

I.1.2. Cấu trúc phân tử

hAFP là một glycoprotein gồm 1 chuỗi polypeptide đơn, gồm 609 amino acid, với 19 amino acid đầu tiên thuộc chuỗi peptide tín hiệu, và 590 amino acid còn lại thuộc protein trưởng thành. Trong khi mAFP có 586 amino acid, 4 amino acid có thêm của hAFP được tìm thấy ở domain 1. Domain này có chuỗi amino acid ít tương đồng nhất và điều này dẫn đến có thể dự đoán sự khác biệt loài trong chức năng AFP có thể là do domain 1. Trọng lượng phân tử hAFP khoảng 69 kDa hoặc hơn phụ thuộc vào phần trăm carbonhydrate (Crandall, 1981; Mizejewski, 1985; Deutsch, 1991). Trọng lượng phân tử của hAFP trưởng thành là 66.300 kDa (không có carbonhydrate), và 69.063 kDa với 4% carbonhydrate khi phân tích bằng SDS-PAGE.

Cũng như các phân tử thuộc họ protein dạng albumin, phân tử AFP có 3 domain, có 15 cầu nối cystein disulfide (cầu nối S-S) nội phân tử chia đều trên 3 domain (mỗi domain có khoảng 5 – 6 cầu nối S-S).

So sánh cấu trúc sơ cấp của hAFP, mAFP, và hALB, cho thấy có sự tương đồng cao về trình tự amino acid, cụ thể là hAFP và mAFP có sự tương đồng 66%, cao nhất là ở domain 3 (72%), tiếp theo là domain 2 (67%) và domain 1 (59%). hAFP, mAFP và rAFP (một loài chuột lớn, rat) đều có 1 đoạn dài của chuỗi amino acid ở domain 3 (đoạn amino acid 510 – 564) với 87% đồng nhất giữa người và chuột hoặc loài gặm nhấm, và 95% giữa chuột và loài gặm nhấm; hAFP và hALB có sự tương đồng 39%, cao nhất ở domain 3 (48%), tiếp theo là domain 2 (40%) và domain 1 (30%) (**Bảng 1**) (Morinaga T et al., 1983).

Cấu trúc gấp cuộn của hAFP được xây dựng bởi sự hình thành của 15 cầu nối S-S giữa 30 trên 32 Cysteine. Những cầu nối S-S này nằm ở vị trí tương tự như trên hALB, dẫn đến cấu trúc 3 domain tương tự ALB. Tuy nhiên, hAFP có ít hơn 2 cầu nối S-S so với hALB (mất một cặp cầu nối S-S ở nửa thứ 2 của domain 2, đoạn amino acid 295 – 396, so với hALB) giúp hình thành cấu trúc bản lề mà chỉ có ở hAFP. Điều đó cho thấy, mặc dù hAFP và hALB thể hiện sự

tương tự trong nhiều tính chất vật lý và hóa học, chúng cũng khác biệt rất rõ ràng trong cấu trúc phân tử.

Bảng 1: So sánh thành phần nucleotide và amino acid của mAFP, rAFP và hAFP

		Identical nucleotides, %				Identical amino acids, %		
Region	Positions	MAFP	RAFP	HSA	Positions	MAFP	RAFP	HSA
5′ noncoding	1–44	57	—	36				
Signal peptide	45–101	63	—	60	−19 to −1	47	—	53
Domain 1	102–692	71	(72)	45	1 to 197	59	(59)	30
Domain 2	693–1,268	78	74	54	198 to 389	67	65	40
Domain 3	1,269–1,871	78	76	57	390 to 590	72	74	48
3′ noncoding	1,872–2,029	64	57	48				
Overall (mature protein)		75	(74)	52		66	(67)	39

Figures in parentheses are calculated on the basis of the known partial sequence of rat AFP.

Một đặc điểm khác ở cấu trúc phân tử hAFP là có sự glycosyl hóa kiểu N (Asn-X-Thr hoặc Asn-X-Ser). Việc glycosyl hóa có vai trò làm tăng sự phức tạp của proteome sau dịch mã, giúp protein gấp cuộn đúng và bảo vệ protein. Glycosyl hóa làm thay đổi điểm đẳng điện và trọng lượng phân tử của phân tử protein (N J Bulleid et al., 1990). Ở mAFP và rAFP, có 3 vị trí N – glycosyl hóa, một trong số đó giống với vị trí ở hAFP (vị trí Asn 232). Vị trí thứ 2 được tìm thấy ở domain 2 ở cả 2 loài, và vị trí thứ 3 nằm ở domain 3 của mAFP nhưng ở domain 1 rAFP. Sự bảo tồn của vị trí gắn carbonhydrate của AFP ở người, chuột và chuột lớn gợi ý rằng vị trí này có thể có một vai trò quan trọng, có thể trong quá trình dị hóa của phân tử AFP.

I.1.3. Chức năng

Tương tự như ALB, AFP được biết đến như là một protein gắn và vận chuyển rất nhiều ligand gồm bilirubin, acid béo, retinoid, steroid, flavonoid, các ion kim loại nặng, phytoestrogen, dioxin, và nhiều loại thuốc hữu cơ (Mizejewski, 1995a, 1997). Hàm lượng hAFP có sự liên quan với điều kiện tăng trưởng bất thường, và nó được cho là nguyên nhân của nhiều dị tật thai. Có thể AFP không là nguyên nhân trực tiếp của những thay đổi trong sự tăng trưởng, người ta vẫn tin rằng việc tạo thành một vài dạng biến thể do shock/stress của protein bào thai này có thể ảnh hưởng, điều tiết, hoặc góp phần vào những sự kiện như vậy (Mizejewski, 2001a). Hai thập kỷ gần đây, những báo cáo nổi bật cho thấy một vài dạng của hAFP hoạt động như nhân tố điều hòa kép của sự phát triển, nó có khả năng hoặc tăng cường hoặc ức chế sự phát triển, trong các tế bào ung thư cũng như trong bào thai (Mizejewski, 2002; Semenkova et al., 2003). Hơn nữa, AFP còn gián tiếp thúc đẩy sự tăng trưởng qua con đường protein kinase A (Li et al., 2002). Đặc tính điều hòa sự tăng trưởng của hAFP là một trong nhiều đặc trưng để phân biệt protein hAFP với ALB huyết thanh bào thai hoặc cơ thể trưởng thành.

I.2. Alpha-fetoprotein và ung thư

Như đã đề cập, hàm lượng AFP huyết thanh cũng tăng cao trong trường hợp không phải do mang thai. Nguyên nhân có thể là do các bất thường ở gan như ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), ung thư di căn ở gan, viêm gan mãn tính; hoặc do khối u tế bào mầm và các ung thư khác như ung thư dạ dày, ruột kết, phổi, vú hoặc hạch.

HCC là loại ung thư phổ biến đứng thứ năm trên thế giới và đứng thứ ba về tỉ lệ tử vong (Pang et al., 2008). Yếu tố nguy cơ chủ yếu của HCC là xơ gan với nguyên nhân phổ biến là nhiễm virus viêm gan C (HCV) và virus viêm gan B (HBV). Trong khi HCC có thể được điều trị một cách hiệu quả ở giai đoạn sớm thì phần lớn bệnh nhân chỉ được chẩn đoán ở giai đoạn muộn, nghĩa là ở các giai đoạn đã xuất hiện các triệu chứng rõ rệt, là giai đoạn đáp ứng đối với điều trị rất kém. Vì vậy, việc chẩn đoán sớm HCC đóng một vai trò vô cùng quan trọng. Khoa học Y học ngày nay đang phấn đấu để làm được điều đó.

Alpha-fetoprotein là một chỉ dấu khối u tiêu chuẩn được sử dụng để đánh giá HCC. Ở vùng Châu Á, Đông Nam Á, ở những người có âm tính với dấu ấn virus viêm gan B, HbsAg (-), AFP huyết thanh >25ng/mL có giá trị chẩn đoán đặc hiệu 100% với HCC (Lee, 1991). Với bệnh nhân có HbsAg (+), tính đặc hiệu HCC đạt 79.8% khi AFP <200ng/mL và lên 91.5% nếu AFP trong khoảng 200 – 400ng/mL (Tan et al., 2003). Ngoài ra, theo dõi hàm lượng AFP trong máu bệnh nhân HCC sau phẫu thuật giúp phát hiện sớm sự tái phát HCC (Shirabe et al., 1997).

Alapha-fetoprotein có 3 dạng là AFP-L1, AFP-L2 và AFP-L3, các dạng này khác nhau bởi các chuỗi đường của chúng, làm cho chúng có ái lực khác nhau đối với Lens culinaris agglutinin (LCA). Trong đó, AFP-L3 có ái lực cao đối với LCA, đặc hiệu cho HCC vì nó được sản xuất bởi các tế bào gan ác tính. Cũng vì vậy, việc định lượng AFP-L3 huyết thanh và đánh giá tỷ lệ phần trăm của nó với hàm lượng AFP toàn phần có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán sớm HCC (Li D et al., 2001).

Mức độ AFP tăng có thể chỉ ra sự hiện diện của bệnh ung thư, phổ biến nhất là HCC, ung thư buồng trứng hoặc ung thư tế bào mầm tinh. Theo Abbasi và cộng sự (2012), mức độ AFP huyết thanh có sự tương quan thuận một cách có ý nghĩa với kích thước của khối u HCC và có thể được sử dụng như một chỉ dấu có giá trị để phát hiện HCC và đánh giá giai đoạn của bệnh. Ngoài ra, AFP cũng được sử dụng để theo dõi hiệu quả điều trị, đáp ứng đối với điều trị và tiên lượng của bệnh nhân HCC. Những bệnh nhân HCC có mức độ AFP huyết thanh trước mổ ≤ 20 ng/mL có tỷ lệ tái phát sau mổ 2 năm thấp hơn, có tỷ lệ sống sót sau mổ 18 tháng và 24 tháng cao hơn so với những bệnh nhân HCC có mức độ AFP huyết thanh trước mổ > 20 ng/mL. Có sự

liên quan chặt chẽ giữa kích thước khối u (≥ 5 cm) và mức độ AFP huyết thanh (>400 ng/mL) với tỷ lệ sống sót sau phẫu thuật (Ma WJ et al., 2013).

Như vậy, điều cần quan tâm ở AFP là nó có thể tái xuất hiện trong huyết thanh với một lượng lớn ở cơ thể trưởng thành, liên quan với quá trình phục hồi bình thường (sự tái sinh gan) và với sự phát triển u ác tính. Sự tăng AFP được biết đến nhiều trong hỗ trợ chẩn đoán ung thư gan và khối u quái, nhưng thêm vào đó, những dữ liệu gần đây đưa ra gợi ý tỉ lệ phần trăm lớn của những dạng khối u khác, đặc biệt là vùng ruột sơ cấp, cũng có hàm lượng AFP cao. Do đó, chẩn đoán sớm ung thư dựa vào xác định hàm lượng AFP huyết thanh ở cơ thể trưởng thành là mục tiêu của nhiều nghiên cứu hiện nay.

I.3. Máu cuống rốn người

Có 3 nguồn chứa lượng lớn AFP tự nhiên là máu thai, máu bệnh nhân HCC và máu cuống rốn. Như đã đề cập, máu thai và máu bệnh nhân HCC chứa AFP với hàm lượng rất cao, lên tới hàng mg/mL. Tuy nhiên, rào cản từ vấn đề đạo đức y học của máu thai và độ sạch của máu bệnh nhân HCC gây trở ngại trong việc thu nhận AFP từ hai nguồn này. Máu cuống rốn được biết đến như một nguồn sản phẩm thải ở các bệnh viện. Trong 1 mL huyết thanh máu cuống rốn chứa 150 – 250µg AFP (Czokalo, 1979). Bên cạnh đó, máu cuống rốn được xem là vật liệu "sạch" khi đã được kiểm tra tiền sinh một cách chặt chẽ. Do vậy, máu cuống rốn được xem như nguồn cung cấp AFP lý tưởng cho các phòng thí nghiệm.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

II.1. Nội dung

Nội dung 1. Thu nhận máu cuống rốn và phân tích nhận diện AFP trong huyết tương máu cuống rốn người

Phương pháp nghiên cứu:

- Thu nhận máu cuống rốn từ sản phụ hiến tặng, vận chuyển nhanh về phòng thí nghệm trong điều kiện lạnh.
- Ly tâm 3000 x g trong 20 phút, thu huyết tương.
- Bổ sung 0.05% sodium azide (NaN_3), trữ ở -80^oC cho đến khi sử dụng.
- Phân tích nhận diện AFP trong huyết tương máu cuống rốn bằng kỹ thuật điện di không biến tính và lai western blot với kháng thể kháng AFP.

Kết quả cần đạt:

- Thu nhận đủ lượng huyết tương máu cuống rốn để thực hiện quy trình tinh chế AFP
- Nhận diện được AFP trong huyết tương máu cuống rốn ban đầu

Nội dung 2. Thiết lập quy trình tinh chế AFP bằng phương pháp sắc ký 2 bước: Sắc ký ái lực loại ALB và sắc ký trao đổi ion âm

Phương pháp nghiên cứu:

- Sắc ký mẫu huyết tương máu cuống rốn qua cột Hitrap Blue HP (GE Heathcare) nhằm loại bỏ ALB khỏi hỗn hợp protein huyết tương
- Sắc ký mẫu huyết tương đã loại ALB qua cột trao đổi ion âm DEAE nhằm thu nhận AFP tinh sạch

Kết quả cần đạt:

- Thiết lập điều kiện sắc ký tối ưu để loại được >99% ALB khỏi mẫu huyết tương máu cuống rốn
- Thiết lập điều kiện sắc ký trao đổi ion âm tối ưu để có thể phân tách hoàn toàn AFP khỏi hỗn hợp protein huyết tương còn lại

Nội dung 3. Tạo và tinh chế kháng thể thỏ kháng AFP người.

Phương pháp nghiên cứu:

- Tiêm thỏ gây đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên AFP người
- Lấy máu thỏ, ly tâm thu nhận huyết thanh và tủa miễn dịch với ammonium sulfate 45% bão hòa thu nhận kháng thể IgG tổng số
- Đánh giá chất lượng kháng thể bằng phương pháp lai western blot với AFP
- Tinh chế kháng thể IgG thỏ kháng AFP người bằng phương pháp tủa miễn dịch với muối ammonium sulfate 45% bão hòa và sắc ký ái lực qua cột protein G
- Tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP bằng phương pháp cộng hợp IgG thỏ kháng AFP lên gel CNBr-hoạt hóa. Sử dụng cột XK 16/20 (GE Heathcare)

Kết quả cần đạt:

- Thu được IgG thỏ kháng AFP
- Tạo thành công cột sắc ký ái lực bắt AFP

Nội dung 4. Thiết lập quy trình tinh chế AFP bằng phương pháp sắc ký 3 bước: Sắc ký ái lực loại ALB, sắc ký ái lực bắt AFP và sắc ký lọc gel.

Phương pháp nghiên cứu:

- Sắc ký ái lực qua cột Hitrap Blue HP loại bỏ ALB khỏi mẫu HT MCR
- Sắc ký ái lực qua cột bắt AFP
- Sắc ký lọc gel qua cột sephacryl S100 thu nhận AFP tinh sạch

Kết quả cần đạt:

- Thu nhận được AFP tinh sạch

Nội dung 5. Phân tích định tính và định lượng AFP sau tinh chế.

Phương pháp nghiên cứu:

- Phân tích định lượng bằng phương pháp quang phổ và Bradford.
- Phân tích định tính bằng phương pháp điện di và western blot

Kết quả cần đạt:

- Xác định được hàm lượng các sản phẩm sau tinh chế. Hiệu suất thu hồi cao
- Đánh giá được độ tinh sạch của các sản phẩm sau tinh chế. Độ sạch của sản phẩm sau tinh chế đạt >95%

II.2. Hóa chất

Hóa chất cho điện di

Running buffer 5X:

- Tris 15.14 g
- Glycine 72.065 g
- Nước cất vừa đủ 1000 mL

Sample buffer 2X:

- Tris pH 6.8 0.125 M 2.5 mL
- Glycerol 10% 1 mL
- Bromophenol blue 0.001%
- Nước cất vừa đủ 5 mL

Thành phần gel

Bảng 2: Thành phần gel điện di

Gel gom 4% (1 gel)		Gel tách 7.5% (1 gel)		Gel tách 12.5% (1 gel)
dH2O	1.8 mL	dH2O	2.88 mL	1.875 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	750 µl	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.5 mL	1.5 mL
Acrylamide 30%	400 µl	Acrylamide 30%	1.5 mL	2.5 mL
SDS 10% *	30 µl	SDS 10% *	56 µl	60 µl
APS 10%	30 µl	APS 10%	56 µl	60 µl
TEMED	1.6 µl	TEMED	3.3 µl	5 µl

* Không sử dụng đối với điện di Native-PAGE

Hóa chất nhuộm bạc nitrate ($AgNO_3$)

Dung dịch Fix:

- Ethanol 40 mL
- Acid acetic 10 mL
- Nước cất vừa đủ 100 mL

Dung dịch Sensitizing:

- Ethanol 60 mL
- $CH_3COONa.3H_2O$ 22.4 g
- $Na_2S_2O_3$ 0.254 g
- Glutaraldehyde* 25%
- Nước cất vừa đủ 200 mL

Dung dịch bạc nitrate:

- $AgNO_3$ 5 g
- Formaldehyde* 0.04%
- Nước cất vừa đủ 200 mL

Dung dịch Developing:

- Na_2CO_3 5 g
- HCHO* 0.02%
- Nước cất vừa đủ 200 mL

Dung dịch Stop: Na_2-EDTA 1.5%

** Thêm vào ngay trước khi sử dụng*

Hóa chất cho sắc ký

Hóa chất cho sắc ký ái lực loại ALB:

- Nước vô khuẩn pha tiêm
- Đệm gắn: 50 mM KH_2PO_4, sodium azide 0.05%, pH 7.0
- Đệm rửa giải: 50 mM KH_2PO_4, 1.5 M KCl, sodium azide 0.05%, pH 7.0
- Đệm giữ cột: ethanol 20%, 0.1 M KH_2PO_4, sodium azide 0.05%

Hóa chất cho sắc ký trao đổi ion:

- Nước vô khuẩn pha tiêm
- Đệm bắt đầu: 20 mM Tris-HCl, sodium azide 0.05%, pH 8.0
- Đệm rửa giải: 20 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, sodium azide 0.05%, pH 8.0
- Dung dịch giữ cột: Ethanol 20%

Hóa chất cho sắc ký ái lực bắt AFP

- Nước vô khuẩn pha tiêm
- Đệm gắn: 20 mM sodium phosphate, sodium azide 0.05%, pH 7.0
- Đệm rửa giải: 0.1 M Glycine-HCl, 0.3M NaCl, sodium azide 0.05%, pH 2.7
- Dung dịch giữ cột: Ethanol 20%

Hóa chất chó sắc ký lọc gel

- Nước vô khuẩn pha tiêm
- Đệm: 50mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, sodium azide 0.05%, pH 7.0
- Dung dịch giữ cột: Ethanol 20%

Tất cả các dung dịch sử dụng cho sắc ký đều được lọc bằng filter 0.45 µm trước khi qua cột.

Hóa chất western blot

Kháng thể:

- Huyết thanh thỏ kháng AFP
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa cruz biotechnology)

TBS/T (pH 7.5):

-	Tris	20 mM	2.4228 g
-	NaCl	150 mM	8.766 g
-	Tween 20	0.1%	1 mL
-	Nước cất vừa đủ 1000 mL		

Dung dịch chuyển màng:

- Towbin (pH 8.3)

+	Tris	25 mM	3 g
+	Glycine	192 mM	14.4 g
+	SDS	0.1%	1 g
+	Nước cất vừa đủ 800 ml		

- Methanol* 20%

(Methanol thêm vào ngay trước khi sử dụng)

Dung dịch khóa màng:

- Casein 1% trong TBS/T

Dung dịch hiện màu:

- Luminol
- P-Coumaric
- Tris-HCl
- H_2O_2

Hóa chất định lượng protein bằng phương pháp Bradford

- Coomassie Billiriant G blue	40 g
- Ethanol	20%
- H_3PO_4	85%
- Nước cất vừa đủ 100 mL	

Hóa chất tạo kháng huyết thanh

- Tá chất

  Freund Complete Adjuvant (FCA)

  Freund Incomplete Adjuvant (FIA)
- Nước muối sinh lý 0.9% (vô khuẩn)
- Nước vô khuẩn pha tiêm

II.3. Nguyên/vật liệu

Máu cuống rốn được hiến bởi sản phụ và thành phần huyết tương được thu nhận bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 3000 x g trong 20 phút. Huyết tương sau đó được bổ sung 0.05% sodium azide (NaN_3) và được trữ ở -80^oC cho đến khi sử dụng.

Thỏ đực có trọng lượng ≥ 2 kg/con mua từ viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh và được nuôi trong nhà động vật của khoa Nông nghiệp công nghệ cao và Công nghệ sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành.

II.4. Phương pháp

II.4.1. Gây đáp ứng miễn dịch thỏ với AFP tạo kháng thể thỏ kháng AFP người

Để có nguồn nguyên liệu kháng thể kháng AFP phục vụ cho đề tài, chúng tôi đã gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ với kháng nguyên AFP tinh sạch.

AFP được dùng gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ là AFP được tinh chế từ máu cuống rốn của người (Leebio, Hoa Kỳ) với độ tinh sạch 99%. Phác đồ tiêm gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ được mô tả tóm tắt trong Bảng 2. Mỗi lần tiêm 1 mL hỗn hợp huyền phù chứa AFP, chia thành 40 mũi tiêm trong da, chia đều hai bên sống lưng (25 µl/mũi). Riêng lần tiêm gây mẫn cảm dành lại khoảng 200 µl hỗn hợp huyền phù để tiêm bắp, vị trí phía trong đùi chân sau. Các mũi tiêm cách nhau 30 ngày. Máu thỏ sau khi thu nhận được để qua đêm ở 4^0C, sau đó ly tâm ở 3000 rpm trong 15 phút, thu huyết thanh (HT). Bảo quản huyết thanh ở -20^0C, có bổ sung 0.05% sodium azide. Kháng thể IgG đặc hiệu kháng AFP được kiểm tra bằng kỹ thuật lai phân tử western blot.

Bảng 3: Phác đồ gây đáp ứng miễn dịch thỏ với AFP

Mũi tiêm	Liều AFP (µg)	NaCl 0.9% vô khuẩn (µl)	Tá chất (µl)		Lượng máu thu nhận (mL)
			FCA	FIA	
Gây mẫn cảm	100	500	500		5*
Tăng cường lần 1	100	500		500	5**
Tăng cường lần 2	50	500		500	5**
Tăng cường lần 3	25	500		500	20**
Tăng cường lần 4	20	500		500	20**
Tăng cường lần 5	20	500		500	90** (lấy máu tai và tim)

FCA: Freund's Complete Adjuvant *(Sigma aldrich)*
FIA: Freund's Incomplete Adjuvant *(Sigma aldrich)*
* Trước khi tiêm
** Sau khi tiêm 12 – 14 ngày

Huyết thanh thỏ thu nhận được sau các lần tiêm tăng cường được lưu trữ ở -80^oC để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

II.4.2. Sắc ký ái lực loại albumin

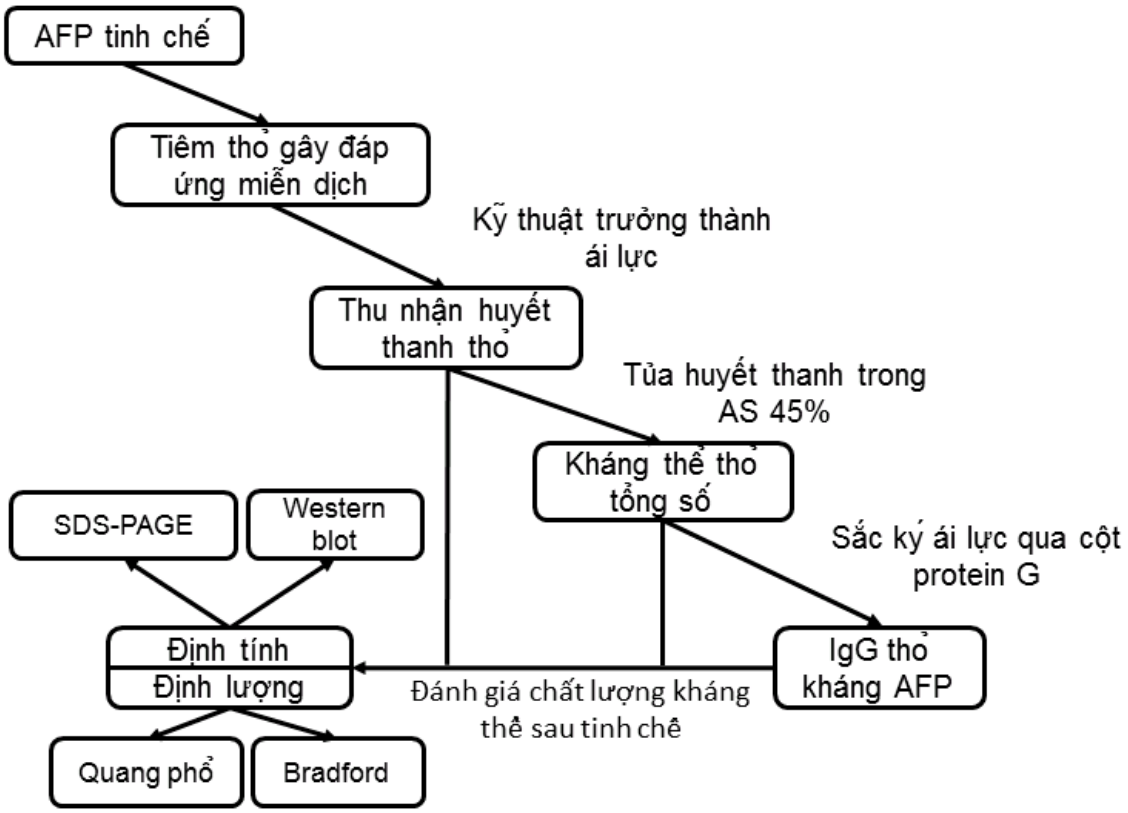
Dùng cột sắc ký ái lực Hitrap Blue HP để loại bỏ ALB theo hướng dẫn của nhà sản xuất (GE Healthcare). Các phối tử Cibacron gắn trên gel có ái lực với ALB và giữ lại ALB khi cho mẫu huyết tương đi qua cột. Sử dụng các dung dịch đệm: đệm gắn KH_2PO_4 50 mM, NaN_3 0.05%, pH 7.0; đệm rửa giải KH_2PO_4 50 mM, KCl 1.5 M, NaN_3 0.05%, pH 7.0. Tốc độ nạp mẫu và chạy các dung dịch đệm là 1 mL/phút. Mẫu huyết tương được pha loãng trong đệm KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 trước khi nạp vào cột. Đối với mẫu MCR, thu các phân đoạn protein không bám cột trong Peak 1A (chứa AFP) và các phân đoạn protein bám cột trong Peak 2A (chứa ALB).Đối với mẫu huyết tương người bình thường, 2 phân đoạn được ký hiệu lần lượt là Peak 1B (không chứa AFP) và Peak 2B (chứa ALB).

II.4.3. Sắc ký trao đổi ion âm

Dùng cột sắc ký trao đổi ion âm DEAE (diethyl-aminoethyl) để tách AFP khỏi hỗn hợp protein đã loại bỏ ALB, quy trình sắc ký được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (GE Healthcare). Dựa trên sự khác nhau về điểm đẳng điện của các protein, protein hoặc nhóm protein có cùng giá trị pI sẽ được phân tách theo sự thay đổi của gradient nồng độ muối trong đệm rửa giải (20 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 8.0). Mẫu huyết tương đã loại ALB được cô đặc và trao đổi đệm gắn 20 mM Tris-HCl pH 8.0 bằng phương pháp ly tâm lọc sử dụng amicon filter unit 10 kDa cut-off theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Merck). Tốc độ ly tâm là 3000 x g trong 20 phút. Tốc độ nạp mẫu và chạy các dung dịch đệm là 1mL/phút. Gradient phần trăm dung dịch đệm rửa giải được cài đặt như sau: 0% - 20% trong 20mL đầu, giữ 20% cho tới khi đường UV ngang, 20% - 50% trong 20mL tiếp theo, 50% - 100% trong 20mL cuối. Các phân đoạn thu được sau sắc ký được kiểm tra bằng điện di không biến tính và western blot được mô tả trong phần sau.

II.4.4. Tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP

Nhằm bắt giữ AFP trong hỗn hợp protein máu cuống rốn, chúng tôi đã tự tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP, sử dụng kháng thể IgG thỏ kháng AFP tự tạo được tinh chế theo quy trình như sau:



Sơ đồ 1: Quy trình tạo kháng thể IgG thỏ kháng AFP máu cuống rốn người

II.4.4.i. Tinh chế IgG thỏ

Kháng thể IgG thỏ trong huyết thanh ở lần tiêm cuối cùng được thu nhận bằng phương pháp tủa với ammonium sulfate 45% bão hoà (AS 45%). Cặn tủa chứa IgG được bảo quản trong AS 45% ở 4^0C cho đến khi sử dụng.

Để tinh chế IgG, cặn tủa chứa IgG hoà tan bằng thẩm tích trong đệm 20 mM sodium phosphate và được nạp qua cột protein G có ái lực mạnh với phần Fc của IgG. Mẫu được nạp vào cột với tốc độ 1 mL/phút (nạp 30 mg protein/mL thể tích cột). Sử dụng dung dịch đệm gắn 20 mM sodium phosphate; đệm rửa giải 0.1 M Glycine-HCl; đệm trung hòa 1 M Tris-HCl. Các phân đoạn bám cột và khôмg bám cột sau sắc ký được dồn mẫu và được cô đặc bằng phương pháp ly tâm sử dụng amicon filter unit 10 kDa cut-off. Mẫu IgG thỏ kháng AFP được kiểm tra độ sạch bằng phương pháp điện di biến tính (SDS-PAGE) và kiểm tra độ đặc hiệu với AFP bằng phương pháp western blot (được mô tả ở phần sau), và sau đó được sử dụng để tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP.

II.4.4.ii. Tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP

Để tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP, chúng tôi sử dụng cột thủy tinh XK16/20 và gel CNBr-hoạt hóa của GE Healthcare, kháng thể IgG thỏ kháng AFP tinh sạch được sử dụng làm ligand gắn lên gel. Quy trình cộng hợp protein lên gel được tham khảo theo quy trình của Nguyễn Lê Trang (2010). Quy trình nhồi cột được tham khảo theo hướng dẫn của nhà sản xuất (GE Healthcare).

II.4.5. Sắc ký ái lực bắt AFP

Mẫu từ Peak 1A chứa AFP sau sắc ký loại ALB của MCR được cô đặc và trao đổi đệm sodium phosphate 20 mM bằng phương pháp ly tâm lọc sử dụng amicon filter unit 10 kDa cut-off. Tốc độ ly tâm là 3000 x g trong 20 phút. 1mL mẫu sau đó được cho qua cột sắc ký bắt AFP. Tốc độ nạp mẫu là 1 mL/phút. Các dung dịch đệm được sử dụng gồm đệm gắn sodium phosphate 20 mM, NaN_3 0.05%, pH 7.0; đệm rửa giải Glycine-HCl 0.1 M, NaCl 0.3 M, pH 2.7; đệm trung hòa Tris-HCl 1 M, NaN_3 0.05%, pH 9.0. Thu các phân đoạn protein không bám cột (Peak 1A.1 – không chứa AFP) và các phân đoạn protein bám cột (Peak 1A.2 – chứa AFP). Mẫu ở Peak 1A.2 sau đó được được kiểm tra độ sạch bằng phương pháp điện di không biến tính (native-PAGE) được mô tả ở phần sau.

II.4.6. Sắc ký lọc gel

Sử dụng gel Sephacryl S-100 và cột XK26/60 (GE Heathcare) để phân tách protein trong mẫu Peak 1A.2 chứa AFP. Mẫu được cô đặc và trao đổi đệm sodium phosphate 50 mM bằng phương pháp ly tâm lọc sử dụng amicon filter unit 10 kDa cut-off (tốc độ 3000 x g trong 20 phút) trước khi nạp vào cột. Dung dịch đệm sodium phosphate 50 mM, NaCl 0.15 M, NaN_3 0.05%, pH 7.0 được dùng trong quá trình sắc ký và tốc độ dòng 1.3 mL/phút.

II.4.7. Điện di biến tính (SDS-PAGE) và không biến tính (Native-PAGE)

SDS-PAGE được dùng để phân tích huyết thanh thỏ và IgG thỏ. Gel poly-acrylamide 12.5% được sử dụng. Protein sau điện di được phát hiện bằng phương pháp nhuộm với Coomassie blue. Native-PAGE được dùng để phân tích AFP với gel poly-acrylamide 7.5% và protein trong gel được phát hiện bằng nhuộm với $AgNO_3$. Hình ảnh điện di được ghi nhận bằng máy quét hình ảnh HP G4050.

II.4.8. Kỹ thuật western blot

Để kiểm tra độ sạch của AFP sau tinh chế cũng như độ đặc hiệu của IgG thỏ kháng AFP, protein trong gel được chuyển lên màng nitrocellulose có kích thước lỗ là 0.45 µm trong 1 giờ 30 phút bằng hệ thống chuyển màng semi-dry (Hoefer). Màng sau đó được khoá bằng 1% casein trong đệm TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) trong 1 giờ và sau đó được rửa 3 lần với đệm TBST trong 10 phút. Màng được ủ trong 1 giờ với huyết thanh thỏ sau khi gây đáp ứng miễn dịch với AFP (pha loãng huyết thanh trong đệm TBST để đạt nồng độ 0.73 µg/mL) và được rửa lại với đệm TBST. Màng sau đó được ủ với kháng thể dê kháng IgG thỏ (goat anti-rabbit IgG) được cộng hợp HRP (Santa Cruz Biotechnology) trong 1 giờ (pha loãng kháng thể trong đệm TBST để đạt nồng độ 0.04 µg/mL) và rửa với đệm TBST. Để phát hiện phức hợp lai kháng nguyên - kháng thể, màng được ủ với dung dịch hoá quang luminol và được quét bằng máy quét hình ảnh C-DiGit Blot Scanner (LI-COR). Hình ảnh kết quả western blot được xử lý bằng phần mềm ImageStudioLite.

II.4.9. Định lượng protein tổng số và protein sau tinh chế

Hàm lượng protein tổng số trong mẫu huyết tương/huyết thanh được xác định bằng phương pháp quang phổ đo độ hấp phụ quang của protein ở bước sóng 280 nm và 260 nm. Nồng độ protein được tính theo công thức C (mg/mL) = (1.55*A280 - 0.76*A260)*D, trong đó A280 và A260 là giá trị OD của mẫu huyết tương tương ứng ở bước sóng 280nm và 260nm, D là hệ số pha loãng của mẫu huyết tương (Alastair, Michèle 2009).

Lượng IgG thỏ sau tinh chế được xác định bằng phương pháp quang phổ đo độ hấp phụ quang của IgG ở bước sóng 280nm. Nồng độ protein được tính dựa trên hệ số tắt mole ε_{IgG} = 1.35 như sau: C_{IgG} (mg/mL) = A280*D/Lε, trong đó A280 là giá trị OD của IgG ở bước sóng 280nm, D là hệ số pha loãng của mẫu, L là chiều dài đường ánh sáng truyền qua mẫu, ε là hệ số tắt mole của protein.

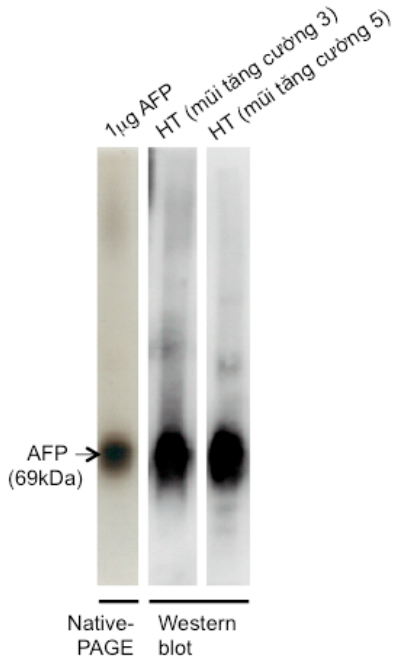
Lượng AFP sau tinh chế được xác định theo phương pháp Bradford, albumin huyết thanh bò (BSA, Sigma Aldrich) được dùng để xây dựng đường chuẩn.

III. KẾT QUẢ

III.1. Tạo kháng thể IgG thỏ kháng AFP người

Huyết thanh thỏ trước và sau khi gây đáp ứng miễn dịch (ở mũi tiêm tăng cường lần 3 và 5) với AFP tinh chế (thương mại) được dùng để đánh giá hiệu quả tạo IgG đặc hiệu với AFP. Kết

quả ở **Hình 1** cho thấy, có sự xuất hiện của vạch lai western blot chứng tỏ IgG kháng AFP đã được tạo thành ở thỏ sau tiêm. Huyết thanh thỏ trước tiêm không cho kết quả western blot (dữ liệu không trình bày).

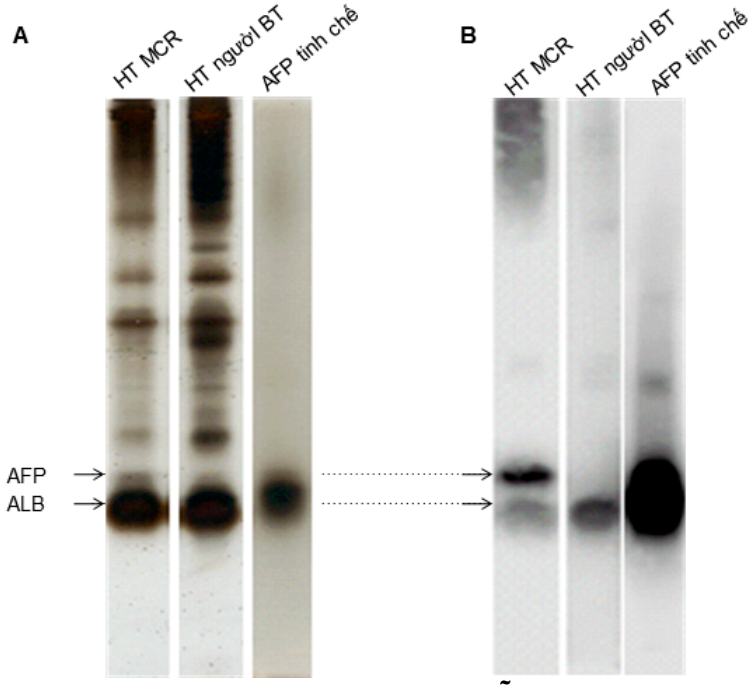


Hình 1: Phát hiện IgG kháng AFP trong HT thỏ bằng lai phân tử western blot. AFP trong gel native-PAGE được phát hiện bằng nhuộm $AgNO_3$.

III.2. Nhận diện AFP trong mẫu huyết tương máu cuống rốn ban đầu bằng western blot

Như đã đề cập ở trên, có khoảng 150 – 250 µg/mL AFP trong MCR. Để nhận diện được AFP trong mẫu MCR, chúng tôi tiến hành phân tích huyết tương MCR bằng Native-PAGE và western blot. AFP và ALB có phân tử lượng gần nhau (~69kDa cho AFP và ~66.5 kDa cho ALB trong MCR). Do đó, bằng điện di Native-PAGE và so sánh với AFP tinh chế chuẩn, có thể dự đoán vị trí của AFP trong mẫu huyết tương MCR trên gel (**Hình 2A**). Để khẳng định được sự hiện diện của AFP, chúng tôi tiến hành lai phân tử western blot các mẫu huyết tương MCR và huyết tương người bình thường với huyết thanh thỏ chứa kháng thể IgG kháng AFP (thu nhận sau lần tiêm tăng cường 5). Kết quả ở **Hình 2B** cho thấy, mẫu huyết tương người bình thường cho 1 vạch lai ở vị trí của ALB và mẫu huyết tương MCR có thêm 1 vạch lai với cường độ mạnh ngay phía trên vị trí của ALB và tương ứng với vị trí của AFP. Lý do của vấn đề này là do AFP và ALB có sự tương đồng 39% về thành phần cấu trúc (Morinaga et al., 1983) nên kháng thể kháng AFP có thể phản ứng chéo với ALB. Các dữ liệu được nêu cho thấy mẫu MCR được sử

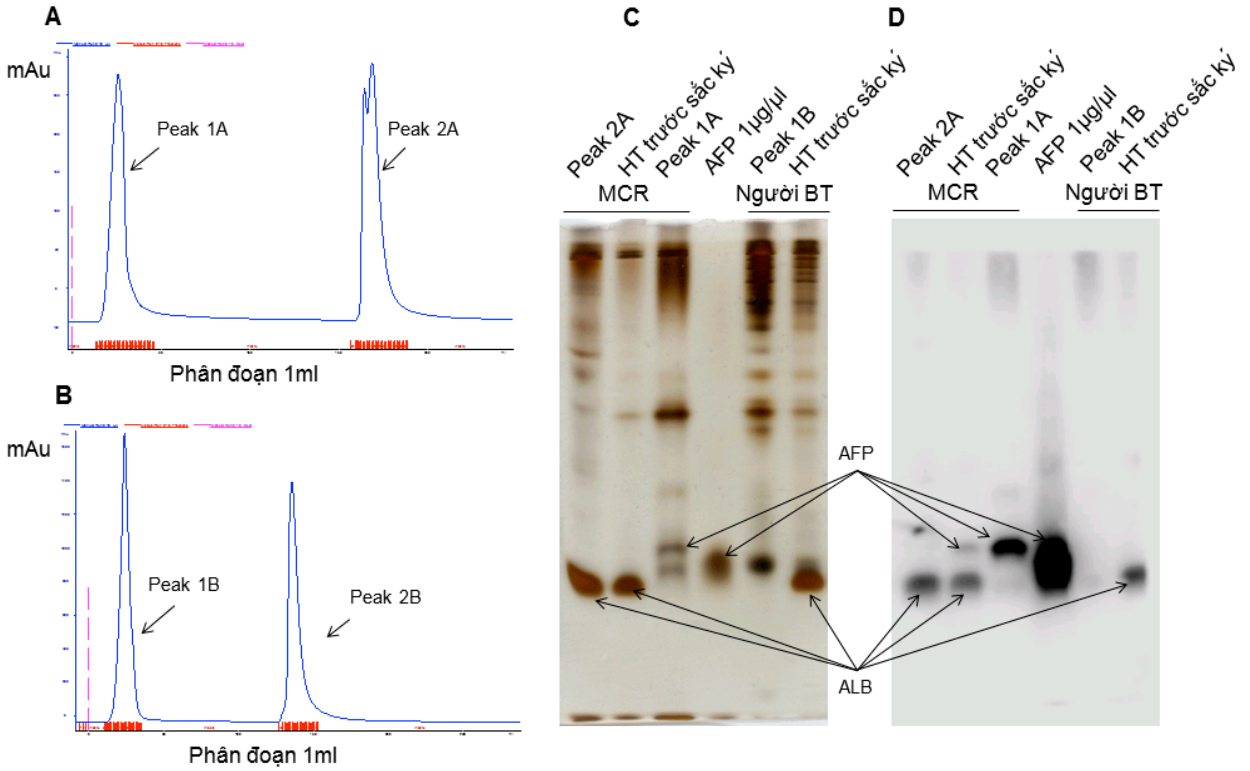
dụng trong nghiên cứu có sự hiện diện của AFP và sẽ được dùng để tinh chế AFP trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2: Kiểm tra sự hiện diện của AFP trong mẫu MCR. A, Điện di Native-PAGE huyếttương máu cuống rốn (HT MCR) và huyếttương người bình thường (HT người BT) trên gel polyacrylamide 7.5%. Protein được phát hiện bằng phương pháp nhuộm $AgNO_3$. B, Lai western blot các mẫu HT với kháng thể thỏ kháng AFP. AFP tinh chế (thương mai) được sử dụng làm chứng dương.

III.3. Loại albumin khỏi huyết tương máu cuốn rốn

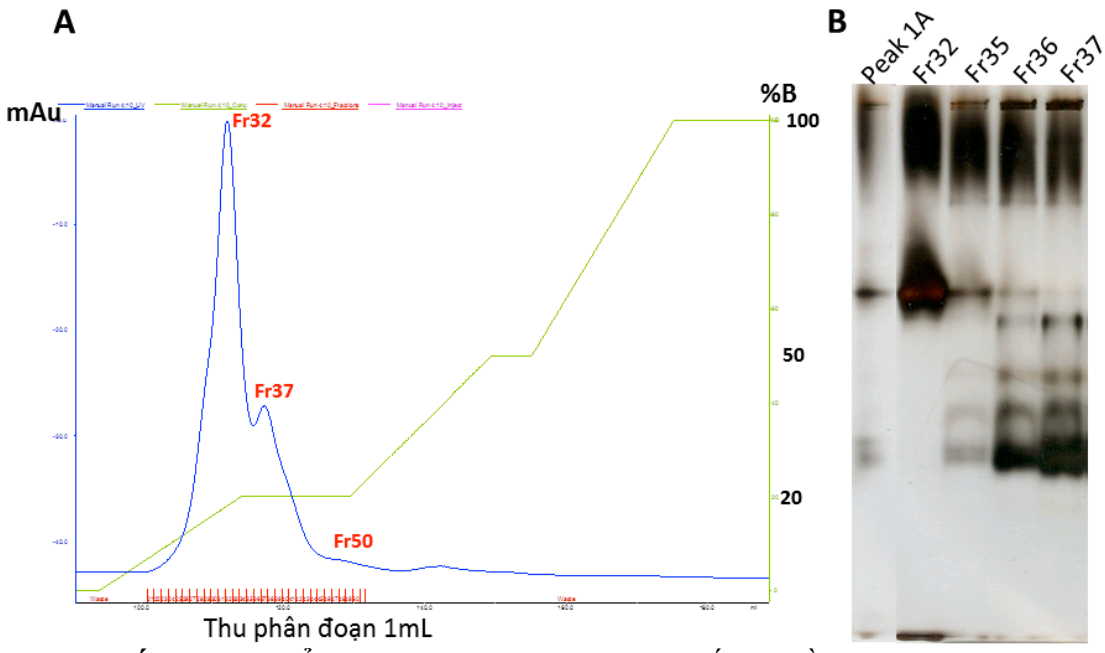
AFP và ALB có sự tương đồng cao về cấu trúc phân tử và ALB chiếm tỉ lệ lớn hơn rất nhiều so với AFP trong mẫu huyết tương MCR. Do đó, việc loại ALB ra khỏi huyết tương MCR là cần thiết trước khi tinh chế AFP. Để thực hiện được điều này, cột sắc ký ái lực Hitrap Blue HP được sử dụng để loại bỏ ALB (theo hướng dẫn của nhà sản xuất, GE Healthcare). Thí nghiệm được thực hiện với mẫu huyết tương MCR và mẫu huyết tương người bình thường. Kết quả sắc ký MCR cho thấy có 2 Peak được hình thành trên sắc ký đồ (**Hình 3A**) gồm Peak 1A chứa AFP không bám cột và Peak 2A chứa chủ yếu ALB bám cột. Tương tự, có 2 Peak được hình thành trên sắc ký đồ ở mẫu huyết tương người bình thường nhưng Peak 1B không chứa AFP. Phân tích mẫu sau sắc ký bằng Native-PAGE (**Hình 3C**) và western blot (**Hình 3D**) cho thấy hầu hết ALB được loại khỏi Peak 1 ở cả 2 mẫu huyết tương MCR và bình thường. Kết quả này cho phép mẫu từ Peak 1A của MCR có thể tiếp tục được sử dụng cho bước sắc ký tiếp theo.



Hình 3: Sắc ký loại ALB bằng cột sắc ký ái lực Hitrap Blue HP. A, Sắc ký đồ loại ALB từ huyết tương máu cuống rốn (MCR). B, Sắc ký đồ loại ALB từ huyết tương người bình thường (Người BT). C, Điện di Native-PAGE các mẫu HT trước và sau sắc ký. D, Lai western blot các mẫu HT trước và sau sắc ký với kháng thể IgG thỏ kháng AFP.

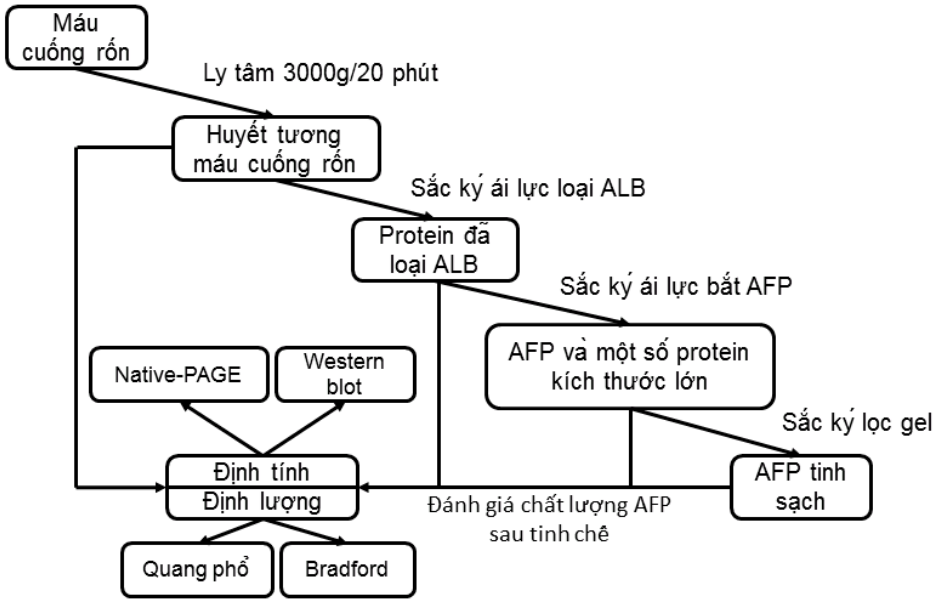
III.4. Sắc ký trao đổi ion âm

Peak 1A của MCR (**Hình 3A**) được sử dụng để sắc ký trao đổi ion âm qua cột DEAE. Kết quả sắc ký cho thấy thu được 2 Peak khi tăng dần phần trăm đệm rửa giải từ 0 – 20% và khi giữ nguyên ở 20%, sau đó, khi tăng dần nồng độ muối từ 20% đến 100% thì hầu như không thu được protein nào khác (**Hình 4A**). Kết quả điện di ở **Hình 4B** cho thấy các phân đoạn 32 (Fr32) và 35 (Fr35) (Peak 1A.1) hầu hết chứa các protein có kích thước từ 150 kDa trở lên, các phân đoạn 36 (Fr36) và phân đoạn 37 (Fr37) (Peak 1A.2) có chứa AFP nhưng đồng thời cũng chứa đa số các protein còn lại trong mẫu Peak 1A trước sắc ký. Như vậy, sau sắc ký trao đổi ion âm, chúng tôi không thể tách được AFP khỏi hỗn hợp các protein còn lại. Do đó cần phải có sự thay đổi trong quy trình sắc ký để thu được AFP tinh sạch.



Hình 4: Sắc ký trao đổi ion âm qua cột DEAE. A, Sắc ký đồ Peak 1A qua cột trao đổi ion âm DEAE. B, Điện di Native-PAGE mẫu trước và sau sắc ký trao đổi ion âm.

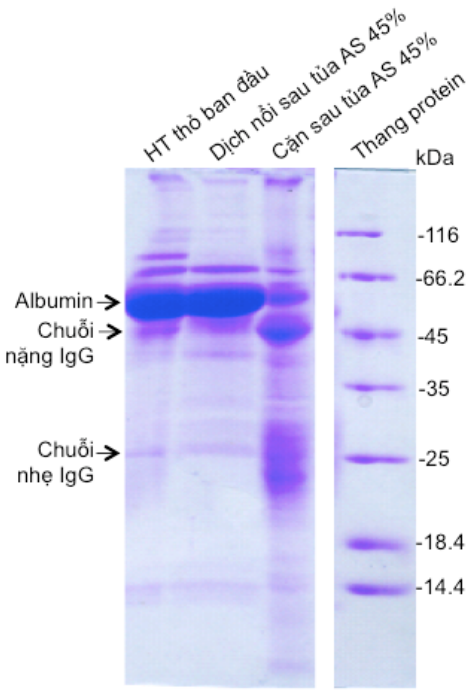
Tham khảo một số quy trình tinh chế AFP của Czokalo (1979), của Chaturvedi và cộng sự (1998), và trải qua quá trình thực nghiệm, chúng tôi đã thiết lập quy trình sắc ký 3 bước để tinh chế AFP từ MCR người, gồm: sắc ký ái lực loại ALB, sắc ký bắt AFP qua cột gắn kháng thể kháng AFP và sắc ký lọc gel, được tóm tắt trong sơ đồ 2:



Sơ đồ 2: Quy trình sắc ký ba bước tinh chế AFP từ MCR người

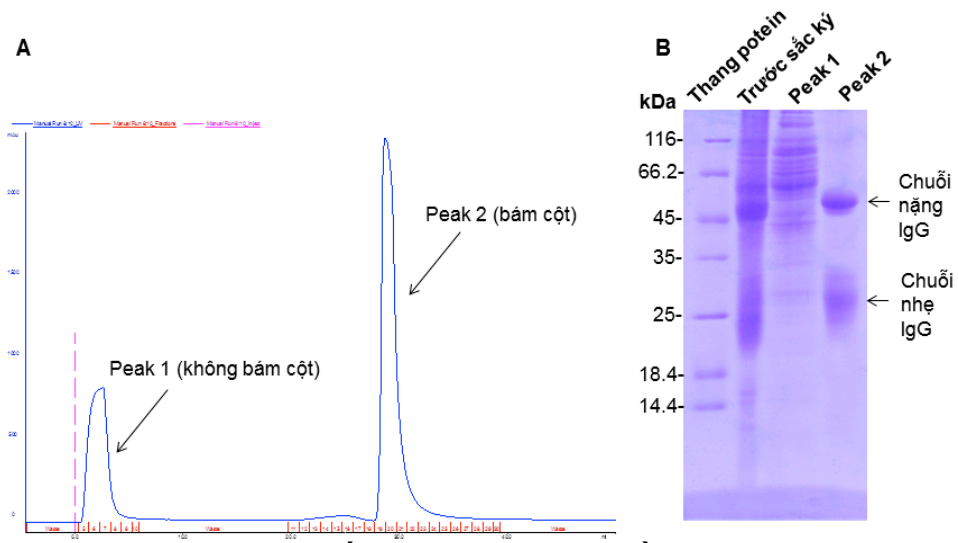
III.5. Kết quả tinh chế IgG thỏ kháng AFP

Huyết thanh thỏ sau tiêm tăng cường lần 5 được sử dụng để tinh chế IgG kháng AFP. Việc tinh chế được thực hiện qua 2 bước gồm tủa IgG với dung dịch AS 45% bão hòa và sắc ký ái lực với protein G. Ở bước tủa IgG, kết quả cho thấy có sự gia tăng đáng kể (có thể nhìn thấy được) tỉ lệ IgG trong hỗn hợp sau tủa so với huyết thanh ban đầu (**Hình 5**). Chuỗi nặng (~50kDa) và chuỗi nhẹ (~25kDa) của IgG có thể được nhận diện dễ dàng trong gel.



Hình 5: Phân tích IgG sau tủa với AS 45% bão hòa bằng SDS-PAGE. Protein trong gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie blue.

IgG sau tủa với AS 45% được tiếp tục sử dụng cho sắc ký ái lực với protein G. Kết quả sắc ký cho thấy có 2 phân đoạn được thể hiện trên sắc ký đồ gồm Peak 1 (phần protein không bám cột) và Peak 2 (phần protein IgG bám cột). Mẫu trước và sau sắc ký được phân tích bằng SDS-PAGE. Kết quả ở **Hình 6** cho thấy Peak 2 chứa chủ yếu protein chuỗi nặng (~50kDa) và chuỗi nhẹ (~25kDa) của IgG.



Hình 6: Phân tích IgG sau tinh chế với cột protein G bằng SDS-PAGE. Protein trong gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie blue.

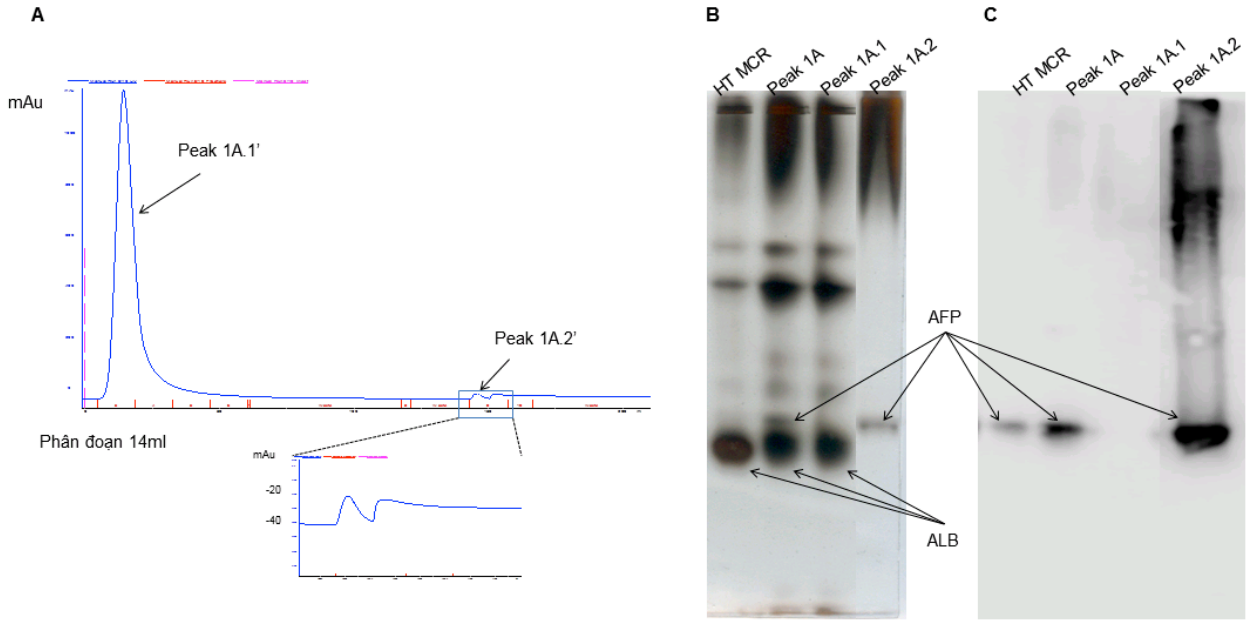
IgG thỏ kháng AFP có khả năng nhận diện AFP trong máu cuống rốn người

Máu cuống rốn người chứa 150 - 250 µg/mL AFP. Để kiểm tra hoạt tính của IgG sau tinh chế, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nhận diện AFP trong huyết tương máu cuống rốn bằng kỹ thuật western blot. Như kỳ vọng, kết quả (**Hình 7**) cho thấy IgG có khả năng nhận diện được AFP trong huyết tương máu cuống rốn và ít có phản ứng không đặc hiệu với các protein khác. Kháng thể thỏ kháng AFP tinh sạch thu nhận được sau bước tinh chế qua cột protein G được sử dụng để cộng hợp lên gel, tạo cột sắc ký ái lực bắt AFP.

Hình 7: Đánh giá hoạt tính kháng AFP của IgG sau tinh chế với HT MCR bằng western blot. Protein huyết tương trong gel native-PAGE được phát hiện bằng nhuộm $AgNO_3$.

III.6. Bắt AFP bằng cột sắc ký ái lực mang kháng thể IgG thỏ kháng AFP

Peak 1A của MCR (**Hình 3A**) được sử dụng để bắt AFP bằng sắc ký ái lực mang kháng thể IgG thỏ kháng AFP. Kết quả sắc ký cho thấy Peak 1A.1' và 1A.2' được hình thành trên sắc ký đồ (**Hình 8A**), trong đó Peak 1A.2' dự kiến là Peak chứa AFP. Kết quả kiểm tra bằng điện di không biến tính (**Hình 8B**) và lai western blot với kháng thể IgG thỏ kháng AFP (**Hình 8C**) cho thấy sau sắc ký toàn bộ AFP đã được giữ lại trong cột và được thôi giải khỏi cột ở Peak 1A.2'. Tuy nhiên, một lượng protein có phân tử lượng lớn xuất hiện cùng với AFP. Điều này cho thấy kháng thể IgG kháng AFP sử dụng trong thí nghiệm không chỉ phản ứng chéo với ALB mà còn phản ứng với một số protein có phân tử lượng lớn khác trong huyết tương.

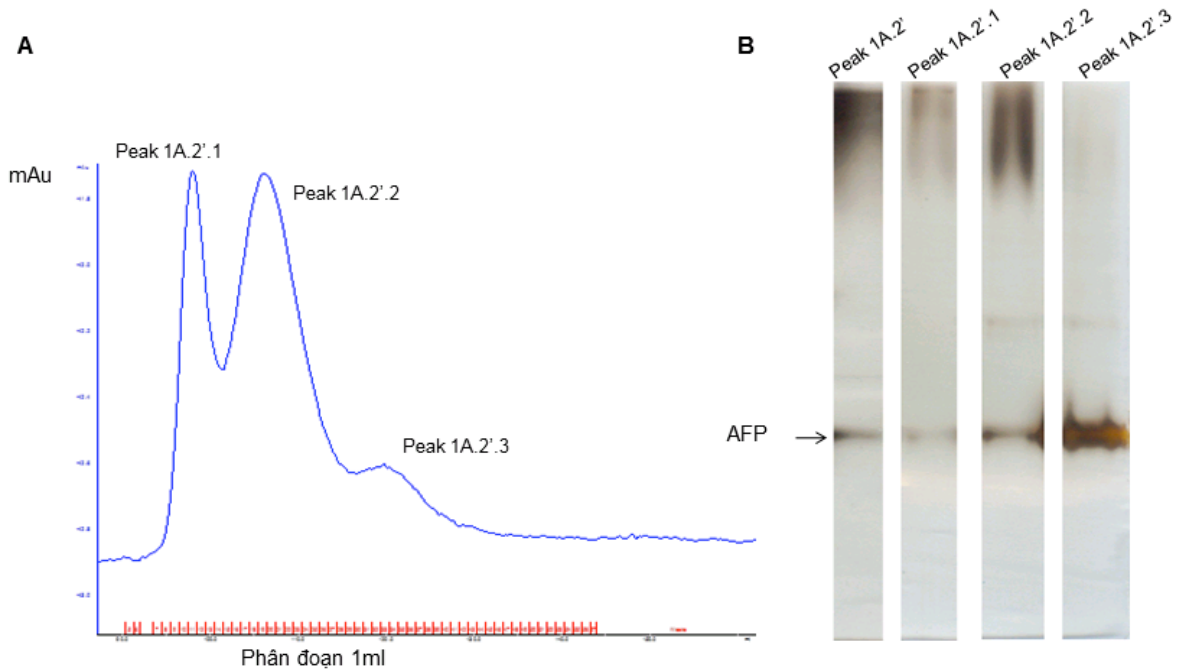


Hình 8: Kết quả sắc ký ái lực bắt AFP. A, Sắc ký đồ thể hiện sự phân tách của các protein không bám cột và bám cột sau khi qua cột ái lực với AFP. B, Điện di native-PAGE trên gel polyacrylamide 7.5%. C- Lai western blot các mẫu trước và sau sắc ký ái lực bắt AFP.

III.7. Tinh chế AFP bằng sắc ký lọc gel

Hình 8B cho thấy protein AFP nằm ở vị trí tách biệt so với các protein có phân tử lượng lớn khác ở trong gel phân tách. Điều này cho thấy, có thể sử dụng sắc ký lọc gel để phân tách các protein này nhằm đạt được độ sạch cao của AFP. Để thực hiện giả thiết này, chúng tôi sử dụng cột lọc XK26/60 chứa gel sephacryl S-100 để phân tách protein trong Peak 1A.2'. Kết quả trên sắc ký đồ cho thấy có 3 Peak (Peak 1A.2'.1, Peak 1A.2'.2, và Peak 1A.2'.3) được ghi nhận (**Hình 9A**). Phân tích các Peak này bằng Native-PAGE cho thấy AFP được phát hiện ở tất cả các Peak nhưng Peak 1A.2'.3 chứa AFP với độ sạch được ước tính >95% (**Hình 9B**). Kết quả định

lượng AFP bằng phương pháp Bradford cho thấy có 10.4µg AFP được thu hồi từ mỗi mL huyết tương MCR ban đầu.



Hình 9: Phân tích AFP sau sắc ký lọc gel. A, Sắc ký đồ thể hiện sự phân tách của các protein sau khi qua cột lọc gel sephacryl S-100. B, Điện di Native-PAGE trên gel polyacrylamide 7.5%.

III.8. Phân tích hiệu quả tinh chế AFP sau ba bước sắc ký

Để đánh giá hiệu quả tinh chế AFP sau 3 bước sắc ký, chúng tôi lặp lại ít nhất 3 lần thí nghiệm ở mỗi bước sắc ký, các kết quả tính toán được lấy giá trị trung bình. Từ 1 mL huyết tương máu cuống rốn ban đầu (tương đương 67.6 mg protein tổng số), sau sắc ký loại ALB thu được 21.4 mg protein phân đoạn không bám cột (Peak 1A) chứa AFP mục tiêu (tương đương 31.5% tổng protein ban đầu); sau sắc ký qua cột cộng hợp IgG thỏ kháng AFP, thu được 0.1 mg protein phân đoạn không bám cột (Peak 1A.2') chứa AFP mục tiêu (tương đương 0.18% tổng protein ban đầu); sau sắc ký qua cột lọc gel sephacryl S-100, thu được 10.4 µg AFP tinh sạch, hiệu suất thu hồi đạt 7%.

IV. THẢO LUẬN

Sau khi AFP được phát hiện lần đầu tiên trong huyết thanh thai người vào năm 1956 (Bergstrand, Czar 1956). Cho tới nay, trên thế giới đã có nhiều các công bố liên quan tới tinh chế AFP của nhiều loài khác nhau (chuột, chuột lớn, người) từ nhiều nguồn khác nhau như nước ối, máu thai, gan thai, máu cuống rốn, hay từ dòng tế bào ung thư gan HepG2. Trong số hàng loạt các phương pháp đã được sử dụng để tinh chế AFP, phương pháp miễn dịch sử dụng kháng thể

kháng AFP mang lại hiệu quả cao (Nishi, Nirai 1971). Phương pháp sắc ký lọc gel là bước quyết định để thu được AFP tinh sạch với hiệu suất thu hồi cao. Ngoài ra, một số phương pháp khác cũng được sử dụng để tinh chế AFP như: sắc ký qua cột kháng thể kháng AFP kết hợp qua cột trao đổi ion âm DEAE tinh chế AFP từ nước ối của chuột (Kuhlmann 1975); sắc ký ái lực qua cột kháng thể kháng AFP và cột Concavalin A (Con-A) sepharose tinh chế AFP từ MCR cho hiệu suất thu hồi 20% (Chudy, Zizkovsky 1987); sắc ký ái lực qua cột estrogen E2 bắt AFP có ái lực với E2 (Allen et al., 1993). Tuy nhiên, Con-A có ái lực với dạng glycoform của AFP trong khối u tế bào mầm và các bệnh lý về gan như HCC là chủ yếu (Govindarajan et al., 1987). Tương tự, có tới 80% AFP trong AFP tổng số của chuột có ái lực với E2 nhưng chỉ có chưa tới 20% AFP trong AFP tổng số của người có ái lực với E2 (Allen et al., 1993). Do đó, các phương pháp trên không hiệu quả khi áp dụng để tinh chế AFP từ MCR người. Vấn đề khó khăn nhất trong tinh chế AFP với các kỹ thuật lý – hóa truyền thống là tách AFP khỏi ALB, vì như đã đề cập, hai protein này tương tự nhau về trọng lượng phân tử, về điểm đẳng điện cũng như thành phần chuỗi amino acid. Sắc ký ái lực qua cột Blue sepharose gắn phối tử Cibacron là phương pháp tốt nhất hiện nay để loại ALB trước khi tinh chế AFP.

Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về tinh chế AFP từ huyết tương máu cuống rốn. Do vậy, đây là kết quả nghiên cứu tinh chế AFP từ máu cuống rốn người đạt được đầu tiên ở Việt Nam. Quy trình tinh chế AFP từ máu cuống rốn người mà chúng tôi áp dụng tuy chỉ đạt hiệu suất thu hồi AFP khoảng 7%, khá thấp so với các kết quả đã công bố trước đó của Czokalo (1979) là 30%, của Chaturvedi và cộng sự (1998) là 45%, nhưng cho phép thu được AFP có độ sạch cao, >95%. Việc tinh chế thành công AFP với độ sạch cao sẽ tạo tiền đề cho phát triển các sản phẩm chẩn đoán và nghiên cứu cơ bản ở Việt Nam.

V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

AFP là một protein giữ vai trò quan trọng trong chẩn đoán huyết thanh học bệnh ung thư gan và các bệnh lý khác liên quan đến gan. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo được IgG thỏ kháng AFP máu cuống rốn tinh chế của người. IgG sau tinh chế có độ sạch cao (~99%) được ước tính bằng SDS-PAGE và có khả năng nhận diện được AFP có trong mẫu huyết tương máu cuống rốn người Việt Nam. Việc có được một kháng thể đặc hiệu với AFP có ý nghĩa thực tiễn để phát triển các sản phẩm chẩn đoán trong nước và thay thế dần các sản phẩm cùng chức năng được nhập ngoại hiện nay.

Bằng cách kết hợp các phương pháp sắc ký (sắc ký ái lực loại ALB, sắc ký ái lực qua cột cộng hợp IgG thỏ kháng AFP và sắc ký lọc gel), chúng tôi đã tinh chế được AFP với độ tinh sạch >95%. Lượng AFP thu hồi sau tinh chế khoảng 10.4µg AFP từ mỗi mL huyết tương MCR ban đầu, đạt hiệu suất 7%. Kết quả của nghiên cứu này có thể được ứng dụng để tinh chế AFP với lượng lớn nhằm tận dụng nguồn thải MCR và tạo nguyên liệu đầu vào quan trọng cho các sản phẩm phát hiện AFP dùng trong chẩn đoán HCC và các bệnh lý khác liên quan đến AFP.

Với các sản phẩm tinh chế đã thu được trong phạm vi đề tài, chúng tôi kiến nghị tiếp tục phát triển đề tài theo hướng tạo các sản phẩm ứng dụng, như: up-scale quy trình tinh chế nhằm thu nhận lượng lớn IgG thỏ kháng AFP và AFP tinh sạch, tạo sản phẩm kit định lượng/bán định lượng AFP ứng dụng trong chẩn đoán HCC cũng như một số loại ung thư khác liên quan đến AFP.

Chủ nhiệm đề tài

(Ký và ghi rõ họ tên)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alastair A, Michèle PL (2009). Protein Determination by UV Absorption. The Protein Protocols Handbook. J. M. Walker, Humana Press**:** 3-6.

Allen SH, Bennett JA, Mizejewski GJ, Andersen TT, Ferraris S, Jacobson HI (1993) Purification of alpha-fetoprotein from human cord serum with demonstration of its antiestrogenic activity. Biochim Biophys Acta 1202: 135-142.

Bergstrand CG, Czar B (1956) Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. Scand J Clin Lab Invest 8: 174.

BuIleid N J, Freedman R B (1990) Cotranslational glycosylation of proteins in systems depleted of protein disulphide isomerase. The EMBO Journal 9: 3527-3532.

Chaturvedi R, Agarkar V, Sharma GL, Sarma PU (1998) Purification of alpha feto protein from human cord blood. Prep Biochem Biotechnol 28: 293-303.

Chen J, Rocken C, Treiber G, Jentsch-Ulrich K, Malfertheiner P, Ebert MP (2003) Clinical implications of alpha-fetoprotein expression in gastric adenocarcinoma. Dig Dis 21: 357-362.

Chudy D, Zizkovsky V (1987) A simple and rapid method for the isolation of human alpha-fetoprotein from human cord serum. Neoplasma 34: 491-496.

Czokalo M (1979) Human alpha-fetoprotein/AFP/ I. Isolation of homogenous AFP from cord blood serum. Mol Cell Biochem 25: 179-185.

Gan Y, Liang Q, Song X (2014) Diagnostic value of alpha-L-fucosidase for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. Tumour Biol 35: 3953-3960.

Gitlin D, Perricelli A, Gitlin GM (1972) Synthesis of alpha-fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. Cancer Res 32: 979-982.

Govindarajan S, Fong TL, Ashcavai M (1987) Concanavalin A affinity of alpha-fetoprotein. Its use in differentiating tumors. Am J Clin Pathol 88: 722-724.

Johnson PJ, Poon TC, Hjelm NM, Ho CS, Ho SK, Welby C, Stevenson D, Patel T, Parekh R, Townsend RR (1999) Glycan composition of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma and non-seminomatous germ cell tumour. Br J Cancer 81: 1188-1195.

Kudo M (2013) Alpha-fetoprotein-L3: Useful or Useless for Hepatocellular Carcinoma? Liver Cancer 2: 151-152.

Kuhlmann WD (1975) Purification of mouse alpha1-fetoprotein and preparation of specific peroxidase conjugates for its cellular localization. Histochemistry 44: 155-167.

Mizejewski GJ (2004) Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development. Exp Biol Med (Maywood) 229: 439-463.

Morinaga T, Sakai M, Wegmann TG, Tamaoki T (1983) Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 4604-4608.

Nishi S, Nirai H (1971) Purification and chemical characterization of human alpha-fetoprotein Protides Biol Fluids 18: 43-47.

Nguyễn Lê Trang (2010) Tạo và tinh sạch kháng thể kháng Fcy người cộng hợp FITC

Pang RW, Joh JW, Johnson PJ, Monden M, Pawlik TM, Poon RT (2008) Biology of hepatocellular carcinoma. Ann Surg Oncol 15: 962-971.

Shirabe K, Takenaka K, Gion T, Shimada M, Fujiwara Y, Sugimachi K (1997) Significance of alpha-fetoprotein levels for detection of early recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatic resection. J Surg Oncol 64: 143-146.

Tan CK, Law NM, Ng HS, Machin D (2003) Simple clinical prognostic model for hepatocellular carcinoma in developing countries and its validation. J Clin Oncol 21: 2294-2298.

BÁO CÁO SỬ DỤNG KINH PHÍ

- **Tổng kinh phí được duyệt: 35 triệu**
- **Kinh phí đã được cấp: 17.5 triệu**
- **Sử dụng kinh phí :** ***liệt kê theo bảng dưới***

STT	Số Hoá đơn	Ngày	Tiền (Đồng)
1	0007484	02/03/15	378.000
2	0002281	23/03/15	660.000
3	0010914	20/04/15	786.001
4	0073986	28/05/15	783.000
5	0013054	10/06/15	119.000
6	0001460	10/06/15	291.500
7	0000314	26/06/15	176.000
8	0000558	24/08/15	1.995.000
9	0000026	01/09/15	176.000
10	0000068	04/09/15	385.000
11	0020124	25/09/15	180.000
12	0040853	06/10/15	3.621.000
13	0024705	14/10/15	2.588.256
14	0030584	09/10/15	418.093
15	0000581	02/10/15	218.004
16	0021269	13/10/15	625.000
17	0005966	24/11/15	1.016.400
18	0001747	10/12/15	203.500
19	0007573	28/01/16	189.000
20	0003941	21/01/16	920.000
21	0001477	29/02/16	5.871.000
22	0001478	29/02/16	4.652.000
23	0001933	31/03/16	8.748.246
		Cộng	**35.000.000**

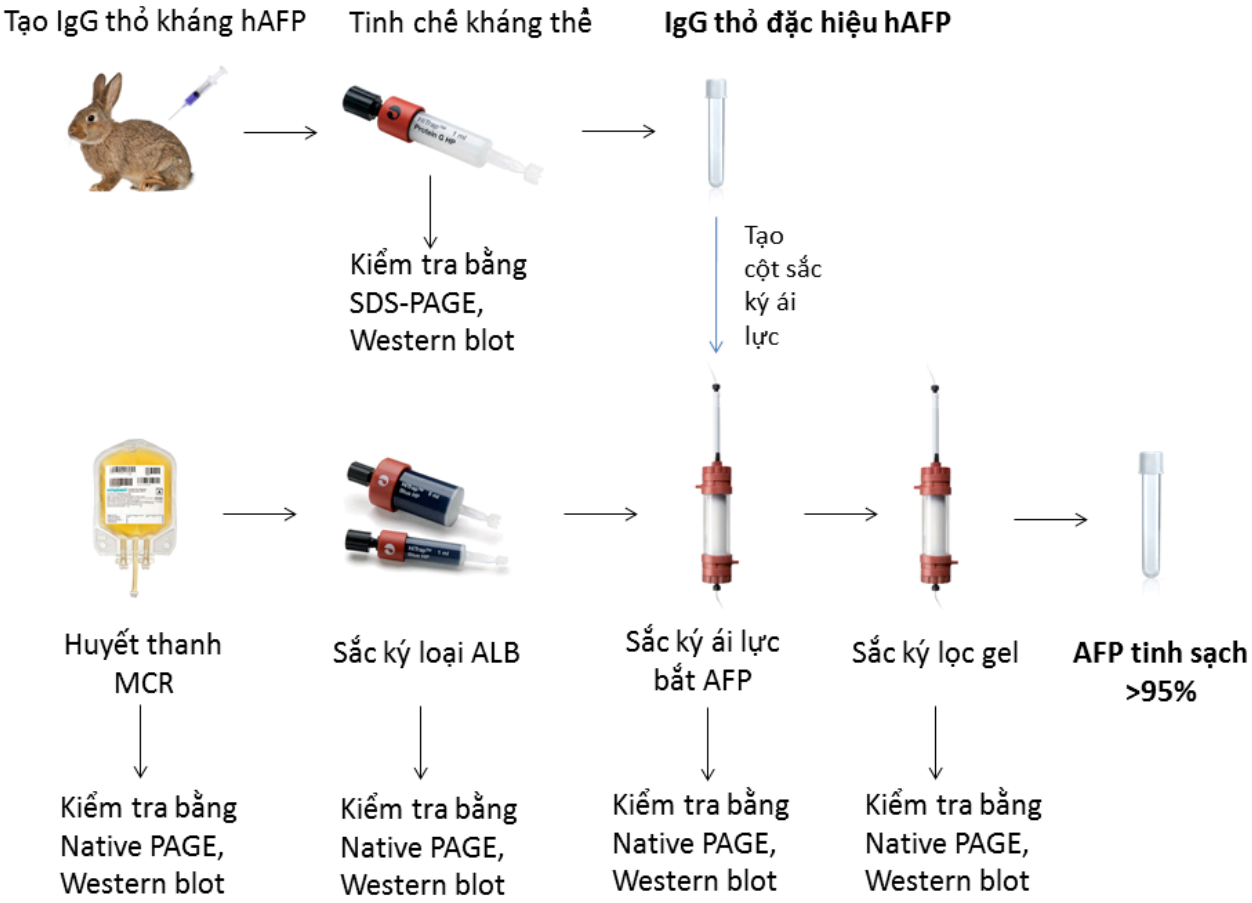
PHỤ LỤC

- Sơ đồ quy trình tinh chế AFP từ máu cuống rốn người
- Danh mục bài báo, báo cáo khoa học liên quan đến đề tài (đính kèm các bài báo, báo cáo).
  + Báo cáo hội nghị:

    01 báo cáo poster trong Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2016.
  + Báo cáo khoa học:

    01 bài báo trong Kỷ yếu khoa học trường ĐH Nguyễn Tất Thành (Đang biên tập)

    01 bài báo cho tạp chí Công nghệ sinh học (Đang chờ phản biện)
- Quyết định liên quan đến hướng dẫn sinh viên làm luận văn:
  + Hướng dẫn 01 sinh viên đại học Công nghiệp TP. HCM (đã hoàn thành năm 2015)
  + Hướng dẫn 01 sinh viên đại học Nguyễn Tất Thành (bảo vệ năm 2017)
- Phiếu đăng ký đề tài.
- Thuyết minh đề tài.
- Hợp đồng thực hiện đề tài NCKH (photo bản đã ký với Trường)

PHỤ LỤC

Sơ đồ quy trình tinh chế AFP từ máu cuống rốn người