

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN hGM-CSF TRÊN TẾ BÀO CHO-K1

Trương Hoàng Phụng, Ngô Thị Kim Hằng, Trần Văn Hiếu*

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp Hồ Chí Minh, *tvhieus@hcmus.edu.vn

TÓM TẮT: Nhân tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt và đại thực bào người (hGM-CSF, human granulocyte-macrophage colony stimulating factor) là một cytokine có phổ tác dụng rộng trong cơ thể, từ các tế bào tiền thân tạo máu, tế bào tua, đến tế bào cơ trơn, tế bào biểu mô và cả một số tế bào thần kinh. Sự glycosyl hóa, dù không đóng vai trò trong tương tác với thụ thể nhưng có tác dụng làm tăng độ bền cho hGM-CSF ở điều kiện in vivo. Những sản phẩm hGM-CSF tái tổ hợp sử dụng rộng rãi hiện nay chủ yếu được sản xuất từ *Escherichia coli* và *Saccharomyces cerevisiae*, những loại tế bào chủ không có bộ máy biến đổi sau dịch mã giống người. Trong nghiên cứu này, gene hgm-csf mã hóa cho protein hGM-CSF được chuyển vào trong tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (CHO-K1 cells) và đánh giá khả năng biểu hiện protein. Trước tiên, gene được chèn vào plasmid pcDNA3.1+ đúng khung đọc mở ngay sau promoter CMV tại vị trí EcoRI và XhoI. Plasmid tái tổ hợp được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp đặc hiệu, cắt giới hạn và giải trình tự. Plasmid tái tổ hợp sau quá trình kiểm tra được đặt tên pcDNA-hGM. Sau đó, plasmid tái tổ hợp đưa vào tế bào CHO-K1 bằng phương pháp biến nạp sử dụng cationic lipid và nuôi chọn lọc bằng kháng sinh geneticin. Kết quả cho thấy, gene hgm-csf đã được dòng hoá vào plasmid pcDNA3.1+ tại vị trí EcoRI và XhoI. Dịch môi trường nuôi tế bào CHO-K1/pcDNA-hGM cho thấy khả năng kích thích sự tăng sinh của dòng tế bào TF-1, dòng tế bào sống phụ thuộc hGM-CSF. Như vậy, plasmid tái tổ hợp pcDNA-hGM đã được cấu trúc thành công và dòng tế bào mang gene tái tổ hợp CHO-K1/pcDNA-hGM biểu hiện protein hGM-CSF có hoạt tính. Đây là nghiên cứu đầu tiên về biểu hiện hGM-CSF trên tế bào CHO-K1 ở Việt Nam và là cơ sở cho bước khảo sát các điều kiện thu nhận và tinh chế hGM-CSF tiếp sau.

Từ khóa: hGM-CSF, biến nạp dùng cationic lipid, tế bào CHO-K1, tế bào TF-1.

MỞ ĐẦU

GM-CSF là cytokine có các chức năng sinh học quan trọng như kích thích tăng sinh và biệt hóa tạo ra các loại tế bào máu, hoạt hóa, tăng cường hoạt tính và duy trì sự tồn tại của chúng [4]. GM-CSF huy động được tế bào gốc nguyên thủy trong tủy xương [8], tác động tăng sinh và biệt hóa trực tiếp lên tế bào gốc và các tiền tủy bào của dòng tế bào bạch cầu hạt-đơn nhân, nhờ đó mà GM-CSF có khả năng làm tăng mạnh số lượng hàng loạt các loại tế bào máu như bạch cầu ưa acid, bạch cầu ưa kiềm, bạch cầu trung tính, tế bào đơn nhân, cũng như tế bào hồng cầu và tế bào nhân to từ các loại tế bào tiền thân tương ứng [2]. GM-CSF còn hoạt hóa nhiều loại tế bào khác như nguyên bào sợi, tế bào nội mô và tế bào cơ trơn. Bên cạnh đó, GM-CSF duy trì sự tồn tại cho tế bào tua, bạch cầu ưa acid và bạch cầu ưa kiềm. Khi cơ thể bị xâm nhiễm, GM-CSF kích thích hoạt động thực bào và các cơ chế giết nội bào, thúc đẩy sự di chuyển của bạch cầu trung tính và đại thực bào vào sâu

trong ổ viêm. GM-CSF giúp đại thực bào tăng khả năng trình diện kháng nguyên thông qua tăng biểu hiện phức hợp tương hợp mô chính nhóm II (MHC-II) và phân tử đồng thụ thể kích thích [9]. Những nghiên cứu về GM-CSF đã được thực hiện từ trước năm 1977, cho đến nay đã có một số sản phẩm protein tái tổ hợp được cấp phép sản xuất thương mại cho điều trị lâm sàng [6]. GM-CSF được chỉ định chủ yếu nhằm ngăn ngừa hay chữa trị chứng suy giảm bạch cầu cho các bệnh nhân khi hóa trị, xạ trị ung thư hoặc phải hủy tủy để cấy ghép tủy xương [1], nhờ đó, bệnh nhân tránh được các bệnh nhiễm trùng cơ hội, nguy cơ tử vong và duy trì được phác đồ điều trị hiệu quả nhất. Ứng dụng của GM-CSF còn được mở rộng để làm lành các vết loét da khó lành ở bệnh nhân đái tháo đường hay viêm tĩnh mạch mãn tính [3]. Cytokine này cũng đã được sử dụng rộng rãi trong các thử nghiệm lâm sàng làm tá dược cho một số loại vaccine, đặc biệt, nó còn thể hiện vai trò trong đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên khối u ở

mô hình động vật [7]. Tiềm năng của GM-CSF cho các mục đích điều trị ung thư, tổn thương thần kinh, HIV... vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu và thử nghiệm. Nhờ có nhiều ứng dụng như vậy, việc sản xuất hGM-CSF tái tổ hợp đã được quan tâm từ lâu. Những sản phẩm hGM-CSF sử dụng rộng rãi hiện nay chủ yếu được sản xuất từ *Escherichia coli* và *Saccharomyces cerevisiae*, những loại tế bào chủ không có bộ máy biến đổi sau dịch mã giống người. Điều này dẫn tới thuốc ít bền trong điều kiện cơ thể và gây đáp ứng miễn dịch thải loại thuốc sau thời gian điều trị lâu dài. Trong nghiên cứu của chúng tôi, gene *hgm-csf* mã hóa cho protein hGM-CSF được chuyển vào trong tế bào CHO-K1 có nguồn gốc từ buồng trứng chuột hamster Trung Quốc, một dòng tế bào được sử dụng rộng rãi trong sản xuất protein tái tổ hợp người [5] nhằm thu được protein có hoạt tính và biến đổi giống dạng tự nhiên ở người nhất.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Plasmid pCMV.sport6/*hgm-csf*: chứa trình tự *hgm-csf* để thu gene. Plasmid pcDNA3.1+ (Invitrogen, Hoa Kỳ, V790-20): dùng làm vector dòng hóa gene *hgm-csf*, mang gene kháng ampicillin để sàng lọc trên tế bào vi khuẩn, gene kháng neomycin để sàng lọc trên tế bào động vật và có promoter CMV để biểu hiện trên tế bào động vật. Chủng *E. coli* DH5 α (F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*) (Invitrogen, Hoa Kỳ) dùng để dòng hóa và lưu trữ plasmid tái tổ hợp. Dòng tế bào CHO-K1 (ATCC CCL-61) để biểu hiện protein hGM-CSF. Dòng tế bào TF-1 (ATCC CRL-2003): được sử dụng để thử hoạt tính hGM-CSF thu được. Các plasmid, chủng vi khuẩn, dòng tế bào được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Thu nhận gene *hgm-csf* bằng kỹ thuật PCR

Gene mục tiêu *hgm-csf* được thu nhận từ plasmid pCMV.sport6/*hgm-csf* bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu nằm trên gene (mồi xuôi: GAATTCGCCACCATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGC; mồi ngược: CTCGAGTT

ATTACTCCTGGACTGGCTCCCAGC), có mang trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn XhoI ở đầu 5' và EcoRI ở đầu 3' (trình tự gạch chân). Chương trình PCR như sau: 5 phút ở 94°C; 30 chu kỳ gồm 94°C trong 45 giây, 52°C trong 45 giây và 72°C trong 45 giây và 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng Kit EZ 10Spin column DNA Purification (Bio basic Inc., Hoa Kỳ), sau đó được xử lý với XhoI và EcoRI. Sản phẩm cắt tiếp tục được tinh sạch bằng cột EZ 10.

Tạo plasmid tái tổ hợp pcDNA3.1+ mang gene *hgm-csf* (pcDNA-hGM), sàng lọc và kiểm tra thể tái tổ hợp

Plasmid pcDNA3.1 + được cắt bằng XhoI và EcoRI và tinh sạch qua cột EZ 10. T4 ligase (Fermentas, Canada) được dùng để nối gene *hgm-csf* vào vector. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp, huyền phù tế bào được trải trên đĩa môi trường LB agar (cao nấm men 0,5%, tryptone 1%, NaCl 0,5%, agar 2%) với 100 μ g/ml ampicillin (LBA-Amp), ủ ở 37°C trong khoảng 16h đến 18h.

Các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa LBA-Amp được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi nằm trên gene theo chu kỳ nhiệt đã trình bày ở trên. Plasmid tái tổ hợp thu được tiếp tục được PCR với cặp mồi trên gene và cặp mồi trên plasmid là T7 promoter forward primer và BGH (pcDNA) reverse primer (Life Technologies, Hoa Kỳ) (các phản ứng PCR thực hiện theo chu kỳ nhiệt đã trình bày ở trên). Đồng thời, plasmid tái tổ hợp cũng được cắt giới hạn bằng hai enzyme XhoI và EcoRI. Các sản phẩm PCR và cắt giới hạn được điện di trên gel agarose 1% với thang DNA 1kb Plus (Fermentas, Canada). Plasmid sau quá trình kiểm tra được gửi giải trình tại Macrogen, Hàn Quốc và so sánh với thiết kế ban đầu bằng phần mềm Jellyfish.

Biến nạp pcDNA-hGM vào tế bào CHO-K1 bằng hóa biến nạp với cationic lipid

Plasmid tái tổ hợp được hoà trong TE pH 7 ở nồng độ 1 μ g/ μ l. Nuôi 5 \times 10⁴ tế bào CHO-K1/giếng trên đĩa 24 giếng trong 500 μ l môi trường DMEM/F-12 (Himedia, Ấn Độ) 10%FBS (Sigma, Canada) Penicillin/Streptomycin, ở 37°C trong 12h. Quá trình biến

nạp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, hoà 2 μ l Cellfectin (Invitrogen, Hoa Kỳ) với 50 μ l môi trường Opti-MEM (Invitrogen, Hoa Kỳ) ở 5 phút ở nhiệt độ phòng. Hoà 1 μ g plasmid với 50 μ l môi trường Opti-MEM, huyền phù kĩ, trộn đều hai phần Opti-MEM chứa Cellfectin và plasmid, ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng. Hút bỏ môi trường đang nuôi tế bào, rửa tế bào hai lần bằng PBS, bổ sung 200 μ l Opti-MEM/giếng, nhỏ giọt phức hợp Cellfectin/plasmid lên giếng, ủ đĩa ở 37°C, 5% CO₂. Sau 6h, môi trường chứa phức hợp được thay bằng môi trường DMEM/F-12 10% FBS Pen/Strep+, tiếp tục nuôi tế bào ở 37°C, 5% CO₂. Sau 24h môi trường nuôi được thay bằng môi trường tương tự có 400 μ g/ml kháng sinh Geneticin (Invitrogen, Hoa Kỳ). Sau 10 ngày, giảm lượng Geneticin còn 100 μ g/ml.

Kiểm tra sự biểu hiện hGM-CSF ở tế bào CHO-K1 bằng phương pháp thử hoạt tính

Sự hiện diện của hGM-CSF trong dịch nuôi tế bào CHO-K1 được đánh giá thông qua mức độ tăng sinh tế bào TF-1 (tế bào đáp ứng chuyên biệt cho hGM-CSF) đo bằng CCK-8 (Sigma, Canada). Tế bào TF-1 được nuôi trong môi trường RPMI (Gibco, Hoa Kỳ) 10% FBS 2.10³ μ g/ml hGM-CSF. Tế bào được rửa với PBS, hòa lại trong RPMI, cho vào đĩa 96 giếng (10⁵ tế bào/ml, 100 μ l/giếng) và bổ sung dịch nuôi tế bào CHO-K1 mang thể biến nạp. Ủ đĩa TF-1 ở 37°C, 5% CO₂ trong 72h, bổ sung 10 μ l CCK-8, ủ trong 3h, đọc kết quả ở bước sóng 450nm.

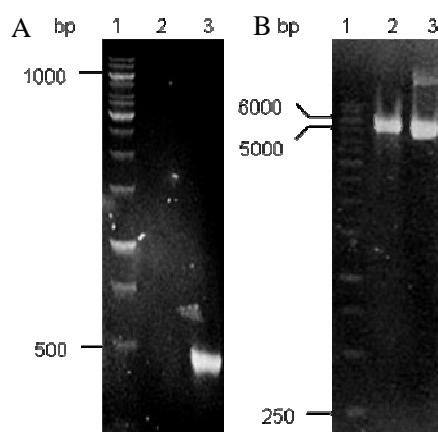
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chuẩn bị gene

Gene hgm-csf được thu nhận bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene. Kết quả điện di trên gel agarose 1% (hình 1A) cho thấy gồm một vạch ở giếng 3 có kích thước phù hợp với kích thước thiết kế của gene là 415bp. Giếng 2 (nước cất) không xuất hiện vạch chứng tỏ các thành phần phản ứng không có sẵn khuôn để khuếch đại đoạn gene. Sau khi thu nhận, gene hgm-csf được cắt tạo đầu dính với hai enzyme EcoRI và XhoI để chuẩn bị cho phản ứng nối.

Chuẩn bị plasmid pcDNA3.1+

Plasmid pcDNA3.1+ sau khi tách chiết cũng được cắt mở vòng bằng EcoRI và XhoI, điện di kiểm tra kết quả cắt trên gel agarose 1% cùng sản phẩm plasmid tách chiết (lần lượt là giếng 2 và 3, hình 1B).



Hình 1. Kết quả chuẩn bị gene và plasmid

A. Thu gene hgm-csf: 1. Thang DNA 1kb; 2. PCR H₂O; 3. PCR pCMV.sport6/hgm-csf; B. Thu pcDNA3.1+: 1. Thang DNA 1kb; 2. pcDNA3.1+ cắt bằng EcoRI, XhoI; 3. pcDNA3.1+ tách được.

Plasmid sau khi cắt ở dạng mạch thẳng có kích thước khoảng 5.428 bp cho một vạch nằm trong khoảng giữa hai vạch 5.000 bp và 6.000 bp của thang DNA. Kết quả này phù hợp với kích thước của plasmid pcDNA3.1+ khi bỏ đoạn giữa hai enzyme EcoRI và XhoI. Như vậy, chúng tôi đã thu nhận và xử lý tạo đầu dính thành công plasmid pcDNA3.1+.

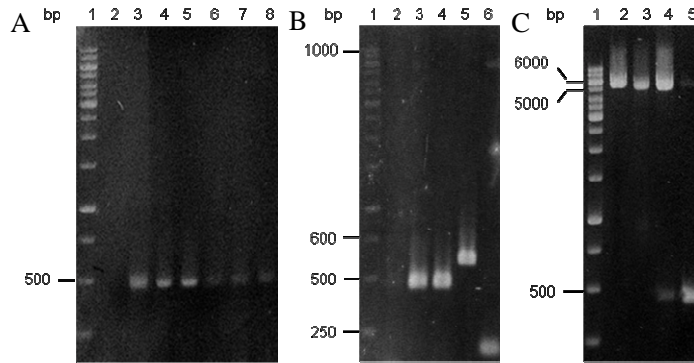
Tạo plasmid tái tổ hợp pcDNA-hGM và sàng lọc thể biến nạp

Sau khi nối gene vào plasmid và biến nạp vào *E. coli* DH5 α , sản phẩm biến nạp được nuôi chọn lọc trên môi trường LBA-Amp. Các khuẩn lạc phát triển được trên ampicillin được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với mồi nằm trên gene ở giếng 4, 5, 6, 7, 8 hình 2A đều cho kết quả dương tính với một vạch gene có kích thước bằng vạch của hgm-csf ở giếng 3, chứng tỏ có sự tồn tại của gene hgm-csf trong các khuẩn lạc. Tiến hành tăng sinh và tách plasmid từ các khuẩn lạc này tiếp tục kiểm tra ở các bước sau.

Sử dụng mồi trên gene để PCR các plasmid tái tổ hợp thu được. Kết quả điện di ở giếng 4

hình 2B cho thấy có vạch DNA với kích thước khoảng 415 bp, bằng với vạch gene hgm-csf chứng dương ở giếng 3. Khi dùng môi trên vector để PCR, các plasmid tái tổ hợp cho vạch

577 bp (giếng 5) thay vì 177 bp đối với plasmid chưa chèn gene (giếng 6). Đồng thời, plasmid tái tổ hợp cũng được kiểm tra bằng phương pháp cắt giới hạn (hình 2C).



Hình 2. Tạo, sàng lọc và kiểm tra dòng tái tổ hợp

A (PCR khuẩn lạc): 1. Thang DNA 1kb; 2. PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5a/pcDNA3.1+; 3. hgm-csf; 4,5,6,7,8: PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5a/pcDNA-hGM; B (Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng PCR): 1. Thang DNA 1 kb; 2. PCR pcDNA3.1+ với môi trên gene; 3. hgm-csf; 4. PCR pcDNA-hGM với môi trên gene; 5. PCR pcDNA-hGM với môi trên plasmid; 6. PCR pcDNA3.1+ với môi trên plasmid; C (Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng cắt giới hạn): 1. Thang DNA 1 kb; 2. Plasmid pcDNA-hGM cắt mở vòng bằng EcoRI; 3. Plasmid pcDNA3.1+ cắt mở vòng bằng EcoRI; 4. Plasmid pcDNA-hGM cắt mở bằng EcoRI và XhoI; 5. gene hgm-csf.

Plasmid tái tổ hợp khi được cắt mở vòng bằng một enzyme cho sản phẩm có kích thước lớn hơn plasmid pcDNA3.1+ mở vòng nhưng vẫn nằm giữa hai vạch thang 5.000 bp và 6.000 bp, như vậy, có kích thước phù hợp dự đoán. Khi cắt plasmid tái tổ hợp bằng hai enzyme EcoRI và XhoI đã dùng để xử lý và nối gene hgm-csf vào plasmid đã nhận được một vạch bằng với vạch hgm-csf, vạch còn lại có kích thước tương đương kích thước plasmid

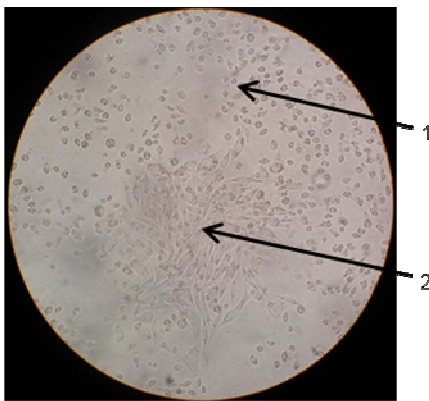
pcDNA3.1+ cắt mở vòng. Như vậy, gene hgm-csf đã được chèn vào vị trí cắt giới hạn của hai enzyme EcoRI và XhoI trong vùng MCS của plasmid pcDNA3.1+. Plasmid tái tổ hợp dương tính sau các bước kiểm tra được giải trình tự và sắp giống cột. Kết quả sắp giống cột cho thấy đã dòng hoá được gene hgm-csf vào plasmid pcDNA3.1+ (hình 3). Như vậy, đã tạo được plasmid tái tổ hợp pcDNA-hGM.

57 3.1R	721	731	741	751	761	771	781	791
M11220 hGM-C	CCAGTGTGGTGAATTCCGCCACCATGTGGCTGCAGAGCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCTGCAGCATCTCGACCC							
Consensus	-----ATGTGGCTGCAGAGCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCTGCAGCATCTCGACCC-----							
	atgtggctgcagagcctgctgctcttgggcaactgtggcctgcagcatctcgaccc							
57 3.1R	801	811	821	831	841	851	861	871
M11220 hGM-C	GCCCGCTCGCCAGCCCCAGCAGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGCGCTCTCTGAACCTGAG							
Consensus	-----GCCCGCTCGCCAGCCCCAGCAGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGCGCTCTCTGAACCTGAG-----							
	gcccgcctcgcccagccccagcagcagccctgggagcattgtgaatgccatccaggaggcccgctctcctgaacctgag							
57 3.1R	881	891	901	911	921	931	941	951
M11220 hGM-C	TAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTAC							
Consensus	-----TAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTAC-----							
	tagagacactgctgctgagatgaatgaaacagtagaagtcattctcagaatgcttgacctccaggagccgacctgcctac							
57 3.1R	961	971	981	991	1001	1011	1021	1031
M11220 hGM-C	AGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGC							
Consensus	-----AGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGC-----							
	agaccgcctggagctgtacaagcagggcctgccccagcctcaccaggctcaagggcccttgacctgatggccagc							
57 3.1R	1041	1051	1061	1071	1081	1091	1101	1111
M11220 hGM-C	CACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCGGAACTTCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAA							
Consensus	-----CACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCGGAACTTCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAA-----							
	cactacaagcagcactgccctccaacccggaaacttctgtgcaacccagattatcacctttgaaagtttcaaagagaa							
57 3.1R	1121	1131	1141	1151	1161	1171	1181	1191
M11220 hGM-C	CCTGAAGGACTTTCTGCTTGTTCATCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGTAACTCAGCTTAGAGGGCCCG							
Consensus	-----CCTGAAGGACTTTCTGCTTGTTCATCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGTAACTCAGCTTAGAGGGCCCG-----							
	cctgaaggactttctgcttgttcattccctttgactgctgggagccagttccaggagttaa-----							

Hình 3. Kết quả sắp giống cột vùng gene trong plasmid tái tổ hợp với trình tự hGM-CSF công bố

Biểu hiện hGM-CSF trong tế bào CHO-K1

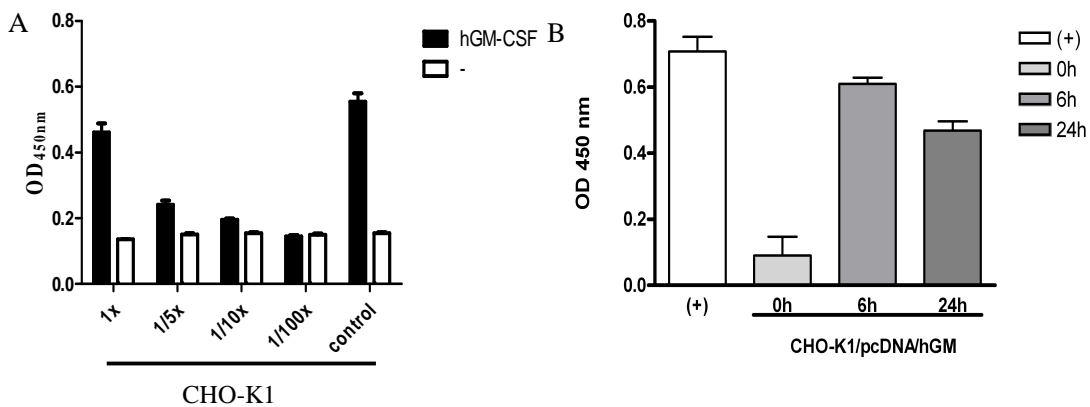
Tế bào CHO-K1 sau khi biến nạp plasmid pcDNA-hGM được nuôi trong môi trường DMEM FBS 10% có Geneticin. Những tế bào không biến nạp được plasmid tái tổ hợp sẽ không có gene kháng neomycin trên plasmid pcDNA3.1+, không sống được trong môi trường có geneticin. Các tế bào không mang plasmid tái tổ hợp có biểu hiện co tròn, bám dính yếu, ngừng tăng trưởng (hình 4, mũi tên 1). Ngược lại các tế bào có mang plasmid tái tổ hợp tăng trưởng được trong môi trường chọn lọc và phát triển thành từng cụm tế bào (hình 4, mũi tên 2).



Hình 4. Kết quả điện biến nạp sau 5 ngày nuôi chọn lọc bằng Geneticin 400 µg/ml
 1. các tế bào không mang plasmid tái tổ hợp;
 2. cụm tế bào có khả năng mang plasmid tái tổ hợp.

Sau thời gian nuôi chọn lọc, dịch nuôi tế

bào CHO-K1 tái tổ hợp được thu và thử nghiệm với tế bào TF-1. Dòng tế bào CHO-K1 chưa biến nạp cũng được nuôi song song và kiểm tra với vai trò chứng âm. Khi so sánh cùng một mức độ pha loãng dịch nuôi cấy thì chỉ có dịch nuôi cấy thu nhận từ dòng CHO-K1 mang vector pcDNA-hGM mới có khả năng kích thích sự tăng sinh tế bào TF-1, còn dịch từ CHO-K1 không có khả năng này (hình 5A). Ngoài ra, sự kích thích tăng sinh TF-1 tỷ lệ theo mức độ pha loãng dịch nuôi cấy. Bên cạnh đó, thời điểm thu dịch nuôi tế bào CHO-K1/pcDNA-hGM cũng ảnh hưởng đến lượng protein hGM-CSF tích lũy trong môi trường. Dịch tiết từ tế bào CHO-K1/pcDNA-hGM sau 6h (hình 5B) đã kích thích sự tăng sinh của tế bào TF-1 chứng tỏ đã có hGM-CSF được tiết ra. Theo lý thuyết, sự tích tụ hGM-CSF trong dịch nuôi CHO-K1 sẽ tăng theo thời gian và đáp ứng của TF-1 ở công thức 24h sẽ cao hơn 6h. Tuy nhiên, đáp ứng của TF-1 với môi trường nuôi sau 24h lại cho kết quả thấp hơn 6h. Hiện tượng này có thể giải thích là dịch tiết không chỉ chứa hGM-CSF mà còn có nhiều thành phần khác, bao gồm các sản phẩm biến dưỡng được tiết từ CHO-K1, tạo môi trường bất lợi cho sự sinh trưởng, nhân lên của TF-1. Mật độ tế bào TF-1 ở công thức 0h thấp, cho thấy không tồn tại hGM-CSF sẵn trong môi trường DMEM dùng để nuôi tế bào CHO-K1. Như vậy, chúng tôi khẳng định được đã biểu hiện thành công hGM-CSF.



Hình 5. Đánh giá khả năng hGM-CSF thông qua hoạt tính kích thích tăng sinh tế bào TF-1
 A. Theo mức độ pha loãng dịch nuôi cấy; B. Theo thời gian.

KẾT LUẬN

Đã cấu trúc thành công chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp pcDNA-hGM, đưa được vào dòng tế bào CHO-K1 và biểu hiện được protein hGM-CSF dạng tiết và có hoạt tính. Đây là nghiên cứu đầu tiên về biểu hiện hGM-CSF trên tế bào CHO-K1 ở Việt Nam và là cơ sở cho các nghiên cứu khảo sát, tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy tế bào CHO-K1 có mang gene hgm-csf để thu nhận hGM-CSF với hiệu suất cao.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện bằng kinh phí của đề tài khoa học công nghệ của Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đến GS. Toshio Kitamura, Viện Y khoa, Đại học Tokyo đã cung cấp dòng tế bào TF-1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aapro M. S., Cameron R., Pettengell R., Bohlius J., Crawford J., Ellis M., Kearney N., Lyman G. H., Tjan-Heijnen V. C., Walewski J., Weber D. C., Zielinski C., 2006. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur. J. Cancer*, 42(15): 2433-2453.
2. Aglietta M., Pasquino P., Sanavio F., Stacchini A., Severino A., Fubini L., Morelli S., Volta C., Monteverde A., Piacibello W., 1993. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: target cells and kinetics of response in vivo. *Stem Cells*, 11 Suppl 2: 83-87.
3. Barrientos S., Brem H., Stojadinovic O., Tomic-Canic M., 2014. Clinical Application of Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. *Wound Repair Regen*, 22(5): 569-578
4. Guthridge M. A., Stomski F. C., Thomas D., Woodcock J. M., Bagley C. J., Berndt M. C., Lopez A. F., 1998. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells*, 16(5): 301-313.
5. Jayapal K. P., Wlaschin K. F., Hu W., Yap M. G., 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.*, 103(10): 40.
6. Metcalf D., 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111(2): 485-491.
7. Parmiani G., Castelli C., Pilla L., Santinami M., Colombo M. P., Rivoltini L., 2007. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann. Oncol.*, 18(2): 226-232.
8. Rasko J. E., Gough N. M., 1994. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *The cytokine handbook*, 2: 342-369.
9. Thomson A. W., Lotze M. T., 2003. *The Cytokine Handbook, Two-Volume Set*. Gulf Professional Publishing.

CLONING AND EXPRESSION OF hGM-CSF IN CHO-K1 CELL LINE

Truong Hoang Phung, Ngo Thi Kim Hang, Tran Van Hieu

University of Science, Vietnam National University HCM

SUMMARY

GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) is a cytokine with wide effects, not only on hematopoietic precursor cells, dendritic cells, but also on smooth muscle cells, epithelial cells and even neurons. Although, it does not play role in hGM-CSF biological functions, glycosylation enhances the protein

in vivo stability. Therapeutic drugs containing recombinant hGM-CSF are mostly produced in *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae*, which do not have post-translation modification mechanisms similar to those of humans. In this present study, the gene encoding for human (h)GM-CSF was transfected into the Chinese Ovary Cell (CHO)-K1 and expression of the protein was evaluated. Firstly, gene was inserted into the open reading frame after early promoter CMV at EcoRI and XhoI restriction sites. Recombinant vectors are screened by colony PCR, restriction enzyme digestion and sequencing. The recombinant vector was termed pcDNA-hGM and was transfected into CHO-K1 cells using cationic lipid method. Transformants was selected and maintained using antibiotic Geneticin. The results showed that the gene encoding for hGM-CSF was indeed cloned into pcDNA3.1+ vector at EcoRI and XhoI restriction sites. The conditioned medium collected from CHO-K1/pcDNA-hGM stimulated the proliferation of TF-1, an hGM-CSF-dependent cell line. In summary, the recombinant vector pcDNA-hGM was cloned and the recombinant cell line CHO-K1/pcDNA-hGM expressed active hGM-CSF. This is the first research on expression hGM-CSF in CHO-K1 cell line and providing evidence for further investigation on isolation and purification of hGM-CSF afterward.

Keywords: hGM-CSF, cationic lipid transfection, CHO-K1, TF-1 cells.

Ngày nhận bài: 12-10-2014