

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐÀM THỊ TÚ ANH

**NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ  
ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ  
TUYỂN TIỀN LIỆT ỨNG DỤNG  
TRONG CHẨN ĐOÁN**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2016**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

BỘ Y TẾ

**ĐÀM THỊ TÚ ANH**

**NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ  
ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ  
TUYẾN TIỀN LIỆT ỨNG DỤNG  
TRONG CHẨN ĐOÁN**

Chuyên ngành : Dịch ứng và miễn dịch

Mã số : 62720109

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

*Người hướng dẫn khoa học:*

**1. PGS TS Phạm Thiện Ngọc**

**2. PGS TS Lê Quang Huân**

**HÀ NỘI – 2016**

## LỜI CẢM ƠN

*Trong thời gian thực hiện nghiên cứu này tôi nhận thấy mình là người thật may mắn được dìu dắt bởi các thầy cô – các học giả uyên bác trong các lĩnh vực nghiên cứu.*

*Em muốn bày tỏ sự kính trọng và lời cảm ơn sâu sắc tới Phó giáo sư tiến sĩ Phạm Thiện Ngọc và Phó giáo sư tiến sĩ Lê Quang Huấn - hai người thầy đã luôn sẵn sàng dành tất cả tâm huyết và nguồn lực cho học trò của mình là tôi vì sự thành công của nghiên cứu.*

*Dĩu theo đề tài của tôi từ những ngày đầu, chỉ bảo và cho tôi rất nhiều ý kiến quý báu được đúc kết qua bao năm nghiên cứu của cô, thành công này của tôi có phần giúp đỡ của Giáo sư tiến sĩ khoa học Phan Thị Phi Phi. Em xin gửi đến cô lời cảm ơn trân trọng và sâu sắc.*

*Em cũng xin cảm ơn Phó giáo sư tiến sĩ Phạm Đăng Khoa – Chủ nhiệm bộ môn Sinh lí bệnh Miễn dịch, cùng toàn thể các anh chị em trong bộ môn. Nơi đây là gia đình thứ hai em gắn bó và từng bước trưởng thành.*

*Nghiên cứu này có lẽ sẽ không hoàn tất nếu thiếu sự hỗ trợ của các cơ sở nghiên cứu, các viện và rất nhiều các cá nhân liên quan. Tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn đến các đồng nghiệp nghiên cứu viên phòng Công nghệ tế bào động vật – Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam, TS Nguyễn Thế Trường – Phó trưởng khoa ngoại Bệnh viện Hữu nghị Hà Nội, TS Nguyễn Thị Phương Ngọc – Trưởng khoa Hóa sinh Bệnh viện Hữu nghị Hà Nội, ThS Phương Việt Trung – Trưởng phòng chỉ đạo tuyển Bệnh viện Hữu nghị Hà Nội, CN Nguyễn Thu Hà – Khoa ngoại Bệnh viện Hữu nghị Hà Nội. CN Phan Mai Hoa – Bộ môn Sinh lí bệnh- Miễn dịch trường Đại học Y Hà nội.*

*Hà Nội, ngày 20 tháng 05 năm 2016*

*Đàm Thị Tú Anh*

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là: Đàm Thị Tú Anh, nghiên cứu sinh khóa 30 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Miễn dịch và Dịch ứng xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy: PGS.TS Phạm Thiện Ngọc và PGS.TS Lê Quang Huân.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp nhận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà nội, ngày 20 tháng 05 năm 2016*

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<b>CGA</b>	Chromogranin A (Protein chế tiết 1 của tuyến cận giáp)
<b>CT</b>	Computed Tomography (Chụp cắt lớp)
<b>DRE</b>	Digital Rectal Examination (Thăm khám trực tràng)
<b>DBB</b>	Denaturing Binding Buffer
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DWB</b>	Denaturing Wash Buffer
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>EPCA</b>	Early prostate cancer antigen (Kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm)
<b>HE</b>	Hematoxylin Eosin (Thuốc nhuộm mô bệnh phẩm)
<b>HIFU</b>	High-Intensity Focused Ultrasound (Siêu âm tập trung cường độ cao)
<b>hK2</b>	Hexokinase 2 (Hexokinases phosphorylate glucose)
<b>huK2</b>	Human glandular kallikrein (Một protease serine)
<b>IL</b>	Interleukine
<b>KN</b>	Kháng nguyên
<b>KT</b>	Kháng thể
<b>NDV</b>	Newcastle disease virus (Vi rút bệnh Newcastle)

<b>NEB</b>	Native Elution Buffer
<b>NPB</b>	Native Purification Buffer
<b>NWB</b>	Native Wash Buffer
<b>MCS</b>	Multiple Cloning Site (Vùng cắt gấn đa vị )
<b>MRI</b>	Magnetic resonance imaging (Chụp cộng hưởng từ)
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin (Yếu tố ức chế osteoclastogenesis)
<b>PSA</b>	Prostate specific antigen (Kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt)
<b>PET/CT</b>	Positron Emission Tomography - Computed Tomography (Chụp cắt lớp phát xạ positron)
<b>PSCA</b>	Prostate Stem Cell Antigen (Kháng nguyên tế bào gốc tiền thân của tuyến tiền liệt)
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (Dung dịch đệm phosphate)
<b>PIN</b>	Prostatic Intraepithelial Neoplasia (Tân sản nội biểu mô tuyến tiền liệt)
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Phản ứng khuếch đại chuỗi)
<b>rNDV</b>	Recombinant Newcastle disease virus (Vi rút bệnh Newcastle tái tổ hợp)
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>TTL</b>	Tuyến tiền liệt
<b>TCA</b>	Trichloroacetic acid

<b>UT</b>	Ung thư
<b>UTTTL</b>	Ung thư tuyến tiền liệt
<b>UPĐLTTTL</b>	U phì đại lành tính tuyến tiền liệt
<b>ULT</b>	Ultrasonic Tomography (Siêu âm cắt lớp)
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor (Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu)

# MỤC LỤC

*Lời cảm ơn*

*Lời cam đoan*

*Mục lục*

*Chữ viết tắt*

*Danh mục các bảng*

*Danh mục các hình*

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1:TỔNG QUAN.....</b>	<b>3</b>
1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT .....	3
1.1.1. Tình hình ung thư tuyến tiền liệt trên thế giới.....	3
1.1.2. Tình hình ung thư tuyến tiền liệt tại Việt Nam.....	4
1.1.3. Yêu cầu trong chẩn đoán và điều trị UTTTL .....	5
1.2. CÁC HIỂU BIẾT VỀ CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT	6
1.2.1. Các phương pháp truyền thống chẩn đoán UTTTL.....	6
1.2.2. Các hiểu biết mới trong chẩn đoán và điều trị UTTTL .....	10
1.3. KHÁNG THỂ VÀ CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT ..	29
1.3.1. Kháng thể.....	29
1.3.2. Kháng thể đơn dòng.....	35
1.4.CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU .....	40
1.4.1. Kỹ thuật tái tổ hợp DNA.....	40
1.4.2. Kỹ thuật tạo kháng thể bằng gây miễn dịch trên động vật .....	46
1.4.3. Kỹ thuật phân lập albumine từ huyết thanh .....	48
1.4.4 Kỹ thuật ELISA .....	49
<b>CHƯƠNG 2:ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>55</b>
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	55



2.1.1. Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên UTTTL. ....	55
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu tạo bộ sinh phẩm bằng kháng thể và bước đầu ứng dụng trong chẩn đoán UTTTL. ....	55
2.2. HÓA CHẤT, SINH PHẨM NGHIÊN CỨU .....	56
2.2.1. Sinh phẩm .....	56
2.2.2. Hóa chất .....	56
2.3. TRANG THIẾT BỊ SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU.....	57
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	57
2.5. PHÂN TÍCH VÀ XỬ LÝ KẾT QUẢ TRONG NGHIÊN CỨU .....	57
2.6. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU.....	58
2.8. CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU .....	58
2.8.1. Tạo kháng nguyên tái tổ hợp mang các epitope EPCA-2.....	59
2.8.2. Các kỹ thuật sử dụng gây miễn dịch cho thỏ tạo kháng thể đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 .....	75
2.8.3. Kỹ thuật ELISA xác định EPCA-2.....	82
2.9. ĐỊA ĐIỂM TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU.....	84
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>85</b>
3.1. TẠO GEN TÁI TỔ HỢP MANG CÁC EPITOPE EPCA-2 BẰNG PHƯƠNG PHÁP TÁI TỔ HỢP. ....	85
3.1.1. Tạo vector tái tổ hợp mang gen polEPCA-2.....	85
3.1.2. Biểu hiện vector tái tổ hợp trong vi khuẩn E.coli chủng BL21 (DE3) 93	
3.2. KẾT QUẢ GÂY MIỄN DỊCH Ở THỎ BẰNG KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP PolEPCA-2.....	104
3.2.1. Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ. ....	104
3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH EPCA-2 TRONG HUYẾT THANH 3 NHÓM NGHIÊN CỨU .....	107

3.3.1. Thông tin chung của nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt.....	108
3.3.2. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt được định lượng bằng kháng thể thử kháng EPCA-2 và kit CUSABIO .....	111
3.3.3. Nồng độ EPCA- 2 trong huyết thanh nam giới khỏe mạnh.....	114
3.3.4. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của kháng thể thử đặc hiệu kháng EPCA- 2 với kháng thể trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO .....	114
<b>CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN .....</b>	<b>116</b>
4.1. VỀ THIẾT KẾ GEN MÃ HÓA POLYEPITOPE CỦA KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT SỚM.....	116
4.1.1. Lựa chọn biểu hiện các epitope của kháng nguyên thay vì biểu hiện toàn bộ phân tử kháng nguyên.....	116
4.1.2. Thiết kế lặp nhiều lần trình tự các epitope.....	118
4.1.3. Thiết kế gen polEPCA-2 có trình tự nhận biết của các enzyme cắt giới hạn .....	119
4.1.4. Tạo vector tái tổ hợp mang gen polEPCA-2.....	120
4.1.5. Biểu hiện protein tái tổ hợp .....	121
4.2. VỀ KẾT QUẢ TẠO KHÁNG THỂ THỎ ĐẶC HIỆU KHÁNG PolEPCA-2.....	124
4.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH EPCA-2 TRONG HUYẾT THANH 3 NHÓM NGHIÊN CỨU .....	128
4.3.1. Một số thông tin của 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt. ....	128
4.3.2. Kết quả xác định EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt bằng kháng thể thử có đối chứng với kit thương phẩm.....	130

4.3.3. Kết quả xác định EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân u phì đại lành tính tuyến tiền liệt và nam giới bình thường bằng 2 phương pháp ELISA.....	132
4.3.4. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của 2 phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 và kháng thể trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO.....	134
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>135</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ</b>	
<b>CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1:	Trình tự acid amin ba epitop của EPCA-2 .....	16
Bảng 1.2:	Cấu trúc các globulin.....	30
Bảng 2.1.	Thành phần hỗn hợp phản ứng cắt bằng enzyme .....	60
Bảng 2.2.	Hỗn hợp phản ứng gắn bằng enzyme .....	63
Bảng 2.3.	Thành phần phản ứng PCR.....	67
Bảng 2.4.	Chu trình nhiệt của phản ứng PCR.....	67
Bảng 2.5.	Công thức pha gel tách .....	70
Bảng 2.6.	Công thức pha gel cô.....	71
Bảng 2.7.	Công thức chia nhóm và dung dịch tiêm miễn cảm .....	79
Bảng 3.1.	Nồng độ IPTG và thời gian khảo sát sự biểu hiện protein tái tổ hợp .....	96
Bảng 3.2:	Các nồng độ EPCA-2 của đường chuẩn Kít ELISA (CSB-EQ 027679HU .....	102
Bảng 3.3.	Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ sau tiêm mũi 3.....	105
Bảng 3.4.	Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ sau tiêm mũi 3 và 4.....	105
Bảng 3.5.	So sánh nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ ngày thứ 15 và ngày thứ 20 sau tiêm mũi 4.....	107
Bảng 3.6.	Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ 20 ngày sau tiêm mũi 4 ở các độ pha loãng khác nhau.....	107
Bảng 3.7.	Phân bố tuổi ở nhóm bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt.....	108
Bảng 3.8.	Phân bố tuổi ở nhóm bệnh nhân u phì đại tuyến tiền liệt.....	109
Bảng 3.9.	Nồng độ tPSA trung bình trong huyết thanh các nhóm nghiên cứu.....	110

Bảng 3.10.	Sự phân bố các mức nồng độ tPSA ở 3 nhóm nghiên cứu.....	110
Bảng 3.11.	Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt ở các mức nồng độ .....	111
Bảng 3.12.	Giá trị trung bình nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt.....	111
Bảng 3.13.	Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân u phì đại lành tính tuyến tiền liệt.....	112
Bảng 3.1.4.	So sánh giá trị trung bình của nồng độ EPCA-2 và tPSA trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt. ....	113
Bảng 3.1.5.	Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh người nam bình thường định lượng bằng KT thử đặc hiệu kháng EPCA-2 và Kit ELISA. ....	114
Bảng 3.16.	So sánh độ nhạy của kháng thể thử đặc hiệu kháng EPCA-2 với Kit ELISA ở nhóm bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt. ....	114
Bảng 3.17.	So sánh độ đặc hiệu của kháng thể thử đặc hiệu kháng polEPCA-2 với kit ELISA ở nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL.....	114

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1:	Phân độ mô học theo Gleason.....	9
Hình 1.2:	Mô tả nguyên lý hoạt động của siêu âm cắt lớp.....	12
Hình 1.3:	Hình ảnh ung thư tuyến tiền liệt chụp PET/CT .....	14
Hình 1.4:	Sơ đồ cấu trúc một hệ dẫn thuốc trong điều trị trúng đích.....	25
Hình 1.5:	Các phần V và C của một đơn vị Ig .....	31
Hình 1.6:	Cấu trúc của TCR.....	32
Hình 1.7:	Cầu S-S, các domain và các mảnh phân tử Ig.....	32
Hình 1.8:	Cắt phân tử IgG với papain thu được: 2 mảnh Fab, 1 mảnh Fc...	33
Hình 1.9:	Cắt phân tử IgG với pepsin thu được: 1 mảnh F(ab) <sub>2</sub> , 1 mảnh Fc' .....	34
Hình 1.10:	Sơ đồ tạo kháng thể bằng phương pháp tạo tế bào lai .....	37
Hình 1.11:	Hai loại kháng thể đơn dòng. ....	38
Hình 1.12:	Sơ đồ tạo kháng thể đơn dòng ghép.....	38
Hình 1.13:	Sơ đồ phương pháp sắc kí ái lực .....	45
Hình 1.14:	Sơ đồ phương pháp ELISA trực tiếp.....	51
Hình 1.15:	Sơ đồ phương pháp ELISA gián tiếp .....	51
Hình 1.16:	Sơ đồ phương pháp ELISA sandwich.....	52
Hình 1.17:	Sơ đồ phương pháp ELISA cạnh tranh ức chế.....	54
Hình 3.1:	Trình tự gen polEPCA-2 .....	86
Hình 3.2:	Sơ đồ tạo vector biểu hiện tái tổ hợp .....	86
Hình 3.3:	Kết quả cắt gen polEPCA-2 và pET-28a(+) bằng 2 enzym Nco I và Not I	87
Hình 3.4:	Kiểm tra sản phẩm tinh sạch gen polEPCA-2 và pET-28a(+) với 2 đầu dính tương ứng. ....	88
Hình 3.5:	Đĩa biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp pET28a(+)/polEPCA-2 vào vi khuẩn E. coli chủng DH5α.....	89
Hình 3.6:	Kết quả PCR với cặp mồi T7F/R .....	90

Hình 3.7.	Một đoạn kết quả giải trình tự gen polEPCA-2 .....	91
Hình 3.8.	Trình tự gen polEPCA-2 trong vector pET-28a(+) và trình tự acid amin suy diễn .....	92
Hình 3.9.	Đĩa biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/polEPCA-2 vào tế bào E. coli chủng BL21 (DE3) .....	93
Hình 3.10.	Kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp trong E.coli BL21 .....	94
Hình 3.11.	Kiểm tra sự biểu hiện protein tái tổ hợp ở các nồng độ IPTG theo thời gian.....	97
Hình 3.12.	Kiểm tra sự biểu hiện protein tái tổ hợp ở các nhiệt độ khác nhau .....	98
Hình 3.13.	Kiểm tra độ hòa tan của protein tái tổ hợp.....	99
Hình 3.14.	Kiểm tra độ hòa tan của protein tái tổ hợp ở các nhiệt độ khác nhau	100
Hình 3.15.	Kiểm tra sản phẩm tinh sạch protein polEPCA-2 .....	101
Hình 3.16:	Biểu đồ đường chuẩn kit .....	103
Hình 3.17.	ELISA xác định nồng độ protein polEPCA-2 trong mẫu phân tích	104
Hình 3.18:	Sự phân bố tuổi ở 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt. ....	108
Hình 3.19:	Nồng độ tPSA ở 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt .....	109
Hình 4.1.	Cấu trúc acid amin prolin.....	119

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) được mô tả lần đầu tiên năm 1853. Năm 1890 nhờ thủ thuật gây mê ra đời, bệnh lần đầu tiên được điều trị bằng cắt tinh hoàn, nhưng hiệu quả không cao. Rất nhiều các thành tựu khoa học đã được áp dụng vào điều trị UTTTL. Các kết quả nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả điều trị UTTTL rất phụ thuộc vào thời điểm phát hiện bệnh. Với những trường hợp ung thư (UT) còn ở giai đoạn khu trú trong tuyến tiền liệt (TTL), khoảng 70- 85% bệnh nhân sống đến 10 năm sau khi điều trị triệt để. Với các trường hợp u xâm lấn ngoài vỏ bao vi thể TTL, tỷ lệ sống sau 5 năm là 85% và sau 10 năm là 75%. Còn với những trường hợp khối u đã xâm lấn bao tuyến lan rộng, tỷ lệ sống sau 5 năm giảm xuống 70% và 10 năm là 40% [1],[2],[3]. Vì vậy yêu cầu chẩn đoán sớm ung thư nói chung hay UTTTL nói riêng là rất quan trọng.

Trước đây việc chẩn đoán UTTTL chủ yếu dựa vào các biểu hiện về lâm sàng như các rối loạn hay tắc nghẽn đường niệu; Siêu âm và nội soi đánh giá tình trạng, kích thước của tuyến tiền liệt; Phương pháp mô bệnh học tại các mẫu mô sinh thiết TTL. Tất cả các phương pháp chẩn đoán này chỉ xác định được bệnh khi khối u đã hình thành . Vì vậy, phát hiện bệnh thường là ở giai đoạn muộn.

Hiện nay, công nghệ được áp dụng ngày càng nhiều trong các nghiên cứu xác định cơ chế các bệnh lý khối u. Các nghiên cứu đã chứng minh tế bào ác tính của TTL cũng như các tế bào ung thư nói chung được hình thành do sự tích lũy và phát triển thông qua một loạt các thay đổi về các yếu tố di truyền, các biến đổi nội bào, ngoại bào và yếu tố di truyền ngoài gen dẫn đến sự gia tăng bất thường của tế bào ác tính, sự tăng sinh mạch, lẩn tránh apoptosis, và di căn đến các cơ quan. Đồng thời các nghiên cứu cũng phát hiện một số các



phân tử mới: chỉ xuất hiện trong các tế bào ung thư; một số các phân tử chỉ được sản xuất bởi các tế bào ung thư; và một số phân tử được cơ thể sản xuất ra như một phản ứng với khối ung thư. Tất cả các phân tử này được gọi là dấu ấn phân tử. Các dấu ấn phân tử có đặc điểm là cung cấp các thông tin về đặc tính sinh học của khối u và có thể được định tính bằng phương pháp mô bệnh học, hoặc có thể định lượng được bằng một số phương pháp sinh học phân tử trong huyết thanh hoặc các dịch sinh học. Việc xác định các dấu ấn này cho phép chẩn đoán sớm, đặc hiệu bệnh UTTTL.

Kháng nguyên (KN) sớm ung thư tuyến tiền liệt (EPCA-2) là một dấu ấn phân tử đã được công nhận là đặc hiệu cho UTTTL. Dấu ấn này có 3 vị trí kháng nguyên đã được biết rõ trình tự và có thể được phát hiện ở cả mô và các dịch sinh học của bệnh nhân UTTTL bằng kháng thể (KT) đặc hiệu. EPCA-2 còn được chứng minh là xuất hiện sớm 2 năm trước khi có các biểu hiện ở mô bệnh học, đồng thời sử dụng KT xác định EPCA-2 trong máu cho phép chẩn đoán UTTTL với độ nhạy là 92% độ đặc hiệu là 94% [4],[5],[6].

Sử dụng kháng thể đặc hiệu để phát hiện các dấu ấn ung thư tại mô và các dịch sinh học có giá trị sớm trong các phương pháp chẩn đoán. Đồng thời, nhiều nghiên cứu còn sử dụng kháng thể như một chất dẫn đường cho các thuốc chống ung thư đến đúng các tế bào ung thư cần tiêu diệt, hạn chế tác dụng không mong muốn trên tế bào lành. Ứng dụng kháng thể trong chẩn đoán và điều trị là những lĩnh vực đang ngày càng được phát triển hoàn thiện để có thể ứng dụng rộng rãi.

Đề tài nghiên cứu này được thực hiện với 2 mục tiêu:

- 1. Tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên tái tổ hợp EPCA-2.**
- 2. Đánh giá khả năng ứng dụng kháng thể đặc hiệu kháng EPCA-2 trong chẩn đoán ung thư tuyến tiền liệt.**

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN

### 1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT

Ung thư tuyến tiền liệt là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ hai trong các bệnh ung thư ở nam giới [7],[8]. Thực tế đã cho thấy UTTTL có thể điều trị khỏi hoàn toàn nếu được phát hiện sớm. Tuy nhiên, giống như mọi ung thư, các triệu chứng lâm sàng của bệnh thường chỉ xuất hiện khi ung thư đã ở giai đoạn muộn, đây chính là nguyên nhân gây thất bại trong điều trị và dẫn tới tử vong của UTTTL [1],[2],[3].

#### 1.1.1. Tình hình ung thư tuyến tiền liệt trên thế giới

Theo công bố của Tổ chức Y tế thế giới, tính đến hết năm 2012 trên toàn thế giới có khoảng 1.111.689 người mắc UTTTL, 307.481 người đã tử vong vì bệnh [7],[8]. Bệnh có tỷ lệ mắc cao nhất ở các nước có nền kinh tế phát triển. Theo ước tính hiện nay có khoảng 913.000 đàn ông đã được chẩn đoán UTTTL ở Úc, Niu di lân, Tây Âu, Bắc Âu, và Bắc Mỹ. Bệnh có sự phân bố rộng ở những nước này là do ở đây việc sử dụng thử nghiệm PSA và sinh thiết trong chẩn đoán UTTTL rất phổ biến. Chỉ tính riêng Châu Âu đã có 338.000 đàn ông được chẩn đoán UTTTL năm 2008. Trong đó tỷ lệ mắc thấp nhất ở các vùng Đông và Nam Âu, và cao nhất ở Bắc và Tây Âu [9]. Theo thống kê của Hiệp hội ung thư Mỹ, năm 2015 ở Mỹ đã có khoảng 220.800 người mắc UTTTL mới và 158.040 người đã chết vì UTTTL [10]. Tỷ lệ mắc UTTTL có sự khác nhau đáng kể giữa các chủng tộc. Tỷ lệ mắc cao nhất ở người Mỹ da đen và thấp nhất ở người Mỹ gốc Á. Trong 5 năm (2001-2005) tỷ lệ mắc UTTTL ở những người da đen cao nhất 249 người trên 100.000, ở tộc người da trắng là 157 người trên 100.000 và thấp nhất ở những người Mỹ gốc Á là 94 người trên 100.000 [11].

Tỷ lệ mắc UTTTL nhìn chung tăng nhanh theo tuổi hơn so với bất kỳ loại ung thư nào khác. Xu hướng mắc bệnh ngày càng tăng (từ năm từ 2001 đến 2008 tỷ lệ mắc tăng từ 32,624 người lên 37,051). Tỷ lệ bệnh có mối liên quan rõ ràng với tuổi. Trong tổng số các trường hợp có bệnh ở đàn ông Anh trên 65 tuổi có tới 3/4 là UTTTL, còn ở lứa tuổi từ 70-74 thì UTTTL chiếm đa số [12],[13],[14]. Đàn ông Mỹ với tuổi dưới 65 có 57 ca trên 100.000, còn với tuổi trên 65 số mắc UTTTL tăng đến 975 ca tính trên 100.000. Tỷ lệ chết do UTTTL ở đàn ông Mỹ trên 65 tuổi hàng năm là 245 người trên 100.000 [15].

### **1.1.2. Tình hình ung thư tuyến tiền liệt tại Việt Nam**

Việt Nam tuy nằm trong số các nước có tỷ lệ UTTTL không cao. Nhưng theo ước tính của Tổ chức y tế thế giới số lượng mắc UTTTL ở Việt Nam hết năm 2012 là khoảng 1275 người. Trong đó số tử vong khoảng 872 người [7],[8]. Một nghiên cứu trong nước của Nguyễn Văn Hưng trên 633 bệnh nhân đã được phẫu thuật TTL. Kết quả mô bệnh học cho thấy tỷ lệ UTTTL được phát hiện là 7,9 % [16]. Trong đó chủ yếu gặp là dạng ung thư biểu mô tuyến biệt hóa cao (95,2%) [17]. Ở một nghiên cứu khác công bố năm 2010, Vũ Lê Chuyên sàng lọc UTTTL cho 408 người tại bệnh viện Bình Dân- Thành phố Hồ Chí Minh có 87 người (21,3%) đã được tiến hành sinh thiết dựa trên mức PSA huyết thanh và kết quả siêu âm trực tràng. Có 10 người trong số đó (2,5%) được chẩn đoán là UTTTL, và những người này chủ yếu có điểm Gleason từ 5 tới 7 và bệnh ở giai đoạn sớm [18].

Ngoài ra, theo số liệu thống kê về số lượng bệnh nhân đã được chẩn đoán UTTTL năm 2010 của phòng hành chính tổng hợp các bệnh viện: Bệnh viện Việt Đức đã mổ là 56 ca, Viện K trung ương là 38 ca, Khoa u bướu bệnh viện Bạch Mai là 20 ca, và Bệnh viện u bướu Hà Nội năm 2010 có 16 ca đã được chẩn đoán và điều trị UTTTL. Qua các con số thống kê có thể thấy tuy tỷ lệ mắc UTTTL ở

Việt nam không cao, nhưng là bệnh đặc thù chỉ của nam giới, nên bệnh vẫn đứng hàng thứ ba trong các nguyên nhân gây chết do ung thư ở nam.

### **1.1.3. Yêu cầu trong chẩn đoán và điều trị UTTTL**

Với sự hiểu biết ngày càng sâu về cơ chế phân tử, quá trình bệnh sinh, cơ chế di căn của UTTTL đã mang lại những tiến bộ trong việc chẩn đoán cũng như hoàn thiện thành công các phương thức điều trị UTTTL. Trước đây việc chẩn đoán UTTTL chủ yếu dựa vào các biểu hiện về: Lâm sàng như các rối loạn hay tắc nghẽn đường niệu; Siêu âm và nội soi đánh giá tình trạng, kích thước của tuyến tiền liệt; Phương pháp mô bệnh học tại các mẫu mô sinh thiết TTL. Nhìn chung các kỹ thuật sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán cổ điển không tìm đến trực tiếp các tế bào bị ung thư vì vậy không chẩn đoán đặc hiệu ở giai đoạn sớm. Ngày nay, với việc tăng cường áp dụng công nghệ trong xác định cơ chế các bệnh lý khối u, các nghiên cứu đã chứng minh tế bào ác tính của TTL cũng như các tế bào ung thư nói chung được hình thành do sự tích lũy và phát triển thông qua một loạt các thay đổi về các yếu tố di truyền, các biến đổi nội bào, ngoại bào và yếu tố di truyền ngoài gen dẫn đến sự gia tăng bất thường của tế bào ác tính, sự tăng sinh mạch, lẩn tránh apoptosis, và di căn đến các cơ quan. Đồng thời các nghiên cứu cũng phát hiện một số các phân tử mới chỉ hiện diện trong các tế bào ung thư; Một số các phân tử mới được sản xuất bởi các tế bào ung thư; Và một số phân tử được cơ thể sản xuất ra như một phản ứng với khối ung thư. Tất cả các phân tử này được gọi là dấu ấn sinh học hoặc dấu ấn khối u. Việc xác định các dấu ấn này cho phép chẩn đoán sớm, đặc hiệu bệnh UTTTL.

Các dấu ấn phân tử có đặc điểm là cung cấp các thông tin về đặc tính sinh học của khối u và có thể được định tính bằng phương pháp mô bệnh học tại khối u, hoặc có thể định lượng được bằng một số phương pháp khác trong huyết thanh hoặc các dịch sinh học [19].

Vì vậy, các yêu cầu hiện nay đối với UTTTL là bệnh phải được chẩn đoán sớm và chính xác. Các biện pháp điều trị phải đạt 2 mục tiêu: (1) *Loại bỏ sớm và triệt để các tế bào ung thư* (2) *Không gây ảnh hưởng các tế bào lành tính.*

## **1.2. CÁC HIỂU BIẾT VỀ CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT**

### **1.2.1. Các phương pháp truyền thống chẩn đoán UTTTL**

#### **1.2.1.1. Chẩn đoán lâm sàng UTTTL**

UTTTL chia làm 2 thể lâm sàng: Thể tiềm tàng chưa biểu hiện triệu chứng và thể có triệu chứng lâm sàng.

➤ Thể tiềm tàng: Thường diễn biến thầm lặng kéo dài 5 đến 10 năm, biểu hiện nghèo nàn. Bệnh thường được chẩn đoán tình cờ qua thăm trực tràng thấy khối bất thường ở TTL, PSA tăng > 10 ng/mL hoặc chẩn đoán qua kết quả mô bệnh học sau mổ nội soi cắt u, mổ bóc u.

➤ Thể có triệu chứng lâm sàng:

- Cơ năng: triệu chứng sớm là các rối loạn tiểu tiện với các mức độ khác nhau khiến bệnh nhân khó chịu và phải đi khám. Biểu hiện muộn khi đã xuất hiện các triệu chứng của ung thư di căn như: Tiểu máu, xuất tinh ra máu, đau nhức xương, phù chân, liệt 2 chân, đại tiểu tiện không tự chủ, ho, khó thở, đau ngực ...

- Toàn thân: Mệt mỏi, gầy sút cân, kém ăn, thiếu máu, hạch ngoại vi...

- Thực thể: Khám thấy các triệu chứng của tắc nghẽn đường tiểu.

Thăm trực tràng: Diễn hình là thấy TTL có một tổn thương cứng, không đồng đều, không đau, tổn thương tại tuyến hay đã vượt khỏi tuyến, mất tính đối xứng của tuyến, kém di động so với tổ chức xung quanh.

### 1.2.1.2. Các thăm dò cận lâm sàng

#### ❖ *Chẩn đoán hình ảnh*

- *Siêu âm ổ bụng*: Cho phép đánh giá TTL về kích thước, khối lượng, độ cản âm, các nhân bất thường; bàng quang; thận- niệu quản...

- *Siêu âm qua trực tràng (SAQTT)*: Phát hiện các tổn thương khu trú giảm âm không đồng nhất so với nhu mô lành xung quanh, chỉ khoảng 1% UTTL là tăng âm. Mất ranh giới giữa trong và ngoài tuyến, dấu hiệu xâm lấn tạng lân cận [16]. Theo nghiên cứu của Lê Ngọc Bằng năm 2005 (n= 53) với phương pháp siêu âm qua trực tràng (SAQTT), UTTL được chẩn đoán với độ nhạy là 56,5% và độ đặc hiệu là 76,7%. Nhìn chung các phương pháp siêu âm đều rất phụ thuộc vào chủ quan của người làm kỹ thuật nên phương pháp này được khuyến cáo sử dụng trong kiểm tra hình thái của hệ niệu [20].

- *Sinh thiết và làm xét nghiệm mô bệnh học TTL* là xét nghiệm có giá trị nhất để chẩn đoán UTTL với giá trị chẩn đoán đúng tới 96,2% và còn giúp phân loại mô bệnh học [20]. Tuy nhiên, việc chẩn đoán phân biệt về hình thái giữa tổn thương lành tính và ác tính khá phức tạp rất dễ gây nhầm lẫn do những tổn thương lành tính giống ung thư, có cùng độ tuổi với ung thư và không hề có dấu hiệu lâm sàng đặc trưng để nhận biết [21]. Phương pháp sinh thiết và làm xét nghiệm mô bệnh học thường chỉ được thực hiện ở bệnh nhân đã mổ điều trị.

#### - *Giải phẫu bệnh học UTTL*

Một số tổn thương tiền ung thư:

+ Tân sản nội biểu mô tuyến tiền liệt (PIN).

Tổn thương gồm 2 loại: PIN độ cao (High-grade PIN) và PIN độ thấp (Low-grade PIN). Các tổn thương của PIN độ cao có thể phá hủy lớp màng đáy nhưng chưa xâm nhập lớp mô đệm, PIN độ thấp không được đưa vào chẩn đoán do không thể phân biệt được với mô TTL lành tính [22]. Một số tác

giả cho rằng PIN là giai đoạn đầu trong quá trình phát triển UTTTL nhưng tần số của sự chuyển biến này cũng như khoảng cách giữa hai quá trình là chưa được biết. PIN tạo nên một ung thư biểu mô tại chỗ nhưng chúng ta không biết được liệu nó có trở nên xâm nhập hay di căn không và khi nào [23]. Vì vậy PIN cần được theo dõi để phát hiện sớm ung thư xâm nhập bằng siêu âm, xét nghiệm PSA định kỳ và sinh thiết lặp lại.

+ Ung thư biểu mô tuyến

UTTTTL hầu hết là ung thư biểu mô tuyến Adenocarcinoma chiếm > 95%.

+ Những loại khác rất hiếm: Ung thư biểu mô chuyển tiếp, ung thư biểu mô thần kinh nội tiết, ung thư tổ chức đệm gồm: Rabdomyosarcom và Leiomyosarcom.

Theo Nguyễn Văn Hưng, bảng phân loại mô bệnh học của Young và cộng sự năm 2000 đã bổ sung những thiếu sót của bảng phân loại TNM và Cabanne [21].

*Phân độ mô học theo Gleason:* Được sử dụng phổ biến nhất dựa trên cấu trúc tế bào với mức độ ác tính (grading) Gleason chia ra 5 độ biệt hóa, từ một cấu trúc rất biệt hóa (độ 1) đến một cấu trúc không biệt hóa (độ 5).

- Độ 1: Ung thư biểu mô rất biệt hóa, khối u được cấu tạo từ những tuyến tròn hay bầu dục, nhóm lại thành từng khối, giới hạn rõ.

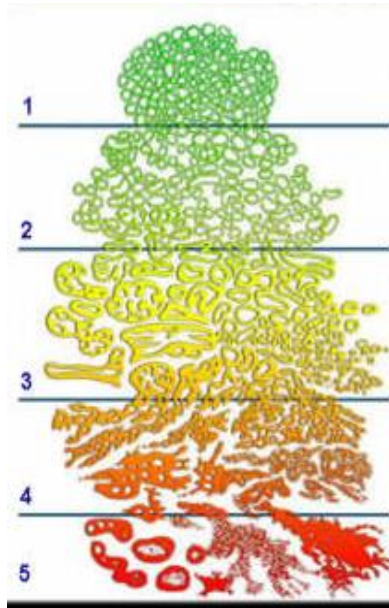
- Độ 2: Ung thư biểu mô tương đối biệt hóa, khối u được tạo nên từ những tuyến tròn hoặc bầu dục, giới hạn kém rõ hơn.

- Độ 3: Ung thư biểu mô biệt hóa trung bình, khối u được tạo thành từ những tuyến dạng biệt hóa đa dạng, khối u giới hạn kém, có xâm nhập ra ngoài tuyến.

- Độ 4: Ung thư biểu mô kém biệt hóa, u là khối đa nhân giới hạn kém và có thể có những khối u hiếm gặp của tế bào giả thận.

- Độ 5: Ung thư biểu mô không biệt hóa, khối u được tạo thành từ những dây hoặc những tế bào đơn độc, sự tạo thành tuyến rất ít.

Độ Gleason được tính bằng cách cộng các độ biệt hóa của 2 mẫu bệnh phẩm đại diện nhất vì vậy Gleason từ 2 đến 10 điểm. Đây là phân độ mô học UTTTL sử dụng phổ biến hiện nay.



1. Tuyến cấu trúc đồng nhất
2. Giữa các tế bào ngăn cách bởi một lớp chất đệm rất mỏng
3. Phân cách bởi lớp đệm dày, tuyến dạng biệt hóa đa dạng
4. Khối tế bào tăng sinh, cấu trúc tuyến ít
5. Xâm nhập lớp đệm lớn, khối u tạo dây tế bào, cấu trúc tuyến là tối thiểu.

Hình 1.1: Phân độ mô học theo Gleason

- *Chụp cộng hưởng từ, cắt lớp vi tính*: Chỉ cho biết kích thước, trọng lượng TTL, đánh giá mức độ xâm lấn, di căn của khối u TTL. Các tổn thương phối hợp của các cơ quan trong ổ bụng.

- *Nội soi bàng quang- niệu đạo*: Chỉ để tìm kiếm các thương tổn ở bàng quang, TTL...

- *Chụp xạ hình xương*: Cho phép đánh giá mức độ, khả năng di căn xương của UTTTL

#### ❖ *Chẩn đoán bằng dấu ấn sinh học*

PSA lần đầu tiên được tìm thấy trong tinh dịch bởi Hara và cộng sự vào năm 1971. Năm 1979, Wang và cộng sự phân lập được PSA từ tổ chức TTL



bằng kỹ thuật miễn dịch. Và năm 1980, Kuriyama và cộng sự đã định lượng được PSA trong huyết thanh.

Trong tuyến tiền liệt, PSA được tiết trực tiếp vào các ống tuyến. Bình thường chỉ một lượng rất nhỏ của PSA thoát được vào hệ tuần hoàn. Trong UTTTL, cấu trúc mô học bị phá vỡ, PSA được tiết trực tiếp vào khoảng gian bào, đi thẳng vào hệ tuần hoàn. Do đó trong UTTTL, nồng độ PSA huyết thanh thường tăng cao có thể gấp 10 lần so với mô tuyến tăng sinh lành tính [24]. Tuy nhiên theo Thompson trong số 2950 nam giới (tuổi từ 62 tới 91) có PSA huyết thanh  $\leq 4$  ng/mL thì có 449 người (chiếm 15,2%) được chẩn đoán UTTTL. Nghiên cứu của Catalon và cộng sự trên 6.630 bệnh nhân, nhận thấy trong số bệnh nhân có tăng PSA trên 4 ng/mL có hơn 80% bệnh nhân có giá trị PSA huyết thanh nằm trong khoảng 4- 10 ng/mL [25] khoảng 2/3 các trường hợp kết quả sinh thiết TTL lành tính. Các công bố này chứng tỏ PSA huyết thanh không đặc hiệu cho UTTTL. Vì vậy, Cho đến nay, giá trị bình thường của PSA huyết thanh vẫn chưa thật sự thống nhất. Các nghiên cứu còn cho thấy sự thay đổi nồng độ PSA huyết thanh không chỉ do UTTTL mà còn có thể do viêm, chấn thương hoặc tăng sinh lành tính của TTL hoặc do dùng một số thuốc [26],[27],[28],[29],[30]. PSA chỉ đặc hiệu cho TTL không đặc hiệu cho UTTTL.

## **1.2.2. Các hiểu biết mới trong chẩn đoán và điều trị UTTTL**

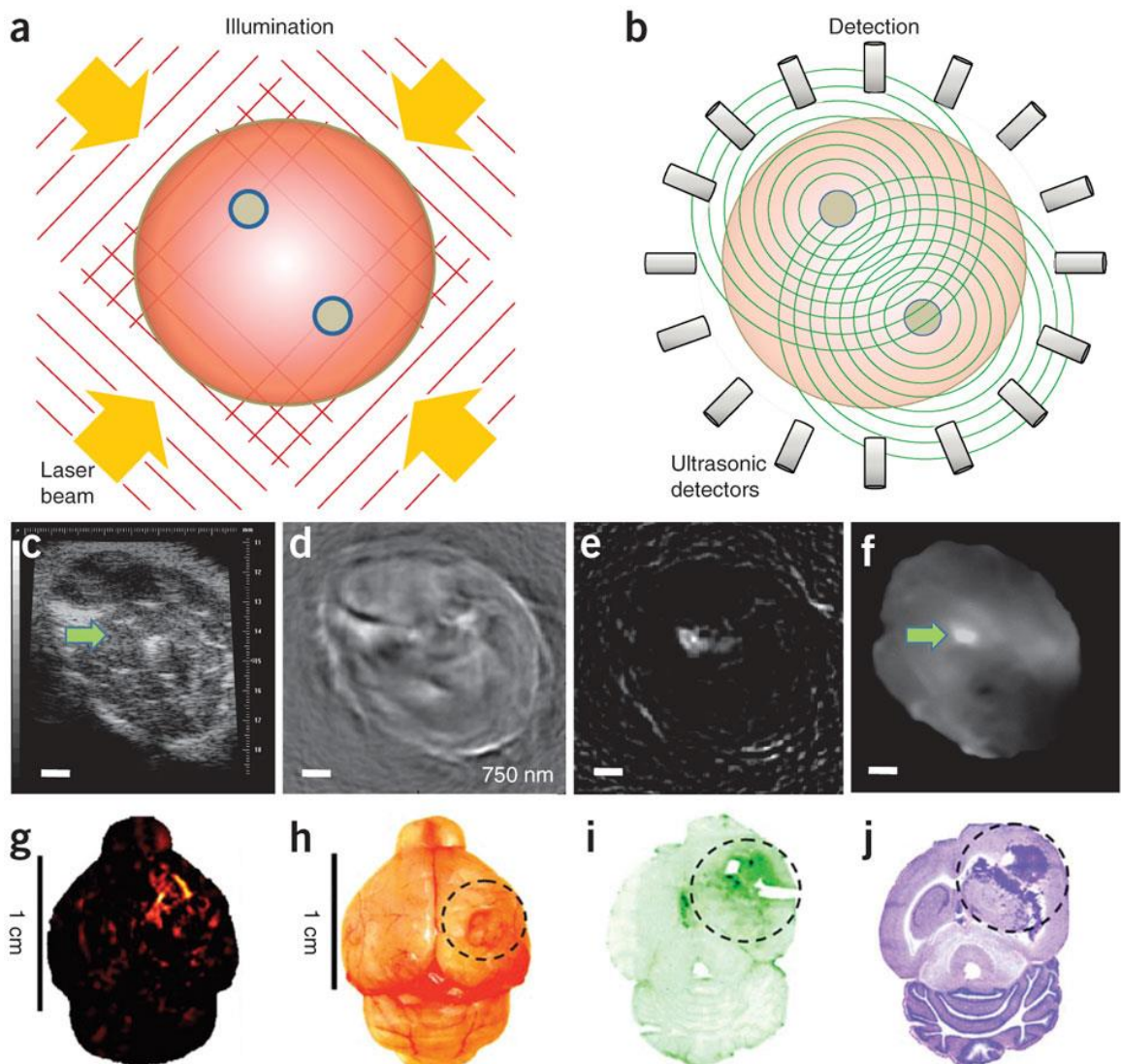
### ***1.2.2.1. Các nghiên cứu mới trong chẩn đoán UTTTL***

UTTTL ban đầu là một tế bào đơn lẻ của TTL bị mắc lỗi. Thông thường các tế bào có lỗi di truyền trong cơ thể đều bị phát hiện và được sửa chữa các sai sót của DNA. Nếu các lỗi không sửa chữa được các tế bào mang lỗi phải chết theo chương trình (Apoptosis). Trong trường hợp một tế bào có lỗi không chịu chết đi và không được sửa chữa mà bắt đầu phân chia không có sự kiểm soát đó là bắt đầu của ung thư.

Ở tuyến tiền liệt khi có những tế bào với DNA bị biến đổi phát triển với số lượng vượt ra khỏi sự kiểm soát của cơ thể, đó chính là lúc UTTTL bắt đầu. UTTTL xảy ra khi những tế bào ác tính được tạo thành và nhân rộng trong tuyến. Ngày nay người ta biết rõ rằng các nguyên nhân của UTTTL là sự tương tác của ba nhóm tác nhân: Di truyền, lối sống và môi trường. Các nhóm nguyên nhân cụ thể đã được công nhận đó là: tuổi cao, yếu tố gia đình, chế độ ăn nhiều thịt, mỡ động vật, thiếu sinh tố D. UTTTL dù do nguyên nhân nào cũng có biểu hiện là các biến đổi gen. Các biến đổi gen này chỉ khi đã đủ lớn về số lượng mới có thể phát hiện được bằng các phương pháp chẩn đoán hình ảnh, mô bệnh học, thăm khám trực tiếp hay muộn nhất đó là các biểu hiện trên lâm sàng. Vì vậy chẩn đoán sớm UTTTL bằng các phương pháp cổ điển rất khó khăn. Điều này đã hướng các nhà khoa học tìm đến các phương pháp chẩn đoán đặc hiệu và sớm cho UTTTL.

❖ *Siêu âm cắt lớp*

Siêu âm cắt lớp (ULT) là phương pháp chẩn đoán hình ảnh hiện đại. Phương pháp này vận dụng sự tương tác của các nguyên lý vật lý khác nhau như các hình ảnh thu được từ siêu âm cho biết tính năng của một mô cơ quan kết hợp cùng hình ảnh của mô cơ quan bằng tác dụng chụp nhiều lát cắt của CT. Trong phương pháp này các dữ liệu siêu âm được thu nhận kết hợp hình ảnh CT. Sau đó, toàn bộ các thông tin được xử lý rồi dựng hình mô phỏng từ các thông tin thu được [31]. Bằng phương pháp này các nhà lâm sàng (đặc biệt là ngoại khoa) có thể có một bản copy của tổ chức, cơ quan cần chẩn đoán, điều trị bằng plastic có kích thước và cấu trúc giống như trong thực tế.



Hình 1.2: Mô tả nguyên lý hoạt động của siêu âm cắt lớp (*Nature Methods* ISSN 1548-7091)

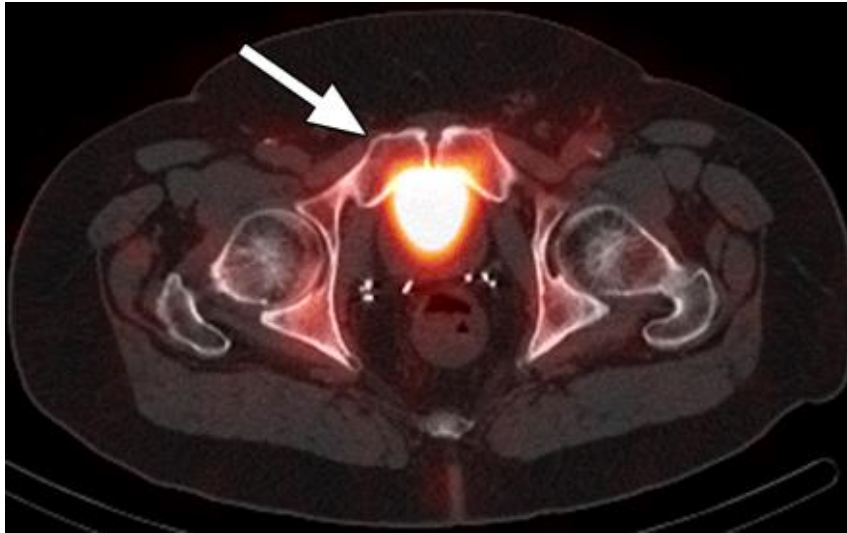
Một nghiên cứu đã sử dụng phương pháp này để cải thiện tính chính xác của hình ảnh tái tạo tuyến tiền liệt ở người. Phương pháp này đạt được ba nội dung: (1) Tái tạo lại tuyến tiền liệt của bệnh nhân; (2) Phân chia được các khu vực tuyến tiền liệt để tìm kiếm các bất thường trong khu vực; (3) Phát hiện các bất thường về hình thái để cải thiện chẩn đoán. Nghiên cứu đã chứng minh phương pháp này có thể thăm dò về hình thái với nhiều lớp mô với độ bao phủ của hình ảnh tại các vị trí là 100% và tính chính xác về quang học là

95% [32]. Phương pháp siêu âm cắt lớp hiện vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu và thử nghiệm trước khi đưa vào ứng dụng rộng rãi trên lâm sàng.

❖ *PET/CT*

Chụp cắt lớp phát xạ positron (PET/CT) là một hình thức chẩn đoán bằng hình ảnh các chuyển hóa sinh học hoặc chức năng trong cơ thể ở mức độ tế bào. Đây là điểm khác biệt so với các thiết bị chẩn đoán như cộng hưởng từ (MRI) hay chụp cắt lớp điện toán (CT). Các phương pháp chẩn đoán hình ảnh trước đây thường chỉ nhận diện các bệnh lý và giai đoạn bệnh qua việc phát hiện cấu trúc hay những thay đổi về tổ chức của cơ thể. Những chuyển hóa bất thường trong cơ thể thường xảy ra sớm hơn so với các thay đổi về cấu trúc, vì thế chẩn đoán hình ảnh bằng PET cho phép phát hiện sớm phần lớn các bệnh cảnh ung thư và đánh giá mức độ di căn của ung thư trong cơ thể một cách chính xác hơn so với các thiết bị chẩn đoán hình ảnh thông thường như cộng hưởng từ (MRI) và chụp cắt lớp điện toán (CT scans). Chẩn đoán hình ảnh bằng PET hiệu quả hơn trong việc xác định giai đoạn và khả năng tái phát cũng như đánh giá các đáp ứng đối với điều trị của cơ thể.

Với sự tiến bộ của khoa học kỹ thuật, các thiết bị chẩn đoán hình ảnh hợp nhất thế hệ thứ 2 cho phép kết hợp hai hệ thống hình ảnh PET và CT. Điều này giúp cho các bác sĩ có thể có được những thông tin về chuyển hóa và cấu trúc liên quan đến căn bệnh chỉ với một hình ảnh PET/CT 64 lát cắt. Hệ thống chụp ảnh PET/CT hiện đại với kỹ thuật “Time-of-Flight” cho hình ảnh có độ nhạy cao, giảm bớt liều lượng phóng xạ, thời gian chụp ngắn. Như vậy một hình ảnh PET/CT có thể thay thế nhiều phép chẩn đoán hình ảnh y khoa khác chỉ với một lần chụp [33].



*Hình 1.3: Hình ảnh ung thư tuyến tiền liệt chụp PET/CT*

Một thuốc hiện đang được nghiên cứu ứng dụng nhiều nhất trong kỹ thuật PET/CT ở các bệnh nhân UTTL là  $^{11}\text{C}$ -Choline. PET  $^{11}\text{C}$ -choline / CT đã được chứng minh là có khả năng dự đoán thời gian sống thêm ở những bệnh nhân UTTL bị suy giảm các chức năng sinh hóa sau điều trị nội tiết tố androgen [34].

❖ *Các dấu ấn sinh học trong huyết thanh*

Dấu ấn sinh học trong huyết thanh là các phân tử được sản xuất bởi các tế bào bình thường, tế bào bất thường và do phản ứng của cơ thể với ung thư. Các phân tử này lưu hành trong huyết thanh, huyết tương và các dịch sinh học của cơ thể vì vậy có thể được xác định bằng các xét nghiệm. Nhiều các dấu ấn trong huyết thanh đã được ứng dụng và có giá trị lâm sàng tốt trong chẩn đoán và chẩn đoán giai đoạn của UTTL.

➤ *Kháng nguyên sớm ung thư tuyến tiền liệt (EPCA).*

Ung thư nói chung, UTTL nói riêng đều do những biến đổi bất thường gen của cơ thể dẫn đến mất sự kiểm soát quá trình phân chia tế bào của một mô cơ quan, vì vậy tất yếu sẽ có sự xuất hiện các sản phẩm của các biến đổi gen trong cơ thể. Vấn đề đặt ra là các xét nghiệm phải tìm thấy sản phẩm đặc

trung cho những biến đổi gen ở các tế bào của UTTTL. Điều này đã hướng các nhà khoa học tìm đến các dấu ấn sinh học đặc hiệu cho môTTL ung thư.

Đầu tiên, các nghiên cứu phát hiện thấy ở các tế bào bình thường có những loại protein có thể được tách ra với số lượng ít từ chất nền trong nhân, vì vậy chúng được đặt tên là các NMP (Nuclear matrix protein).

Từ các nghiên cứu proteomic về các protein trong tế bào, năm 1991, lần đầu tiên Getzenberg và cộng sự đã tìm thấy một loại protein chất nền nhân có trong mô TTL của chuột ung thư mà không có trong mô TTL của chuột bình thường. Ông đặt tên protein này là kháng nguyên UTTTL sớm (EPCA). EPCA có trọng lượng phân tử khoảng 40kDa, có mang phần lớn các đặc điểm của các protein nền. Nhưng EPCA khác với các NMP ở giai đoạn trước ở chỗ, NMP là protein bình thường luôn có trong chất nền ở sâu bên trong nhân tế bào, còn EPCA là protein chỉ tồn tại trong nhân của tế bào UTTTL với một lượng nhỏ. Ngoài ra, EPCA còn được tìm thấy ở bên ngoài của nhân tế bào, đặc biệt trong tế bào chất và màng tế bào ung thư của TTL [35]. Như vậy, so với các NMP, sự biểu hiện của EPCA là đặc hiệu hơn cho các tế bào UTTTL.

Sau đó, protein này cũng tìm thấy trong các tổn thương tiền UTTTL, đặc biệt trong tân sản nội biểu mô TTL (PIN).

Cho đến nay các nhà khoa học còn chứng minh sự tăng EPCA huyết thanh ở những bệnh nhân UTTTL có sinh thiết lần đầu âm tính giúp dự báo UTTTL ở giai đoạn khu trú hay đã xâm lấn, di căn [35].

Tháng 4 năm 2007, lần đầu tiên Leman, Getzenberg và cộng sự đã xác định chính xác một protein khác cũng xuất hiện trong nhân của tế bào UTTTL với lượng nhỏ mà không có trong nhân của tế bào TTL bình thường, đó là EPCA-2 [36]. EPCA-2 không có liên quan với EPCA. Tên của các loại kháng nguyên này là do lịch sử phát hiện ra chúng. EPCA là protein kháng nguyên UTTTL sớm phát hiện đầu tiên còn EPCA-2 là protein kháng nguyên UTTTL

sớm phát hiện thứ hai. EPCA-2 cũng được tìm thấy ở những người sinh thiết ban đầu là lành tính nhưng sau đó được chẩn đoán UTTTL [36].

EPCA-2 với một đặc điểm quan trọng là protein này chỉ tăng mạnh ở tế bào ác tính TTL vì vậy nó rất đặc trưng cho UTTTL. Gần đây, protein này đã được đề xuất là một dấu ấn sinh học mới trong tổn thương ác tính của TTL[37].

EPCA-2 là protein có trọng lượng khoảng 30 kDa. EPCA-2 có nhiều phân đoạn peptid khác nhau với chiều dài khoảng 5 đến 15 acid amin. EPCA-2 trong tự nhiên hoặc bất kỳ đoạn peptid nào của chúng, đều có đầy đủ các hoạt tính sinh học hay tính sinh miễn dịch để có thể tạo ra một đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng thể. Hiện nay, các nhà khoa học đã công bố 3 đoạn peptid được cho là 3 epitop của EPCA-2 đó là đoạn EPCA-2.22, EPCA-2.19 và EPCA-2.4 [6],[37],[5].

*Bảng 1.1: Trình tự acid amin ba epitop của EPCA-2 [5]*

Epitop của EPCA-2	Số lượng acid amin	Trình tự acid amin (viết tắt 1 chữ cái)	Trình tự acid amin (viết tắt 3 chữ cái)
EPCA-2.22	11	VIQPYPNFYMV	Val-Ile-Gln-Pro-Tyr-Pro-Asn-Phe-Tyr-Met-Val
EPCA-2.19	7	FAQDNDL	Phe-Ala-Gln-Asp-Asn-Asp-Leu
EPCA-2.4	6	SFGQVK	Ser-Phe-Gly-Gln-Val-Lys

Năm 2009, Getzenberg được cấp bằng sáng chế cho những nghiên cứu về giá trị chẩn đoán UTTTL của EPCA-2 [37]. Kháng nguyên sớm ung thư tuyến tiền liệt (EPCA-2) là một protein xuất hiện trong chất nền nhân tế bào TTL bị ung thư [36],[37]. EPCA-2 tăng ở tế bào TTL bị ung thư và tổ chức xung quanh nhưng không xuất hiện ở các mô TTL bình thường cũng như ở mô bệnh nhân u phì đại lành tính TTL [5]. Thực tế lâm sàng đã chứng minh EPCA-2 là một dấu ấn sinh học rất nhiều triển vọng trong UTTTL bởi độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm này rất cao. Các nghiên cứu còn cho thấy EPCA-2 có

biểu hiện với mức độ cao có ý nghĩa ở các mô UTTTL có xâm lấn so với không có xâm lấn, điều này hướng đến việc sử dụng EPCA để dự đoán sự xuất hiện, mức độ xâm lấn và theo dõi sự tiến triển của bệnh. Theo một nghiên cứu trên các bệnh nhân có kết quả sinh thiết ban đầu đều âm tính, đã có tới 75% các trường hợp có EPCA-2 dương tính và tiến triển thành ung thư 5 năm sau đó [5]. Đáng chú ý, EPCA-2 còn được phát hiện trong tuyến tiền liệt của những người này ít nhất hai năm trước khi có các biểu hiện hình thái học của ung thư. Như vậy sự hiện diện của EPCA-2 là đặc hiệu với UTTTL ở giai đoạn rất sớm. Vì vậy, việc dùng KT đặc hiệu với EPCA-2 sẽ giúp phát hiện sự có mặt của EPCA-2 qua đó chẩn đoán sớm UTTTL. Từ các kết quả này đã mở ra một hướng nghiên cứu mới trong chẩn đoán sớm UTTTL.

Bằng phản ứng kết hợp KN-KT, người ta có thể sử dụng KT đặc hiệu với EPCA để xác định sự có mặt của EPCA-2 ở các mô, huyết thanh hay các dịch sinh học của bệnh nhân UTTTL. KT này còn có thể giúp cho việc dự đoán mức độ và nguy cơ hình thành ung thư và nguy cơ di căn của UTTTL [38]. Các nghiên cứu cũng đã xác định EPCA-2 không chỉ có ở mô TTL ung thư mà còn xuất hiện với nồng độ cao trong máu bệnh nhân UTTTL. Nồng độ biểu hiện của EPCA có sự khác biệt giữa người có khối u còn khu trú và người đã có di căn. Vì vậy mức độ biểu hiện của EPCA cho phép phân biệt giữa bệnh nhân UTTTL có khối u còn khu trú trong tuyến và những người khối u đã lan ra ngoài tuyến. Trong một nghiên cứu của Getzenberg khi đo nồng độ EPCA-2 ở 330 đàn ông, kết quả xác định EPCA-2 chính xác tới 90% cho những người đàn ông bị UTTTL còn khu trú và 98% những người có khối u đã lan ra ngoài tuyến. Các thử nghiệm này âm tính ở 97% những người đàn ông không UTTTL. Các nhà khoa học tin rằng EPCA-2 có độ nhạy rất cao và đặc hiệu cho UTTTL và cho phép xác định được bệnh khi còn ở dạng vết với độ chính xác tới 94% [39]. Một nghiên cứu khác sử dụng phương pháp ELISA



xác định nồng độ EPCA trong huyết thanh 449 bệnh nhân đã được phẫu thuật cắt bỏ TTL do phì đại so sánh với 112 nam giới khỏe mạnh. Với ngưỡng cutoff 10ng/ml, kết quả cho thấy 100% những người đàn ông khỏe mạnh không thấy EPCA-2 trong huyết thanh còn ở những nam giới UT TTL phương pháp ELISA đã xác định đúng với độ đặc hiệu 98% và độ nhạy 100% ( EPCA huyết thanh ở bệnh nhân UT TTL so với những người không UT TTL và người khỏe mạnh lần lượt là  $17,63 \pm 2,42$  ng/ml so với  $5,58 \pm 1,61$  ng/ml và  $4,95 \pm 1,43$  ng/ml,  $p < 0,001$ ) [5],[40]. Nghiên cứu kết luận: có thể sử dụng EPCA-2 như một dấu ấn sinh học huyết thanh có độ nhạy cao để chẩn đoán sớm UT TTL [38]. Đồng thời khi sử dụng KT đặc hiệu EPCA để nhuộm cho kết quả dương tính ở các mẫu sinh thiết tại thời điểm mà kết quả mô bệnh học âm tính với UT TTL nhưng 5 năm sau đó chính các bệnh nhân này mới được chẩn đoán UT TTL [5]. Nhằm làm sáng tỏ liệu kháng thể đặc hiệu EPCA-2 có thể áp dụng trong một xét nghiệm miễn dịch để xác định sự có mặt của EPCA-2 trong huyết tương không. Đã dẫn đến sự ra đời của các nghiên cứu sử dụng KT đặc hiệu cho chẩn đoán sớm UT TTL trên lâm sàng. Người ta sử dụng phương pháp ELISA định lượng EPCA trong huyết tương của 46 người, bao gồm các nhóm: nhóm bệnh nhân UT TTL, nhóm người khỏe mạnh, nhóm bệnh nhân ung thư khác, nhóm bệnh nhân bị chấn thương dây sống, và những bệnh nhân bị viêm tuyến tiền liệt (giá trị ngưỡng xác định 1,7 hấp thụ ở 450 nm). Kết quả cho thấy chỉ có các bệnh nhân UT TTL có sự hiện diện của EPCA ở trên ngưỡng 1,7. Các phân tích thống kê cũng chỉ ra một sự khác biệt đáng kể trong mức độ biểu hiện EPCA giữa các bệnh nhân UT TTL và các nhóm khác, đặc biệt là với nhóm người bình thường ( $p < 0.0001$ ). Độ nhạy của xét nghiệm dùng KT đặc hiệu xác định EPCA-2 cho bệnh nhân UT TTL là 92%, độ đặc hiệu là 94%. Độ đặc hiệu của nhóm người khỏe mạnh là 100%. Nghiên cứu này càng cho thấy việc dùng KT đặc hiệu xác định sự có

mặt của EPCA trong máu để chẩn đoán sớm UTTTL là hoàn toàn có cơ sở [38],[40].

➤ *Kháng nguyên tế bào gốc tiền thân của tuyến tiền liệt.*

Kháng nguyên tế bào gốc tiền thân của tuyến tiền liệt (PSCA) là một glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein đặc hiệu TTL. PSCA biểu hiện rất mạnh trong khoảng 85% bệnh nhân UTTTL và mức độ biểu hiện này có mối liên quan với điểm Gleason, giai đoạn, tình trạng tiến triển trên lâm sàng và sự di căn tại xương, gan, hạch lympho. Phân tử glycoprotein này biểu hiện ở khoảng 73% các trường hợp PIN độ cao và 22% các trường hợp PIN độ thấp [41]. Giá trị tiên lượng của PSCA đã được công nhận ở những bệnh nhân UTTTL có kèm theo các bệnh lí khác của TTL. Ngoài ra sự xuất hiện của mRNA PSCA trong máu được phát hiện do phương pháp RT-PCR cho thấy khả năng tiến triển chậm và tăng thời gian sống thêm của bệnh nhân UTTTL [42].

➤ *Hexokinase 2 (hK2).*

Hexokinase 2 còn được gọi là hK2 là một enzym ở người được mã hóa bởi gen hK2. Hexokinases phosphorylate glucose tham gia sản xuất glucose 6-phosphate theo con đường glycolytic. Gen hK2 chủ yếu được tìm thấy trong cơ xương ở màng ngoài của ti thể và được biểu hiện khi có các đáp ứng với insulin. Các nghiên cứu ở chuột cho thấy biểu hiện của gen hK2 có liên quan đến tốc độ tăng glycolysis trong các tế bào ung thư phát triển nhanh.

Bằng kĩ thuật RT-PCR định lượng, hK2 được xác định có tăng lên trong các bệnh nhân trên lâm sàng có độ PIN cao, bệnh nhân UTTTL, và di căn hạch. Độ nhạy cao của hK2 với các xét nghiệm miễn dịch đặc hiệu hứa hẹn đây là dấu ấn sinh học có thể giúp chẩn đoán phân biệt các bệnh UTTTL và u phì đại lành tính TTL với PSA trong "vùng xám". Hơn nữa, riêng giá trị hK2

huyết thanh hoặc có kết hợp với giá trị tPSA và fPSA có thể dự đoán sự phát triển và tiên triển của bệnh [43],[44].

➤ *Osteoprotegerin (OPG).*

Osteoprotegerin (OPG), còn được gọi là yếu tố ức chế osteoclastogenesis (OCIF), hoặc là thành viên 11B thuộc siêu họ các thụ thể của yếu tố hoại tử u (Tumor necrosis factor receptor superfamily member -11BTNFRSF11B). OPG là một loại protein với chức năng là một receptor cytokine trong cơ thể người được mã hóa bởi gen TNFRSF11B.

Nồng độ OPG trong huyết thanh tăng cao có ý nghĩa ở những bệnh nhân UTTTL giai đoạn tiên triển so với các bệnh nhân mắc các bệnh lí khác của tuyến tiền liệt. Tăng OPG huyết thanh được chấp nhận là dấu hiệu sớm của tái phát bệnh sau dùng điều trị androgen và là một yếu tố theo dõi ở những bệnh nhân có di căn xương [45],[46].

➤ *Human Glandular Kalikrein 2 (huK2).*

Human glandular kallikrein (huK2) là một protease serine, chủ yếu tồn tại trong tuyến tiền liệt và trong tinh dịch ở mức trung bình 6 mg/ ml. 79% trình tự protein này đã được biết rõ cùng với KN đặc hiệu TTL (PSA). huK2 liên quan chặt chẽ đến sự biểu hiện PSA cao trong mô tuyến tiền liệt [47]. Dấu ấn này được sử dụng kết hợp giá trị tPSA và fPSA giúp tăng độ nhạy và độ đặc hiệu trong xác định UTTTL [48]. huK2 được chứng minh có vai trò quan trọng liên quan đến việc phát hiện sớm và chẩn đoán giai đoạn của UTTTL. Các nghiên cứu chỉ ra rằng huK2 có thể phân biệt giữa giai đoạn T2 và T3 của khối u TTL, và có thể dự đoán mức độ khối u ở mức độ 4 và 5 theo điểm Gleason chính xác hơn so với chỉ số PSA hoặc % fPSA [48].

➤ *Transforming Growth Factor -  $\beta$  and Interleukin-6 (TGF-  $\beta$ ).*

TGF- $\beta$ 1 là một polypeptide thành viên của siêu gia đình các yếu tố tăng trưởng beta của các cytokine. Đây là một protein được tiết ra và thực hiện

nhều chức năng tế bào, bao gồm cả việc kiểm soát tăng trưởng tế bào, tăng sinh tế bào, phân chia tế bào và apoptosis.

Nồng độ cao TGF- $\beta$ 1 và IL-6 trong huyết thanh tăng có liên quan với tăng nguy cơ di căn của UTTTL [49]. Ở những bệnh nhân có di căn và đã phẫu thuật triệt căn TTL luôn có tăng nồng độ IL-6, cùng với IL-8 và IL-11 trong huyết thanh [50]. Vì vậy định lượng TGF- $\beta$ 1 và IL-6 trong huyết thanh trước phẫu thuật có giá trị dự đoán chính xác khả năng di căn hạch, dự đoán tiên triển và tái phát của bệnh [49],[50].

➤ *Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu*

Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) là một protein tín hiệu được sản xuất bởi các tế bào sau khi được hoạt hóa sự tăng tân tạo và hình thành mạch. Khi VEGF biểu hiện quá mức, có thể góp phần là nguyên nhân gây biến chuyển ung thư. Người ta thấy rằng mức độ biểu hiện của các phối tử của VEGF có tăng cao đáng kể ở những bệnh nhân UTTTL có di căn. Tăng mức độ VEGF huyết tương là một yếu tố tiên lượng độc lập trong UTTTL [51]. Hơn nữa, một nghiên cứu khác chứng minh rằng mật độ các mạch máu cũng có liên quan với tăng VEGF ở những bệnh nhân UTTTL di căn so với những người không có di căn [52].

*Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán UTTTL bằng các chỉ dấu sinh học bên cạnh việc sử dụng các dấu ấn sinh học trong huyết thanh, còn có các dấu ấn trong nước tiểu và tại mô cấu trúc TTL. Các nghiên cứu về khả năng ứng dụng các chỉ dấu sinh học trong chẩn đoán UTTTL khuyến cáo nên sử dụng phối hợp cùng lúc nhiều loại chỉ dấu sinh học để nâng cao hiệu quả trong sàng lọc phát hiện sớm UTTTL.*

**1.2.2.2. Các nghiên cứu mới trong điều trị**

Điều trị UTTTL với hai mục tiêu: (1) *Loại bỏ các tế bào ung thư*, (2) *Không gây ảnh hưởng các tế bào lành tính.*

❖ *Phương pháp siêu âm tập trung tăng cường (HIFU)*

Điều trị UTTTL và các bệnh TTL bằng phương pháp Siêu âm tập trung tăng cường (HIFU) là một phương pháp điều trị sử dụng sóng siêu âm cường độ cao tiêu diệt các tế bào ung thư của TTL. Thủ thuật này được thực hiện lặp lại nhằm loại bỏ triệt căn với các UTTTL còn khu trú. Một nghiên cứu tại Anh trên 359 bệnh nhân UTTTL còn khu trú (từ tháng 10 năm 2004 đến tháng sáu năm 2012) trong đó có 130 (36,2%) được điều trị lặp lại sau mỗi 2 năm. Kết quả cho thấy HIFU loại trừ được khối u nhưng có 10,8 % bệnh nhân có nhiễm trùng đường tiết niệu sau lần điều trị đầu tiên và 3,9 % sau khi điều trị lần 2 ( $p = 0.009$ ). Biến chứng giãn niệu đạo gặp ở 13,8 % số bệnh nhân sau khi điều trị siêu âm lần đầu và 14 % ở bệnh nhân được điều trị lặp lại ( $p = 0,7$ ), rối loạn cường dương gặp ở 56,2% và 56% số bệnh nhân sau điều trị lần đầu và sau khi điều trị lại [53].

❖ *Phương pháp điều trị bằng các chế phẩm tăng cường miễn dịch*

Điều trị UTTTL bằng chế phẩm tăng cường miễn dịch là một biện pháp đang được cả thế giới chú ý. Các chế phẩm này có tác dụng hỗ trợ tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể chống lại các kháng nguyên khối u từ đó cải thiện thời gian sống thêm của bệnh nhân. Nghiên cứu ở Anh sử dụng biện pháp tiêm interleukin (IL)-15 trên chuột đã có khối UTTTL sau đó kiểm tra khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch của chuột với kháng nguyên khối u. Kết quả đã chứng minh có sự đồng biểu hiện của IL-15 với các thụ thể của nó IL-15R $\alpha$ . IL-15R $\alpha$  làm tăng sự biểu hiện các thụ thể trên bề mặt tế bào và gây tăng tiết IL-15. Sự đồng biểu hiện IL-15 và IL-15R $\alpha$  có tác dụng ức chế sự hình thành khối u ở những chuột đã được gây khối ung thư. Sự ức chế tăng trưởng khối u do đồng biểu hiện IL-15 và IL-15R $\alpha$  tốt hơn ở chuột chỉ được tiêm IL-15 đơn độc. Đồng thời cũng thấy có sự tăng cường hoạt động ở tế bào

TCD8 và tế bào diệt tự nhiên (NK). Tuy nhiên đây mới là thành công ở bước thử nghiệm trên chuột [54],[55].

❖ *Phương pháp điều trị bằng vector tái tổ hợp của vi rút Newcastle*

Tháng 2 năm 2012, lần đầu tiên các nhà nghiên cứu Hoa Kỳ đã báo cáo một dòng vi rút sợi được thiết kế để tiêu diệt tế bào ung thư. Vi rút Newcastle là một biến thể do sửa đổi từ vi rút sợi ban đầu với đích tiêu diệt là tất cả các loại tế bào ung thư tuyến tiền liệt. Vi rút này do một nhóm các nhà khoa học thú y ở Mỹ nghiên cứu.

Hoạt động của vi rút Newcastle là xâm nhập vào các tế bào ung thư, sau đó tích hợp bộ gen của nó vào bộ gen của tế bào, kích hoạt chu trình sao chép của tế bào và sử dụng chu trình nhân lên của tế bào để sản sinh bộ gen của vi rút thay vì DNA của tế bào. Khi có số lượng bản sao đủ lớn của vi rút sẽ gây vỡ tế bào, giải phóng các vi rút con để lây nhiễm tế bào ung thư khác, do đó chống tăng sinh của các tế bào ung thư [56].

Vi rút Newcastle (NDV) dùng trong điều trị UTTTL là một loại vi rút được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp với đặc điểm chỉ được kích hoạt bằng kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt có bản chất là protease với tên là rNDV-PSA. Vì vậy, các rNDV chỉ nhân lên và phá vỡ các tế bào ung thư tuyến tiền liệt không gây ảnh hưởng lên các tế bào bình thường khác. Tế bào khỏe mạnh bình thường có một hệ thống chống virus dựa trên interferon nên ngăn rNDV đi vào tế bào, do đó ngăn ngừa virus xâm nhập phá hủy tế bào bình thường. Ngược lại tế bào ung thư có hệ thống kháng virus khiếm khuyết, rNDV khai thác điều này để tích hợp vào tế bào bị bệnh, sử dụng hệ thống sao chép của các tế bào này rồi tiêu diệt chúng. Vì vậy, các thử nghiệm đã cho thấy với liều rNDV-PSA lớn so với trong tự nhiên cũng chỉ gây triệu chứng giống như cúm ở những bệnh nhân UTTTL. Các vi rút tái tổ hợp hiện đã sẵn sàng cho các thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật, và có thể là thử nghiệm

trên người. Khả năng ứng dụng trên lâm sàng của vi rút Newcastle là nhiều triển vọng bởi nó chỉ tiêu diệt tế bào ung thư do vậy tránh được các tác dụng phụ khó chịu khác nhau của các phương pháp điều trị ung thư khác. Thêm một điểm rất đáng chú ý đó là rNDV-PSA có thể thâm nhập vào khối u sâu và tác dụng hiệu quả, mà không cần phải liên tục để bổ xung số lượng rất lớn vi rút vào cơ thể [57]. Kết quả của nghiên cứu hứa hẹn một liệu pháp gen điều trị ung thư có thể loại trừ các tác dụng phụ thường có khi điều trị bằng nội tiết tố và hóa trị liệu.

❖ *Hai hormone mới trong điều trị ung thư tuyến tiền liệt*

Tính đến tháng 11 năm 2014, tổ chức FDA của Mỹ đã công nhận cho sử dụng 2 loại thuốc mới trong điều trị UTTL đó là: Xtandi và Xofigo.

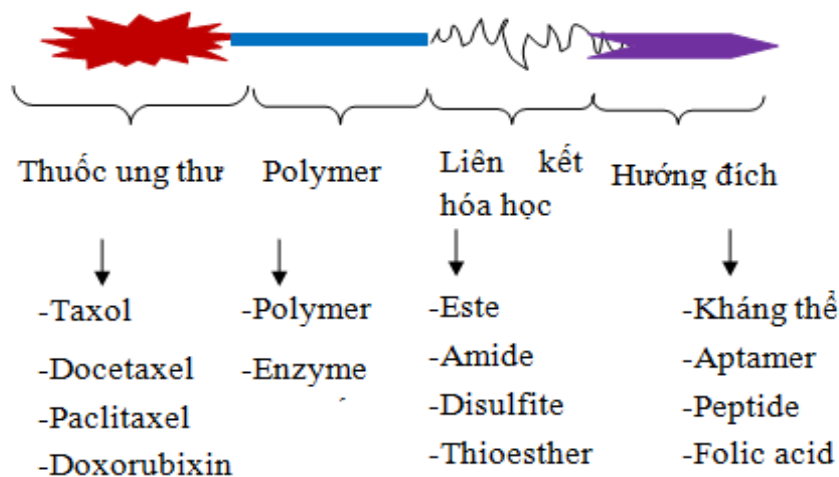
Xtandi, một biệt dược của Enzalutamide, là một thuốc kháng Androgen được sử dụng bằng đường uống. Đây là một liệu pháp hàng đầu đối với các bệnh nhân có di căn sau phẫu thuật TTL tiết căn. Hiện nay Xtandi được tiếp tục mở rộng chỉ định dùng cho những bệnh nhân đã phẫu thuật TTL có di căn chưa hóa trị liệu. Thống kê kết quả cho thấy điều trị bằng Enzalutamide đã làm tăng đáng kể thời gian sống thêm và trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư tuyến tiền liệt. So với giả dược Enzalutamide giúp giảm nguy cơ tử vong 29%, đồng thời làm giảm di căn xương và tăng thời gian sống thêm trung bình thêm 17 tháng so với giả dược [58].

Xofigo được Cục Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã phê duyệt để điều trị những người đàn ông bị UTTL đã di căn. Quyết định này được thực hiện sau một thử nghiệm lâm sàng ở 809 người đàn ông bị ung thư tuyến tiền liệt đã phẫu thuật và mới chỉ có di căn xương. Kết quả cho thấy những người đàn ông được sử dụng Xofigo thời gian sống thêm trung bình là 14 tháng so với chỉ hơn 11 tháng ở những người đàn ông chỉ được tiêm giả dược.

Xofigo được tiêm vào tĩnh mạch, mỗi tháng một lần. Các tác dụng phụ phổ biến nhất trong các nghiên cứu của thuốc là buồn nôn, tiêu chảy, ói mửa, sưng chân, mất cá chân, hoặc bàn chân. Các bất thường phổ biến nhất được phát hiện trong quá trình thử nghiệm máu bao gồm giảm số lượng hồng cầu, lympho, bạch cầu, tiểu cầu và các bạch cầu trung tính [59].

#### ❖ Điều trị trúng đích

Điều trị trúng đích là phương pháp dùng các chất có khả năng gắn được với thuốc đồng thời có thể liên kết đặc hiệu chỉ với tế bào đích cần tác động. Để thực hiện điều này hệ dẫn thuốc trúng đích là yếu tố then chốt. Hệ dẫn thuốc trúng đích phải đạt các tiêu chuẩn (1) Hòa tan tốt trong nước, màng lipid, và các dịch sinh học trong cơ thể. (2) Được cơ thể hấp thu theo đường uống hoặc tiêm tại chỗ, và qua được hàng rào máu não mà vẫn ổn định về mặt cấu trúc hóa học. (3) Đảm bảo độ tinh sạch và mùi vị để bệnh nhân có thể uống, tiêm. (4) Không gây độc, đau đớn hay các phản ứng kích thích cho bệnh nhân.



Hình 1.4: Sơ đồ cấu trúc một hệ dẫn thuốc trong điều trị trúng đích.

Về mặt kỹ thuật có thể coi điều trị trúng đích là "hóa trị liệu". Nhưng điểm khác nhau cơ bản là các loại thuốc điều trị trúng đích hoạt động với sự chọn lọc cao nên không gây nhiều độc tính như các loại thuốc hóa trị liệu



trước đây. Thuốc điều trị trúng đích nhờ sự dẫn đường của các hệ dẫn thuốc tấn công chính xác các tế bào ung thư mà không làm tổn thương các tế bào bình thường. Trong khi các thuốc sử dụng trong hóa trị liệu trước đây tác động thông qua cơ chế chống sự tăng sinh của tất cả các tế bào trong cơ thể, hoặc làm dừng chu trình phân chia tế bào ở những pha nhất định hơn là tạo ra các hiệu ứng độc đối với một dòng tế bào ung thư cụ thể. Hóa trị liệu trước đây với cơ chế điều trị là tác động lên tất cả các tế bào có sự tăng sinh mạnh, vì vậy ở những khối u tạng đặc, phát triển chậm do các tế bào ở đây không tăng sinh nhanh tác dụng của hóa trị liệu cho hiệu quả thấp [60]. Ở những bệnh nhân ung thư tạng đặc thường phải điều trị phối hợp các thuốc chống ung thư liều cao cộng với tính không chọn lọc của thuốc dẫn đến các thương tổn đa dạng với ở tế bào bình thường và bệnh nhân phải ngừng điều trị trước khi tiêu diệt hết các tế bào ung thư.

Khả năng chọn lọc đặc hiệu của thuốc trên các tế bào ung thư là bước then chốt để tăng hiệu quả điều trị của phương pháp điều trị trúng đích. Các hệ dẫn thuốc được thiết kế nhằm đạt tới sự chọn lọc đặc hiệu của thuốc điều trị đến đúng tế bào đích cụ thể. Yếu tố quan trọng dẫn đường các hệ dẫn thuốc chính là các dấu ấn sinh học đặc biệt trên các tế bào ung thư được nhận biết bởi các kháng thể đặc hiệu. Năm 2011 Philip Arlenda thành công trong việc dùng kháng thể để ngăn chặn sự phát triển của khối UTTTL trên chuột [61]. Các nghiên cứu ngày càng chứng minh việc sử dụng kháng thể để áp dụng trong các mục đích khác nhau trên lâm sàng như để chẩn đoán sớm hoặc để xác định các giai đoạn và tiến triển bệnh trong UTTTL cũng như điều trị là một hướng mới rất nhiều triển vọng [61].

PSA và PMSA là 2 kháng nguyên có hoạt tính enzyme điển hình được biểu hiện cao ở các tế bào UTTTL có thể sử dụng để hoạt hóa và phân cắt các phức hệ thuốc theo cơ chế phân tách thuốc khỏi phức hệ tại các tế bào khối u.

PSA là một serine protease cắt đặc hiệu protein semenogelin I và II [62]. Sự biểu hiện quá mức của PSA là một dấu hiệu chẩn đoán ung thư tiền liệt tuyến. Đồng thời hoạt tính enzyme của PSA chỉ biểu lộ trong các tế bào tuyến tiền liệt chứ không có trong hệ tuần hoàn. Phức hệ thuốc sẽ chỉ được phân cắt bởi enzyme PSA tại các tổ chức UTTTL và sẽ tạo ra sự tích tụ thuốc trong các tế bào khối u nhiều hơn trong các tế bào thường. Phức hệ dẫn thuốc có kí hiệu 12ADT-SSKYQ là một thuốc điều trị trúng đích trong UTTTL, hoạt động do có sự tương tác với PSA của tế bào UTTTL [63].

PSMA là dạng glycoprotein xuyên màng loại II (100 kDa) được xem như một kháng nguyên ung thư đặc hiệu màng TTL do có sự biểu hiện mạnh tại các tế bào này [63]. Đồng thời PSMA là một enzyme xúc tác việc thủy phân N-Acetylaspartylglutamate (NAAG) thành Glutamate và N-Acetylaspartate, nên PSMA được xem là đích lý tưởng để tạo các thuốc hướng đích trong điều trị đảm bảo thuốc được phân cắt để giải phóng tại các tế bào ung thư đích [64]. Các nghiên cứu sử dụng đặc điểm này để tạo phức hệ dẫn thuốc là sự kết hợp của thuốc chống ung thư *Cisplatin* và yếu tố hướng đích có cấu trúc là một nano-aptamer. Kết quả thử nghiệm cho thấy có sự gắn kết đặc hiệu của hệ dẫn thuốc *Cisplatin-nanoAptamer* với kháng nguyên tuyến tiền liệt PSMA. Phức hệ dẫn thuốc này đã tạo ra độc tính mạnh khi thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư biểu hiện PSMA với giá trị  $IC_{50} = 0,03 \mu M$  (thấp hơn so với giá trị  $IC_{50} = 0,13 \mu M$  của phức hệ thuốc đơn độc). Hơn nữa, hiệu lực của phức hệ có nano và aptamer cao gấp 10 lần so với hiệu lực của *Cisplatin* tự do [65].

Yonedavà cộng sự năm 2008 đã sử dụng một peptide mạch vòng (Peptide 42) có khả năng gắn đặc hiệu với protein GRP78 (một protein điều hòa glucose) biểu hiện quá mức ở nhiều dòng tế bào ung thư như ung thư đại tràng, da, tuyến tiền liệt và ung thư vú. Peptide 42 được gắn với paclitaxel và

doxorubicin. Phức hệ này, sau khi hấp thụ sẽ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên GRP78 trên các tế bào ung thư, sau đó được trung hòa theo cơ chế ẩm bào thông qua thụ thể GRP78 và được chuyển vào lysosome, tại đây phức hệ được phân cắt bởi protease Cathepsin B để giải phóng thuốc trong tế bào. Tác dụng gây độc với tế bào của phức hệ Pep42-paclitaxel và pep42-doxorubicin đã được xác định trên các dòng tế bào ung thư biểu mô trong đó có ung thư biểu mô TTL [66].

### ***1.2.2.3. Các nghiên cứu tại Việt nam***

Nghiên cứu UTTL trước đây tại Việt nam chủ yếu là các nghiên cứu về tỷ lệ mắc bệnh, giá trị PSA trong chẩn đoán các bệnh của TTL.

Nghiên cứu của Nguyễn Văn Hưng năm 2005 trên 633 bệnh nhân đã được phẫu thuật TTL. Kết quả mô bệnh học cho thấy tỷ lệ UTTL được phát hiện bằng phương pháp sinh thiết là 7,9 %. Trong đó chủ yếu gặp là dạng ung thư biểu mô tuyến biệt hóa cao (95,2%) [18].

Nghiên cứu của Đỗ Khánh Hỷ và Hoàng Thị Phương Liên kết luận giá trị PSA trên lâm sàng không cho phép chẩn đoán xác định UTTL đặc biệt với PSA có giá trị trong vùng xám (4 - 10ng/ml). Ngoài ra cả hai nghiên cứu này cũng chỉ rõ chỉ số PSA không chỉ tăng trong bệnh UTTL, mà còn tăng trong bệnh u phì đại lành tính TTL hay các TTL sau can thiệp...[67],[68].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Phương Ngọc năm 2009 thấy: (1) Có tăng nồng độ PSA trong máu ở cả nhóm bệnh nhân ung thư và bệnh nhân u phì đại lành tính TTL. (2) Có tăng cường biểu lộ gen HIP trong mô UTTL so với mô lành tính với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ). Đồng thời mức độ biểu hiện protein HIP rất rõ ở mô ung thư và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với mô u phì đại lành tính [69].

Về EPCA, duy nhất có một nghiên cứu của Lê Quang Huân đã tách dòng và xác định thành công trình tự nucleotide gen mã hóa kháng nguyên

EPCA từ mẫu bệnh phẩm bệnh nhân UTTTL có độ tương đồng về trình tự amino acid là 95% so với trình tự đã công bố trong Paten 7568042. Đề tài còn xây dựng thành công quy trình biểu hiện và tinh sạch KN EPCA. Lượng KN EPCA thu nhận được đảm bảo cho việc thu nhận KT bằng kỹ thuật phage display.

Nghiên cứu cũng xây dựng được quy trình thu nhận KT scFv đặc hiệu EPCA tái tổ hợp và bước đầu ứng dụng KT này để định lượng KN EPCA trong 3 mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật real-time PCR [70].

Trong điều trị UTTTL ngoài các biện pháp điều trị can thiệp cổ điển. Các bác sĩ Việt Nam cũng đã triển khai điều trị UTTTL và các bệnh TTL bằng phương pháp siêu âm tập trung tăng cường (HIFU). Phương pháp điều trị này được áp dụng tại Việt Nam từ tháng 7/2010. Tuy được khẳng định là gây ít tai biến, nhưng bệnh nhân vẫn có gặp một số biến chứng như rò trực tràng, tiêu không kiểm soát và rối loạn cương.

Công trình nghiên cứu đáng chú ý gần đây là của các nhà khoa học thuộc Học viện Quân Y. Nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc cấy ghép khối UTTTL của người trên chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột Nude) và đánh giá độ tập trung vào khối ung thư TTL của thuốc KT kháng nhân gắn iốt phóng xạ (ANA - <sup>131</sup>I) [71]. Nhóm nghiên cứu còn thử nghiệm tác dụng phân giải tế bào UTTTL trên chuột Nude bằng phức bộ 2 vi rút dạng vắc xin sợi và quai bị. Kết quả cho thấy trị liệu bằng hai vi rút sợi và quai bị có tác dụng hạn chế kích thích khối UTTTL người trên chuột Nude, đồng thời kéo dài thời gian sống ở cả nhóm chuột được trị liệu đơn loại vi rút hoặc kết hợp hai virút so với nhóm chứng [72].

### **1.3. KHÁNG THỂ VÀ CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT**

#### **1.3.1. Kháng thể.**

*Định nghĩa:* Kháng thể có bản chất là protein do tế bào lympho tiết ra để loại bỏ các yếu tố lạ với cơ thể.

### **1.3.1.1. Cấu tạo của kháng thể**

Một kháng nguyên (KN) xâm nhập cơ thể, hệ thống miễn dịch sẽ nhận biết, và được hoạt hoá để loại trừ KN này. Đáp ứng miễn dịch tế bào và đáp ứng miễn dịch dịch thể là hai phương thức đặc hiệu bảo vệ cơ thể. Đối với đáp ứng miễn dịch dịch thể, các kháng thể (KT) là các globulin miễn dịch (Ig) ở dạng hòa tan, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào được thực hiện bởi tế bào lympho T, do các thụ thể của lympho T (T Cell Rereptor ) có cấu trúc tương tự như các Ig nhưng không hòa tan mà gắn cố định trên màng các tế bào lympho T.

Mỗi phân tử KT có cấu trúc gồm một hay nhiều đơn vị cơ bản, mỗi đơn vị có 4 chuỗi polypeptid giống nhau từng đôi một: 2 chuỗi nhẹ và 2 chuỗi nặng nối với nhau bằng các cầu nối disulfua (S-S). Đặc biệt KT có vùng hằng định (C) và vùng biến đổi (V). Cấu trúc vùng biến đổi quy định dòng KT đặc hiệu để nhận biết một loại KN.

*Chuỗi nhẹ:* Ký hiệu *L (light chain)*: gồm 2 loại, chung cho tất cả các lớp globulin miễn dịch. Chuỗi Kappa (ký hiệu K hay *k*); Chuỗi Lamda (ký hiệu  $\lambda$ ).

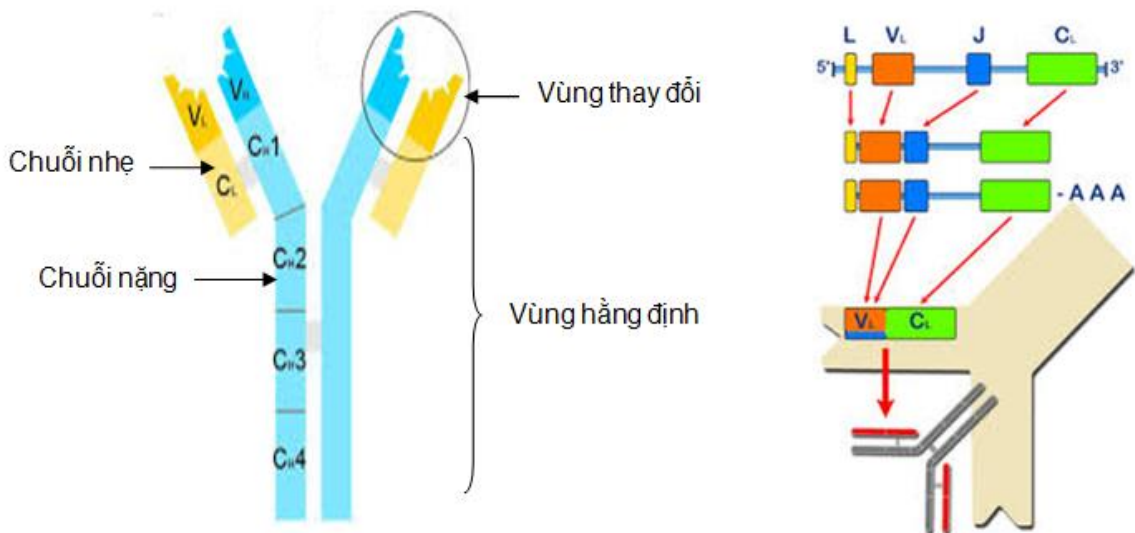
*Chuỗi nặng:* Ký hiệu *H (Heavy chain)*: Được chia thành 5 lớp:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . Các chuỗi nặng có tính đặc hiệu riêng và quyết định globulin miễn dịch thuộc lớp nào. Tương ứng với mỗi lớp chuỗi nặng là một loại globulin miễn dịch, còn chuỗi nhẹ có thể là *k* hoặc  $\lambda$ ; do vậy nếu phối hợp lại ta có các loại globulin ở bảng 1.2.

*Bảng 1.2: Cấu trúc các globulin*

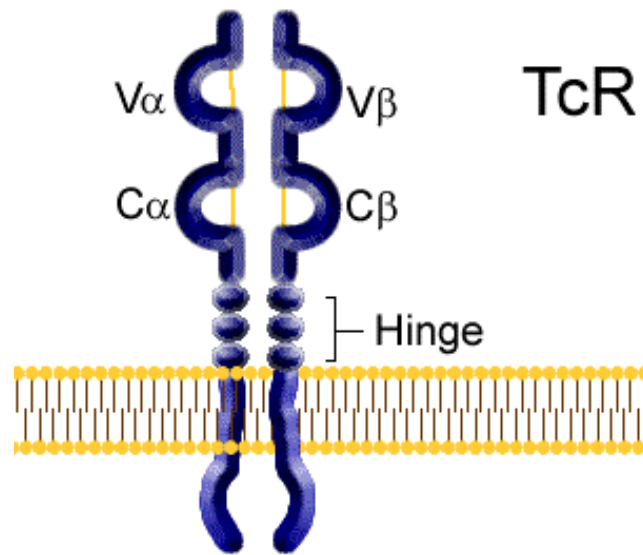
Chuỗi	IgG	IgA	IgE	IgD	IgM
Chuỗi	$\gamma$	$\alpha$	$\epsilon$	$\delta$	$\mu$

nặng					
Cấu tạo Ig	$\gamma_2k_2$ hoặc $\gamma_2\lambda_2$	$\alpha_2k_2$ hoặc $\alpha_2\lambda_2$	$\epsilon_2k_2$ hoặc $\epsilon_2\lambda_2$	$\delta_2k_2$ hoặc $\delta_2\lambda_2$	$(\mu_2k_2)_5$ hoặc $(\mu_2\lambda_2)_5$

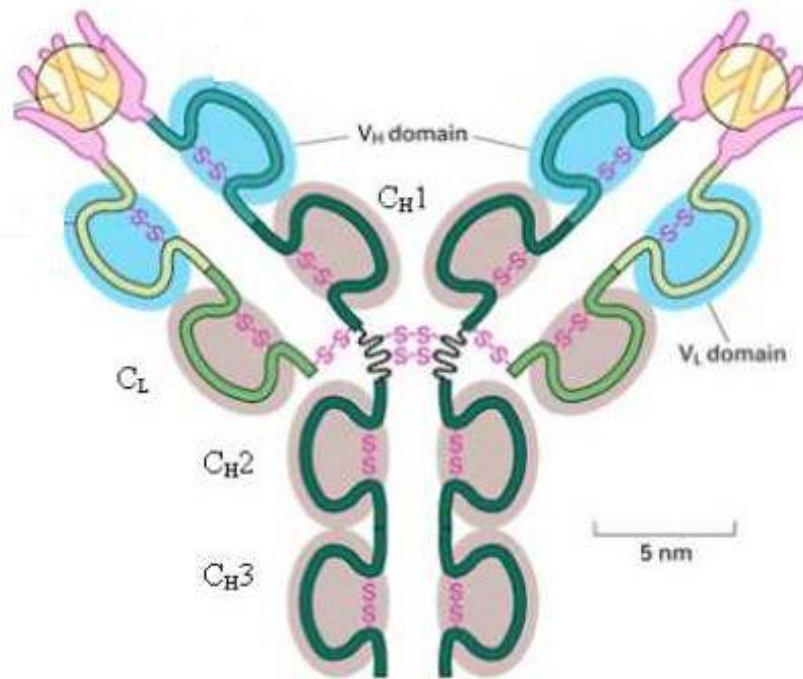
Cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đều gồm 2 phần: Phần hằng định, ký hiệu C (constant) có tận cùng -COOH, có trật tự acid amin tương đối ổn định. Phần thay đổi, ký hiệu V (variable) có tận cùng -NH<sub>2</sub> với trật tự acid amin có một số đoạn cực kỳ thay đổi, chính những vùng cực kỳ thay đổi, tham gia trực tiếp vào việc hình thành vị trí kết hợp KN (paratop).



Hình 1.5: Các phần V và C của một đơn vị Ig  
(Color Atlas of immunology 2013)



Hình 1.6: Cấu trúc của TCR (Color Atlas of immunology 2013)



Hình 1.7: Cầu S-S, các domain và các mảnh phân tử Ig  
(Color Atlas of immunology 2013)

Các mảnh cấu phần của phân tử globulin miễn dịch

Vùng bản lề của phân tử globulin miễn dịch ngoài tính mềm mại, nó còn là vị trí bộc lộ ra ngoài dễ bị tấn công bởi các enzyme tiêu protein. Nếu dùng

papain và pepsin cắt phân tử globulin miễn dịch IgG, kết quả ta sẽ thu được các mảnh khác nhau.

- Với papain: thu được 3 mảnh(hình 1.8)

+ 2 mảnh Fab (antigen binding fragment), gọi thế vì khi bị cắt ra khỏi phân tử kháng thể nó vẫn còn khả năng kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên. Chỉ có một vị trí kết hợp được với KN.

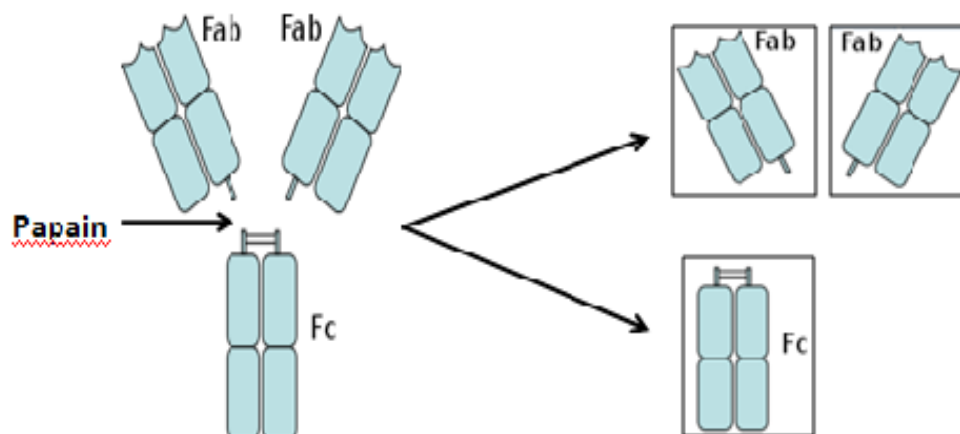
+ 1 mảnh Fc (crystalisable fragment) vì kết tinh được. Mảnh này có trọng lượng phân tử 60.000Da, có khả năng gắn lên bề mặt một số tế bào, giữ vai trò nhất định trong việc hoạt hóa bổ thể và thực bào.

- Với pepsin thu được 2 mảnh(hình 1.9)

+ Mảnh lớn có trọng lượng phân tử 100.000 Da, có hai hóa trị (bivalent) gọi là mảnh  $F(ab')_2$ . Vì có 2 hóa trị cho nên mảnh này có hoạt tính như một KT hoàn toàn, do đó tạo được phản ứng kết tủa (precipitation) và ngưng tụ (agglutination).

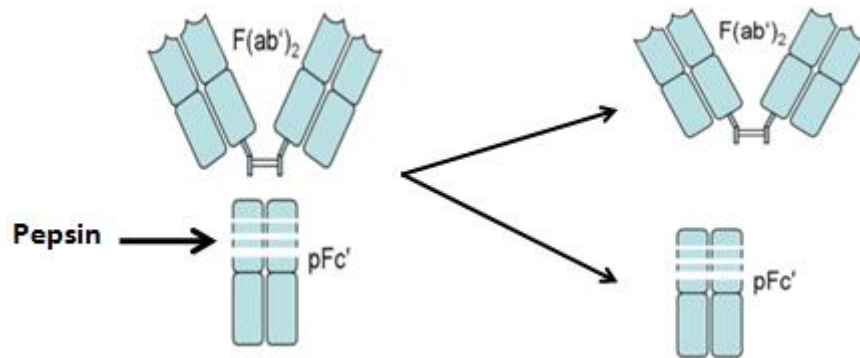
+ Mảnh nhỏ còn lại  $Fc'$  có trọng lượng phân tử khoảng 56.000 Da.

Dựa vào cấu trúc và tính khác biệt KN của mỗi đoạn trong phân tử globulin miễn dịch người ta có thể phân chúng thành các lớp và các dưới lớp (phân lớp)[73].



Hình 1.8: Cắt phân tử IgG với papain thu được: 2 mảnh Fab, 1 mảnh Fc  
(Color Atlas of immunology 2013)





Hình 1.9: Cắt phân tử IgG với pepsin thu được: 1 mảnh  $F(ab)_2$ , 1 mảnh  $Fc'$  (Color Atlas of immunology 2013)

### 1.3.1.2. Chức năng của kháng thể

Vùng V trên Fab có chức năng nhận biết kháng nguyên, kết hợp đặc hiệu với KN, bất hoạt KN. Phần Fc làm nhiệm vụ tương tác với các phân tử, tế bào khác, hoạt hoá cơ chế miễn dịch không đặc hiệu. Qua đó, thực hiện sự kết hợp chặt chẽ miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu.

*Chức năng nhận biết, kết hợp đặc hiệu kháng nguyên: Vai trò của Fab*

Chức năng nhận biết được thực hiện thông qua việc phân tử Ig kết hợp đặc hiệu với epitop KN. Vị trí kết hợp nằm ở vùng V - domain V của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, đầu tận cùng  $-NH_2$ . Phân tử Ig monomer với cấu trúc đối xứng nên có 2 vị trí kết hợp KN hoàn toàn giống nhau. Như vậy, mỗi clon tương bào chỉ sản xuất một loại KT đặc hiệu với một loại epitope KN. Mỗi epitope KN sẽ có một bề mặt phù hợp được tạo ra bởi domain V của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (paratope). Nhờ khả năng kết hợp đặc hiệu mà Ig có thể tác động trực tiếp lên KN:

- Kháng thể bất hoạt các phân tử có hoạt tính: trung hoà độc tố do vi khuẩn tiết ra (như độc tố của vi khuẩn uốn ván, bạch hầu) bằng cơ chế khử hoạt. KT che phủ vị trí hoạt động của phân tử KN bằng sự kết hợp KN-KT khiến nó không tiếp xúc được với thụ thể trên tế bào đích.

- Kháng thể bất hoạt virút: KT làm cho vi rút mất khả năng kết hợp với thụ thể của tế bào đích, do vậy vi rút không xâm nhập được vào nội bào, nhanh chóng chết ở ngoại bào. Trường hợp vi rút đã lọt được vào nội bào sẽ gây xuất hiện những epitop KN trên bề mặt tế bào nhiễm vi rút. Các epitop KN này sẽ bị KT kết hợp. Trường hợp này, KT không trực tiếp diệt vi rút nhưng có tác dụng hấp dẫn đại thực bào, tế bào NK đến tiêu diệt tế bào nhiễm vi rút và các virus bên trong. Đó là cơ chế "gây độc phụ thuộc KT".

- Kháng thể bất hoạt ký sinh vật và ấu trùng: do các cánh Fab của phân tử Ig kết hợp đặc hiệu với những epitope KN của xoắn khuẩn làm chúng mất khả năng di động.

Có thể thấy các globulin miễn dịch với phân Fab kết hợp đặc hiệu KN sẽ gây ra hiện tượng tủa, ngưng kết. Bằng cách gây tủa, ngưng kết, KT có vai trò làm cho KN từ dạng phân tán trở thành tập trung lại, sẽ không di chuyển, xâm nhập, do vậy hạn chế khả năng lan rộng của chúng, đồng thời tạo điều kiện quy tập các biện pháp bảo vệ không đặc hiệu vào nơi KN bị tập trung (viêm, thực bào, độc tế bào, bỏ thể...)[73].

### **1.3.2. Kháng thể đơn dòng.**

*Kháng thể đơn dòng* là một tập hợp các KT có đầy đủ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có cùng một loại paratope vì vậy chỉ kết hợp đặc hiệu với một loại epitope.

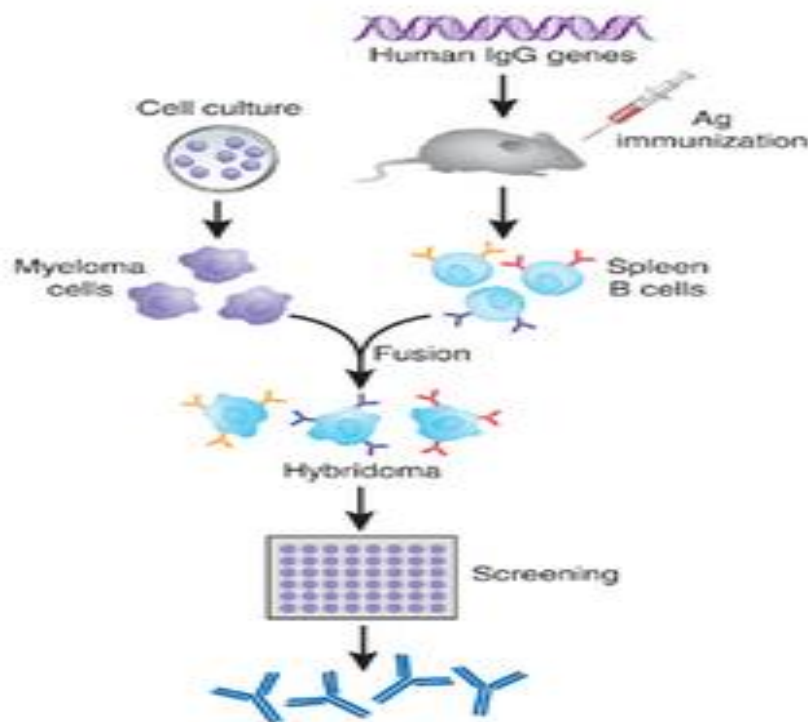
*Kháng thể đơn chuỗi* là một tập hợp các KT không đầy đủ thường chỉ có vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mang cùng một loại paratope vì vậy chỉ kết hợp đặc hiệu với một loại epitope (ví dụ: KT đơn chuỗi ScFV).

Để tạo ra kháng thể đơn dòng hay kháng thể đơn chuỗi người ta có thể sử dụng một trong các phương pháp: (1) Phương pháp gây miễn dịch trên động vật. (2) Phương pháp tạo tế bào lai. (3) Phương pháp DNA tái tổ hợp. (4)

Phương pháp sàng lọc từ các thư viện KT (thư viện các thể thực khuẩn thể Phage display, thư viện kháng thể Aptamer).

### 1.3.2.1. Tạo kháng thể đơn dòng bằng phương pháp tạo tế bào lai.

Phương pháp này được tiến hành dựa trên nguyên tắc của sự kết hợp giữa hai đặc tính: Đó là khả năng phân chia liên tục của tế bào ung thư myeloma và khả năng sinh ra kháng thể của tế bào lympho B đã được miễn dịch KN. Từ đó tạo ra một loại tế bào lai có thể phân bào liên tục trong điều kiện nuôi cấy như tế bào ung thư, đồng thời lại có khả năng sản sinh ra kháng thể. Các loại tế bào hiện nay đang sử dụng đó là tế bào lách của chuột nhắt có các lympho B đã được miễn dịch với một kháng nguyên nhất định đem lai với tế bào ung thư của tủy xương (myeloma). Tạo ra tế bào lai hybridoma. Hybridoma được đem nuôi cấy, sẽ phân chia liên tục, và sản sinh ra một lượng lớn kháng thể. Kháng thể này đặc hiệu cho KN đã gây miễn dịch và có khả năng tồn tại lâu dài sau nhiều lần phân chia [74].



*Hình 1.10: Sơ đồ tạo kháng thể bằng phương pháp tạo tế bào lai*

*(Nature Biotechnology 25, 1421 - 1434, 7 December 2007)*

Tuy nhiên KT đơn dòng được tạo ra theo phương pháp này có một nhược điểm là cấu trúc KT hoàn toàn từ chuột. Vì vậy, khi sử dụng cho người có hiện tượng kích thích cơ thể sinh KT kháng lại phần cấu trúc có nguồn gốc chuột. Dẫn đến phần lớn các KT dạng này đều không thành công khi ứng dụng thử nghiệm lâm sàng. Vì vậy KT dạng này đã không còn được thực hiện vào năm 2003.

### **1.3.2.2. Tạo kháng thể bằng gây miễn dịch trên động vật.**

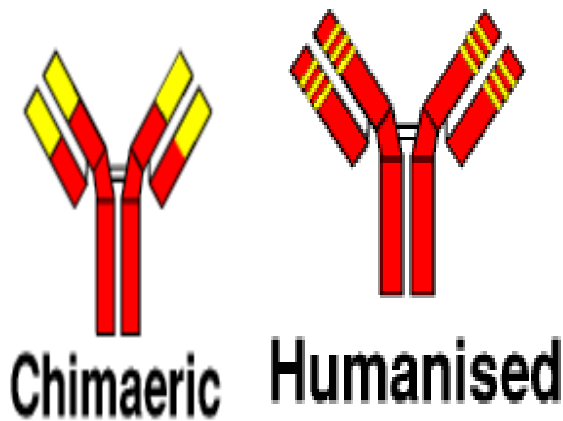
(Trình bày ở phần Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu)

### **1.3.2.3. Tạo kháng thể đơn dòng bằng tái tổ hợp DNA**

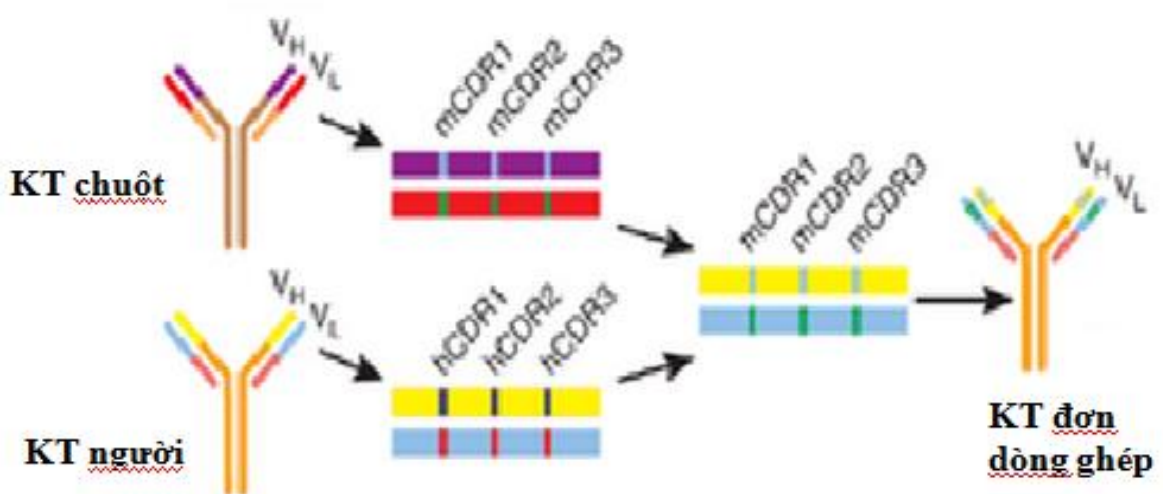
Các kỹ thuật tái tổ hợp DNA được hình thành trên cơ sở các thành tựu về công nghệ sinh học và tin học. Các nhà công nghệ sinh học sử dụng phương pháp này để phân lập và khuếch đại một gen đơn từ bộ gen của một sinh vật để có thể nghiên cứu, biến đổi và chuyển đoạn gen đó vào trong một cơ thể sinh vật khác rồi từ đó chủ động sản xuất ra một số lượng lớn các gen xác định mong muốn. Do đó công nghệ DNA tái tổ hợp có ứng dụng rộng rãi không chỉ trong y học, mà còn trong các ngành khác[75].

Kháng thể tái tổ hợp là một ứng dụng của công nghệ DNA tái tổ hợp trong y học. Trong đó các nhà khoa học đem kết hợp các gen KT từ các nguồn tế bào lymphoB khác nhau để tạo ra tổ hợp gen mã hóa cho KT đơn dòng đặc hiệu với một epitope KN. Phương pháp này giúp tạo ra hai loại KT khác nhau đó là: KT đơn dòng ghép (Chimeric monoclonal antibody) và KT đơn dòng nhân tính hóa (Humanized monoclonal antibody). Cả hai loại KT này đều được tạo ra bằng cách dùng các KT của chuột đã được tạo ra từ các tế bào lai (Hybridoma) rồi cho tổ hợp lại với KT người để tạo ra KT đơn dòng trong đó mang khoảng 60-80% KT của người. Nếu loại KT có vùng biến đổi có nguồn

gốc của chuột còn vùng hằng định là của người thì đó là loại KT đơn dòng ghép (Chimeric monoclonal antibody). Còn loại KT chỉ có vùng quyết định KN là của chuột, toàn bộ các phần khác của KT đều là của người thì đó là loại KT đơn dòng nhân tính hóa (Humanized monoclonal antibody) [76].



Hình 1.11. Hai loại kháng thể đơn dòng: Chimaeric là kháng thể có vùng biến đổi (màu vàng) có nguồn gốc của chuột còn vùng hằng định (màu đỏ) là của người. Humanized là kháng thể chỉ có vùng quyết định kháng nguyên (màu vàng) là của chuột, toàn bộ các phần khác của KT đều là của người.



Hình 1.12: Sơ đồ tạo kháng thể đơn dòng ghép (Chimeric monoclonal antibody)

#### ***1.3.2.4. Tạo kháng thể đơn chuỗi bằng sàng lọc từ các thư viện kháng thể***

##### ***❖ Tạo KT đơn chuỗi hoàn toàn người bằng kỹ thuật phage display***

Tạo KT đơn chuỗi hoàn toàn người bằng kỹ thuật phage display là một phương pháp dựa trên các tổ hợp kháng thể có sẵn (thư viện KT) để chọn ra KT (phage scFV) đặc hiệu nhất với KN đích. Tiếp theo các phage KT này được chuyển vào trong một cơ thể sinh vật khác rồi từ đó chủ động sản xuất ra một số lượng lớn các gen và KT xác định mong muốn.

Quy trình tạo KT đơn chuỗi hoàn toàn người bằng kỹ thuật phage display có thể chia thành 3 giai đoạn: (1) Tách dòng gen mã hóa KN từ mẫu bệnh phẩm. (2) Biểu hiện và thu nhận KN. (3) Thu nhận KT đặc hiệu KN (Tạo KT tái tổ hợp).

##### ***❖ Kháng thể Aptamer***

Ngày nay công nghệ sinh học có thể tạo được những phân tử (thường được biết là aptamer, antisense RNAi) có khả năng gắn rất cao đối với thụ thể (receptor) của những tế bào ung thư và có thể dễ dàng tiêu diệt các tế bào này ở điều kiện phòng thí nghiệm [77]. Aptamer là các phân tử acid nucleic chuỗi đơn vì vậy có thể là RNA aptamer hoặc DNA aptamer có khả năng gắn đặc hiệu với tế bào hay phân tử đích theo nguyên tắc bổ sung. Người ta có thể tạo ra kháng thể Aptamer bằng phương pháp sàng lọc phân tử đích với thư viện kháng thể Aptamer [78].

Quy trình tạo sàng lọc KT aptamer gồm có: (1) Nhân nuôi làm giàu thư viện KT. (2) Gắn phân tử đích hay KN lên cột tinh sạch. (3) Cho thư viện KT đi qua cột nhiều lần để KT kết hợp KN. Sau nhiều vòng rửa trôi chỉ còn lại các Aptamer có trình tự phù hợp nhất với KN hay phân tử đích được giữ lại trên cột tinh sạch cùng KN. (4) Dùng dung dịch thổi cột làm bong aptamer ra khỏi phân tử đích và cột. (5) Tách dòng gen aptamer. (6) Kiểm tra bằng giải trình tự gen. (7) Tăng sinh gen KT aptamer [77],[78].

## 1.4.CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

### 1.4.1. Kỹ thuật tái tổ hợp DNA[79],[80]

Công nghệ protein là một hướng nghiên cứu quan trọng của công nghệ sinh học với tiềm năng ứng dụng rất lớn trên cơ sở công nghệ DNA tái tổ hợp. Nhờ công nghệ protein có thể tạo ra protein nguyên thể, protein đã được sửa đổi hoặc protein mới thông qua sự sản xuất của vi khuẩn *E.coli* ...

Công nghệ protein là quá trình xây dựng các phân tử protein mới, bằng cách thiết kế một phân tử protein dựa trên các nguyên lý cơ bản.

Các bước chính của công nghệ protein:

1. *Nhận dạng trình tự:* Hiện nay, nhận dạng trình tự bằng phân tích trình tự gen hoặc protein là một quá trình không khó khăn. Các cơ sở dữ liệu lớn hiện có nhiều ngàn trình tự khác nhau. Hơn nữa, các dự án phân tích trình tự genome đang cung cấp các trình tự mới và các khung đọc mở với số lượng tăng lên liên tục.

2. *Xác định cấu trúc và mô hình hóa:* Các thông số về cấu trúc có thể được xác định bằng tia X, tinh thể học điện tử (electron crystallography) hoặc kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance-NMR) với độ phân giải cao là điểm cốt lõi của sự hiểu biết về hóa sinh protein.

3. *Biến đổi trình tự:* Biến đổi một protein đang tồn tại bằng cách sửa đổi trình tự gen là một công việc khá phổ biến và ít khó khăn nhất của quá trình công nghệ. Từ đầu 1980, các phương pháp biến đổi trực tiếp protein bằng phát sinh đột biến điểm định hướng oligonucleotide (oligonucleotide-directed site mutagenesis) theo phương thức tổng hợp gen hoàn chỉnh từ các oligonucleotide primer hoặc dùng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) đã trở nên thông dụng. Nhiều trình tự cũng có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp protein theo phương pháp hóa học trong điều kiện *in vitro*, phương thức này cho phép hợp nhất các amino acid không được mã hóa trong chuỗi protein.

Có hai phương pháp cơ bản để sửa đổi một trình tự mã hóa đang tồn tại của protein ở mức độ DNA. Cả hai phương pháp đều đòi hỏi gắn một hoặc nhiều oligonucleotide (ít nhất là tạm thời) trên DNA sợi đơn (single strand DNA, ssDNA), sau đó hoạt tính DNA polymerase *in vitro* sẽ xúc tác để mở rộng các oligonucleotide này. Hai phương pháp đó là:

- Phương pháp biến đổi trình tự không dùng PCR. Ở các phương pháp này trình tự DNA được biến đổi liên kết với gốc tái bản (ví dụ plasmid, bacteriophage hoặc phagemid), cho phép khuếch đại *in vivo* kiểu gen bố mẹ hoặc kiểu gen đã được sửa đổi. Một oligonucleotide tổng hợp mang đột biến cần thiết được gắn với khuôn mẫu ssDNA mạch vòng (ví dụ: genome của phage có ssDNA như M13, hoặc  $\Phi$ X174 hoặc dạng ssDNA của phagemid), hoặc với một khuôn mẫu dsDNA đã được sợi đơn hóa từng phần. Các oligonucleotide sau gắn vào ssDNA sẽ hoạt động như một primer cho sự tổng hợp *in vitro* DNA bằng cách dùng enzyme DNA polymerase (thường là DNA polymerase T4 hoặc T7), cùng với enzyme DNA ligase, các phân tử DNA sợi đôi (dsDNA) mạch vòng đóng sẽ được tạo ra. DNA sợi đôi được đưa vào trong các tế bào vật chủ thích hợp để tái bản và phân chia. Sau đó, sự biến đổi mong muốn được xác định bằng một trong số phương thức sàng lọc hoặc chọn lọc.

- Phương pháp biến đổi dựa trên PCR. Đây là phương pháp được ứng dụng rộng rãi để tái sắp xếp nhanh các vùng protein nơi mà các vị trí cắt hạn chế phổ biến không có sẵn. Phương pháp này thực hiện sự biến đổi mong muốn và khuếch đại *in vitro* bằng cách ủ DNA đích được biến tính với một oligonucleotide mang đột biến cần thiết để có thể hoạt động như một primer cho sự tái bản sợi DNA bổ sung. Có nhiều cách thức khác nhau để thực hiện sự biến đổi này tuy nhiên những điểm cần lưu ý chung đó là cách thiết kế các trình tự oligonucleotide, điều kiện phản ứng, lựa chọn chính xác DNA



polymerase ổn nhiệt là các tiêu chuẩn phải được xem xét cẩn thận. Các phương thức này cho phép tiến hành sự biến đổi rất nhanh và hiệu quả rất cao.

4. *Phát triển phân tử*: Trong nhiều trường hợp sự biến đổi có định hướng của một trình tự không phải là phương thức thích hợp để thu được kết quả mong muốn, bởi không xác định được các acid amin đích nằm ở đâu và biến đổi chúng thành cái gì. Vì thế, một số phương thức khác đã được phát triển để sản xuất và thử nghiệm các thư viện lớn hoặc các tập hợp biến thể của một trình tự đặc biệt. Các phương thức này thường dựa vào ba đặc điểm chính: Thứ nhất, đó là acid nucleic mã hóa cho trình tự protein quan tâm duy trì liên kết vật lý với protein. Thứ hai, tạo ra một số lượng lớn các biến thể bằng cách đưa các đoạn oligonucleotide thoái biến vào trong trình tự mã hóa theo phương thức chèn đoạn hoặc dùng kỹ thuật PCR, hoặc bằng phương thức phát sinh đột biến *in vitro*. Tuy nhiên, với các phương thức này mỗi lần chỉ có một đoạn nhỏ protein được sửa đổi. Thứ ba, phương thức sàng lọc hoặc chọn lọc từ thư viện các trình tự protein mới có kiểu hình quan tâm. Phương thức sàng lọc bao gồm việc gắn với một phối tử và các protein xuất hiện được giữ lại trên một giá thể rắn.

5. *Thiết kế trình tự de novo*: Thiết kế *de novo* protein là một công việc rất phức tạp. Về nguyên tắc, đối với một protein bất kỳ có (n) gốc acid amin thì khả năng sẽ có  $2 \times 10^n$  trình tự khác nhau. Các cơ sở dữ liệu về cấu trúc và trình tự protein cho thấy ở nhiều trình tự có sự cuộn xoắn có thể được điều chỉnh tương tự nhau và như vậy chúng có thể thực hiện các chức năng như nhau. Vì thế, phương pháp tiếp cận ngược lại tức là chọn cấu trúc cuộn xoắn thích hợp trước sau đó xác định trình tự nào cần thiết để tạo ra sự cuộn xoắn và chức năng mong muốn là cách tiếp cận thích hợp. Dahiya và Mayo (1997) đã mô tả các phương pháp máy tính để thiết kế các trình tự của vùng peptide từ đó xây dựng các protein.

6. *Biểu hiện*: Khi một trình tự mới được xác định, sản phẩm của trình tự là protein và việc chứng minh chức năng của các protein sẽ cho phép đánh giá vai trò của trình tự mới. Việc tạo các protein sản phẩm theo các trình tự đã biết chính là bước biểu hiện của công nghệ protein. Biểu hiện các protein tái tổ hợp là một công việc vô cùng phức tạp và cần các hệ thống biểu hiện vật chủ ở phạm vi từ vi khuẩn (*E.coli* được sử dụng phổ biến nhất), tới nấm men, tới các tế bào côn trùng, các tế bào động vật có vú nuôi cấy và động-thực vật chuyển gen. Quy mô biểu hiện và tinh sạch protein cũng thay đổi khác nhau tùy mục đích sử dụng. Ở các giai đoạn đầu của quá trình phát triển một protein mới (ví dụ một phân tử protein được nhận dạng trong một thư viện biểu hiện), chỉ một lượng nhỏ ( $\mu\text{g}$ ) của protein là đủ để xác nhận một đặc tính sinh học. Nhưng ở giai đoạn hậu là giai đoạn thu thập các thông tin về cấu trúc đặc trưng, cần thực hiện thêm một số thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Nên số lượng nguyên liệu tinh sạch cần lớn hơn (từ 10 đến 100 mg thậm chí đến vài kg). Vì vậy, người ta thường phải thử nghiệm một số phương pháp khác nhau để tìm kiếm vật chủ biểu hiện thích hợp.

7. *Phân tích*: Có nhiều phương pháp khác nhau để phân tích đặc điểm của các protein, các tính chất sinh học thích hợp để có thể phát triển sản xuất protein mới từ một lượng rất nhỏ của nguyên liệu ban đầu. Tuy nhiên, thông tin cấu trúc chi tiết của sản phẩm protein cuối cùng vẫn còn là bước hạn chế trong thiết kế và triển khai công nghệ protein thích hợp.

#### 8. *Quá trình tách chiết và tinh sạch protein*

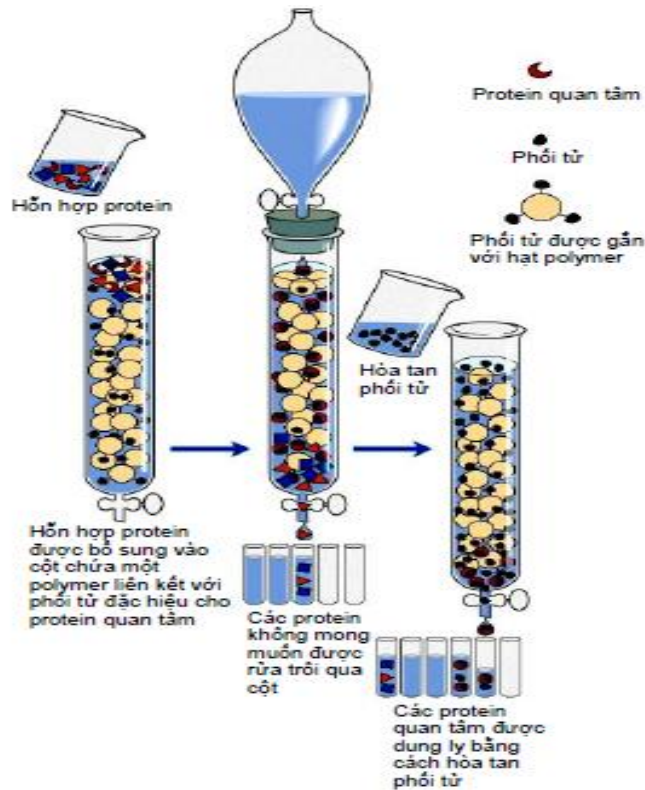
Nhiều năm qua, việc gia tăng sử dụng vi sinh vật như là một nguồn cung cấp protein, đặc biệt là các enzyme, đã cải thiện đáng kể hiệu quả qui trình sản xuất và chất lượng sản phẩm. Phần lớn enzyme sử dụng trong công nghiệp là các protein ngoại bào từ các cơ thể như *Aspergillus* sp. và *Bacillus* sp, bao gồm: amylase, glucanase, cellulase, dextranase, protease và

glucoamylase. Nhiều loại trong số này vẫn còn được sản xuất từ các chủng gốc tự nhiên của vi sinh vật. Tuy nhiên, protein để sử dụng ở các lĩnh vực chẩn đoán lâm sàng và ứng dụng trị liệu đòi hỏi công nghệ protein và công nghệ DNA tái tổ hợp ở mức độ cao. Công nghệ DNA tái tổ hợp cho phép chuyển các vật liệu di truyền vốn chỉ có một lượng nhỏ từ mô động vật vào vi khuẩn vật chủ. Công nghệ này cho phép tận dụng sự sinh trưởng gần như vô hạn của vật chủ để sản xuất một lượng lớn protein quan tâm. Sự thu hồi và tinh sạch các protein cũng quan trọng như các giai đoạn sản xuất xét theo góc độ kinh tế của quá trình sản xuất. Thách thức chính trong các bước thu hồi là giảm thiểu sự mất hoạt tính của protein. Với các protein ngoại bào việc thu hồi và tinh sạch tương đối dễ dàng. Với các protein nội bào: qui trình thu hồi và tinh sạch phức tạp hơn vì cần phá vỡ các mô, tế bào để giải phóng protein trước khi thực hiện thu hồi và tinh sạch như với protein ngoại bào. Có ba phương pháp chính để giải phóng các protein nội bào khỏi vi sinh vật đó là phương pháp enzyme, hóa học và vật lý.

*Tinh sạch sơ bộ:* tinh sạch protein là một bước rất cần thiết, tuy nhiên thường chỉ thực hiện đối với những protein có giá trị ứng dụng cao. Bước đầu tiên trong quá trình tinh sạch protein nội bào là loại bỏ các mảnh vỡ tế bào. Bước này thường được tiến hành bằng phương pháp ly tâm hoặc lọc hoặc phân tách hai pha nước hay chất lỏng-chất lỏng. Các protein và mảnh vỡ tế bào có khả năng hòa tan khác nhau giữa hai pha, vì thế kỹ thuật này có thể được dùng cho cả hai trường hợp: phân tách protein khỏi mảnh vỡ tế bào và phân chia (partitioning) protein trong suốt quá trình tinh sạch. Phương pháp kết tủa cũng là một cách đơn giản giúp loại bỏ protease, tạo ra kết tủa chọn lọc và loại bỏ các protein không mong muốn.

Tinh sạch bằng sắc ký là kỹ thuật phân tách và điều chế cho phép tách biệt các hợp phần khác nhau của một hỗn hợp. Phép phân tách bằng sắc ký

dựa vào sự di chuyển khác nhau trong một pha động của các chất hòa tan đã được gắn trên một pha tĩnh ở trạng thái rắn. Người ta thường chọn các chất có khả năng gắn kết được với các chất (hòa tan) định phân tách làm pha tĩnh. Tương tác giữa chất hòa tan và pha tĩnh có thể là tương tác hấp phụ, tương tác ion (trao đổi ion), tương tác kỵ nước, tương tác kiểu rây phân tử hoặc tương tác đặc hiệu sinh học. Tinh sạch protein bằng phương pháp sắc ký là một thực hành chuẩn ở phòng thí nghiệm cho phép tinh sạch các sản phẩm có thể tích nhỏ và giá trị cao. Sắc ký tinh sạch một protein từ hỗn hợp phức tạp của các protein đạt tới sự tinh sạch cuối cùng trên 95%.



Hình 1.13: Sơ đồ phương pháp sắc ký ái lực

*Thiết kế các protein để tinh sạch:* Công nghệ DNA tái tổ hợp có một ảnh hưởng quan trọng lên sự tinh sạch protein. Bằng cách dung hợp một gen quan tâm với một trình tự promoter hiệu quả, thì một protein ngoại lai có thể được biểu hiện trong cơ thể vật chủ từ 10 tới 40% protein tổng số hòa tan của tế

bào. Vì vậy, quá trình tinh sạch tiếp theo của protein được đơn giản hóa. Các protein được biểu hiện ở dạng hòa tan, các kỹ thuật di truyền có thể được dùng để hướng tới việc protein được tổng hợp mới trong gian bào, hoặc thậm chí trong môi trường nuôi cấy và sự tinh sạch đơn giản. Đuôi ái lực histon được thiết kế xuất hiện ở protein với mục đích giúp cho sự tinh sạch protein hoặc enzyme hiệu quả theo nguyên tắc trao đổi ion của phân tử  $\text{Ni}^{+}$ . Khó khăn chủ yếu ở các dung hợp ái lực để tinh sạch protein là phải loại bỏ thành công đuôi ái lực và các tác nhân được sử dụng. Vấn đề này có thể được giải quyết bằng sự cắt bỏ các liên kết acid không bền ở chỗ nối của protein tái tổ hợp và đuôi ái lực [79],[80].

Sử dụng công nghệ di truyền tái tổ hợp DNA trong công nghệ protein đã được ứng dụng hơn 10 năm qua và có một hiệu quả rất lớn trong sản xuất protein vi sinh vật. Ứng dụng công nghệ protein được sử dụng trong rất nhiều lĩnh vực: sản xuất tá dược vắc xin, kháng thể...

#### **1.4.2. Kỹ thuật tạo kháng thể bằng gây miễn dịch trên động vật [81]**

Điều chế kháng huyết thanh bằng gây miễn dịch trên động vật là một trong những phương pháp tạo kháng thể đã được sử dụng từ lâu và ngày càng được hoàn thiện bên cạnh sự ra đời của nhiều kỹ thuật tạo kháng thể hiện đại. Kết quả tạo kháng huyết thanh bằng gây miễn dịch phụ thuộc một số yếu tố: (1) Chất lượng kháng nguyên, (2) Liều lượng kháng nguyên, (3) Cách tiêm, (4) Khoảng cách giữa các lần tiêm. (5) Thời gian thu kháng thể. Để đánh giá một mô hình gây miễn dịch tốt người ta dựa vào thời gian thu được kháng thể, hiệu giá và độ tinh khiết của kháng thể.

##### **1.4.2.1. Chất lượng kháng nguyên**

Tính KN của một chất phụ thuộc vào cấu trúc, trọng lượng, phân tử, tính lạ và khả năng chuyển hóa của chất đó trong cơ thể. Tính KN còn phụ

thuộc cấu trúc của KN gồm nhiều protein hay chỉ một protein tinh khiết. Độ tinh khiết của KN quyết định độ tinh khiết của kháng huyết thanh.

#### ***1.4.2.2. Đường tiêm của kháng nguyên***

Khi gây miễn dịch trên động vật, tùy theo loại động vật thí nghiệm mà người ta chọn các đường tiêm khác nhau như tiêm trong da, dưới da, tiêm tĩnh mạch hay tiêm phối hợp màng bụng và gan bàn chân. Mỗi cách tiêm đều có hiệu quả khác nhau. Tiêm bắp, tiêm dưới da có tác dụng tốt với các hạch địa phương.

#### ***1.4.2.3. Liều lượng của kháng nguyên, thời gian giữa các lần tiêm.***

Tùy thuộc KN và yêu cầu điều chế kháng huyết thanh mà lựa chọn tiến hành gây miễn dịch với các dung dịch và thời gian tiêm khác nhau. Dung dịch gây miễn dịch có 3 loại: (1) dung dịch kháng nguyên đơn thuần, (2) kháng nguyên cùng tá chất Freund, (3) Dung dịch phối hợp của cả (1) và (2).

Phương pháp điều chế kháng huyết thanh bằng KN đơn thuần hiện nay ít sử dụng.

Phương pháp thường sử dụng hiện nay là gây miễn dịch bằng dung dịch hỗn hợp KN với tá chất vì kết quả cho hiệu giá KT cao hơn so với phương pháp dùng KN đơn thuần.

#### ***Gây miễn dịch bằng dung dịch hỗn hợp kháng nguyên với tá chất***

Tá chất được sử dụng với KN có thể là: Alumin hydroxit, Kali alumin sulfat hoặc tá chất Freund.

Gây miễn dịch bằng hỗn hợp KN-tá chất Freund là phương pháp được ứng dụng rộng rãi do hỗn hợp này mang lại đáp ứng miễn dịch tốt, tạo được lượng KT nhiều. Có 2 loại Freund được bán trên thị trường đó là Freund hoàn toàn và Freund không hoàn toàn. Freund hoàn toàn gồm dung dịch nhũ hoá trong dầu khoáng và một loại vi khuẩn bất hoạt đông khô (thường là vi khuẩn lao), còn Freund không hoàn toàn thiếu các thành phần vi khuẩn đông khô, chỉ có nước và nhũ tương dầu.

➤ *Các bước tiến hành điều chế kháng huyết thanh:*

- Điều chế hỗn hợp KN-tá chất Freund: Dung dịch này chỉ được điều chế trước khi tiêm bằng cách trộn tá chất Freund hoàn toàn (hoặc không hoàn toàn) với KN. Trộn kĩ 2 chất thành hỗn dịch trắng đục như sữa, có độ keo đặc tốt (kiểm tra bằng nhỏ một giọt hỗn dịch vào nước mà giọt đó không tan)

- Gây miễn dịch cho thỏ bằng phác đồ 4 mũi tiêm. Liều lượng cho mỗi lần tiêm là 2ml hỗn dịch. Đường tiêm: là dưới da hoặc tiêm bắp. Thời gian tiêm: mỗi mũi cách nhau một tuần.

Huyết thanh thỏ sẽ xuất hiện KT tăng cao kéo dài trong quá trình gây miễn dịch và duy trì 2 đến 4 tháng sau. Có thể kiểm tra hiệu giá KT trong huyết thanh thỏ từ ngày thứ 7 sau mũi tiêm 3. Thời điểm thu nhận KT toàn bộ có thể vào ngày thứ 15 đến 20 sau mũi tiêm cuối.

### **1.4.3. Kỹ thuật phân lập albumine từ huyết thanh [82].**

Tủa là phương pháp thường được sử dụng để tinh sạch, thu nhận các phân tử sinh học nhất là protein. Để tủa protein, người ta có thể dùng nhiều cách khác nhau: tủa bằng muối, tủa bằng các dung môi hữu cơ hoặc thay đổi pH của dung dịch có chứa protein.

#### *Tủa bằng muối*

Dùng muối là cách phổ biến để tủa protein. Khả năng hòa tan của protein tùy thuộc vào nhiều yếu tố như: đặc tính lý hóa tự nhiên của protein, pH, nhiệt độ, nồng độ của muối... Ở nồng độ muối thấp, tính tan của protein tăng nhẹ. Tuy nhiên, ở nồng độ muối cao, tính tan của protein giảm mạnh. Tính tan của protein trong môi trường muối nồng độ cao được giải thích bởi Kirkwood. Sự gia tăng lượng ion muối trong dung dịch làm giảm tính hòa tan của protein dẫn đến sự tủa.

Ở nồng độ muối cao, độ hòa tan tuân theo công thức của Cohn:  $\log S = B - KI$  (S: độ hòa tan của protein, B: hằng số (tùy thuộc vào chức năng của

protein, pH và nhiệt độ), K: hằng số tan (tùy thuộc vào pH, hỗn hợp và lượng muối có trong dung dịch), I: cường độ ion của muối). Vì vậy, khi muốn tách một protein từ một hỗn hợp nhiều protein, người ta có thể lựa chọn nồng độ muối sao cho phù hợp nhất với protein mục tiêu. Hiệu quả của protein của các anion muối khác nhau thì khác nhau. Hiệu quả của muối được xếp theo thứ tự giảm dần như sau: citrate > phosphate > sulphate > acetate/chloride > nitrate > thiocyanate.

#### *Tủa protein bằng các dung môi hữu cơ*

Khi thêm dung môi hữu cơ vào môi trường, hằng số điện môi của môi trường giảm xuống. Công thức biểu diễn mối quan hệ giữa độ hòa tan và hằng số điện môi:  $\ln (S/S_w) = (A/RT) (1/D_w - 1/D)$ . Trong đó S: độ hòa tan của protein trong dung môi hữu cơ,  $S_w$ : độ hòa tan của protein trong nước, D: hằng số điện môi của môi trường sau khi đã bổ sung dung môi hữu cơ,  $D_w$ : hằng số điện môi của nước, R: hằng số khí, T: nhiệt độ tuyệt đối, A: hằng số khí.

Công thức trên cho thấy: khi thêm dung môi hữu cơ vào môi trường, hằng số điện môi tăng lên, khả năng hòa tan của protein giảm, vì thế tạo sự kết tủa. Tuy nhiên, các dung môi hữu cơ lại có ái lực với các bề mặt kỵ nước của phân tử protein. Kết quả là chúng làm biến tính protein trong suốt quá trình tủa. Do đó, khi tủa, chỉ nên sử dụng các dung môi hữu cơ ở nồng độ thấp (ngoại trừ: 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD), dimethyl Sulfoxide (DMSO) và Ethanol có thể sử dụng nồng độ cao).

Từ các nguyên tắc trên Rodkey đã đưa ra một phương pháp tủa protein cải tiến. Phương pháp này là sự kết hợp của cả phân tử muối nồng độ thấp (Trichloroacetate acid 2%) và dung môi hữu cơ (Ethanol 84,5%) nhằm làm tủa tối đa các phân tử albumine trên bề mặt và thu nhận globuline trong dịch lắng (Quy trình kỹ thuật được trình bày trong phần phương pháp nghiên cứu)[82].

#### **1.4.4 Kỹ thuật ELISA**



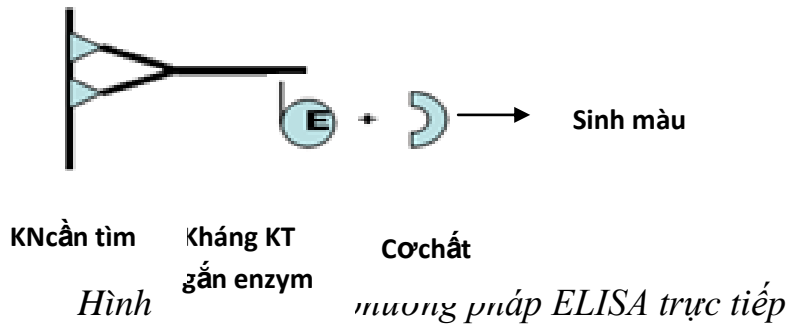
ELISA là kỹ thuật chẩn đoán dựa trên nguyên lý miễn dịch học rất phổ biến trong rất nhiều lĩnh vực, từ y học, y dược, thú y, sinh học, kiểm định thực phẩm, môi trường v.v... ELISA phổ biến rộng rãi do dễ thực hiện, tốc độ nhanh, chi phí thấp, dễ sản xuất, an toàn với độ nhạy và độ đặc hiệu chấp nhận được. Tiền thân của ELISA là kỹ thuật miễn dịch học phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), được phát triển bởi Rosalyn Sussman Yalow và Solomon Aaron Berson công bố lần đầu tiên năm 1960 và được giải Nobel y học năm 1977. Năm 1971, hai nhóm nghiên cứu Peter Perlmann và Eva Engvall cùng với Anton Schuurs và Bauke van Weemen đã độc lập công bố các bài báo về qui trình kỹ thuật ELISA đang sử dụng hiện nay.

ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) là kỹ thuật hấp phụ miễn dịch gắn enzym dựa vào tính hấp phụ tự nhiên của protein trên một số chất như polystyren. Các KN hoặc KT được gắn lên polystyren, sau đó cho ủ với KT hoặc KN đặc hiệu tương ứng để tạo nên phản ứng kết hợp KN-KT. Cuối cùng cho gắn với KT hoặc KN đã biết trước đã gắn với enzyme. Enzyme sẽ phân hủy cơ chất không màu thành một sản phẩm có màu đặc trưng. Mật độ màu được nhận định sơ bộ bằng mắt thường hoặc được đọc chính xác bằng quang phổ kế.

Dựa trên nguyên lý của các phản ứng kết hợp KN-KT. Nếu muốn tìm KN trong hỗn dịch thì phải có KT đặc hiệu với KN đó đã biết hoặc ngược lại.

#### ***1.4.4.1. Kỹ thuật ELISA trực tiếp***

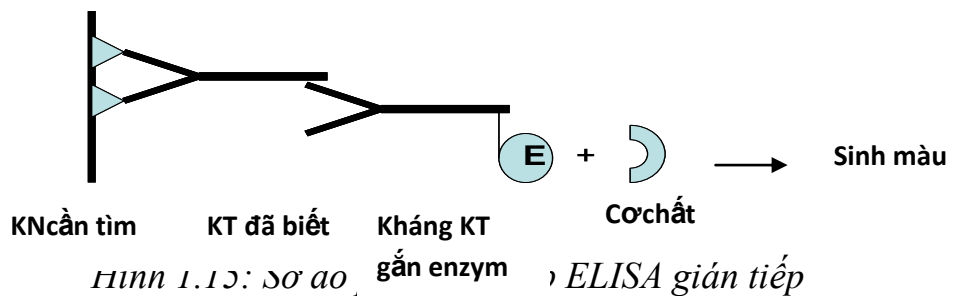
ELISA trực tiếp ít được sử dụng trong ELISA định lượng mà thường được sử dụng cho ELISA định tính. Yếu tố cần chẩn đoán (ví dụ như KN) được cố định trực tiếp lên một bề mặt rắn sau đó được xác định sự hiện diện bằng yếu tố phát hiện. Nguyên lý của kỹ thuật được mô tả ở sơ đồ hình 1.14:



Phương pháp này có ưu điểm là chỉ cần một lần ủ do đó tiết kiệm thời gian và giảm thiểu được việc kiểm soát các điều kiện trong quá trình thực hiện. Tuy nhiên, nhược điểm là nhuộm màu nền cao, cần nhiều loại KT để sử dụng cho mỗi KN cần xác định nên tốn kém.

**1.4.4.2. Kỹ thuật ELISA gián tiếp**

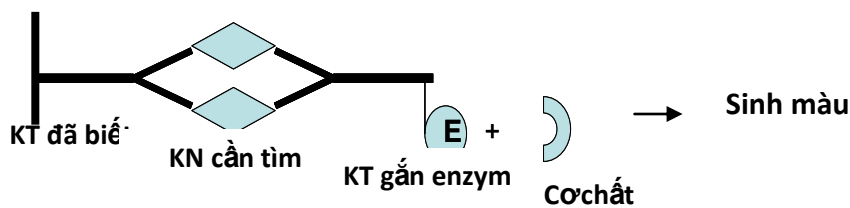
Kỹ thuật ELISA gián tiếp được tiến hành tương tự như ELISA trực tiếp. Yếu tố cần chẩn đoán (ví dụ như KN) được cố định trực tiếp lên một bề mặt rắn sau đó được ủ với KT đặc hiệu và được xác định sự hiện diện của phức hợp KN-KT bằng yếu tố phát hiện là KT gắn enzyme. Nguyên lý của kỹ thuật được mô tả ở sơ đồ hình 1.15.



Ưu điểm của phương pháp này là chỉ cần tạo một loại kháng thể mang enzyme để nhận biết cho nhiều KN khác nhau. Tuy nhiên nhược điểm của ELISA gián tiếp là tăng số bước thực hiện do đó làm tăng việc kiểm soát các điều kiện quá trình và kéo dài thời gian chẩn đoán. Đồng thời phương pháp này cũng có giới hạn phát hiện thấp hơn khoảng 10 lần so với ELISA trực tiếp.

**1.4.4.3. Kỹ thuật ELISA sandwich**

*Nguyên lý:* kháng thể không đánh dấu (biết trước) được gắn lên chất mang (polystyren), KN cần tìm được ủ với chất mang có KT. Rửa bỏ KN thừa và cho tiếp KT có gắn enzym. Như vậy, KN cần tìm sẽ bị kẹp giữa hai KT. Sau khi rửa lần 2 để loại bỏ KT gắn enzyme thừa, dung dịch cơ chất được thêm vào để sinh màu đặc trưng. Mức độ lên màu của phản ứng được đo mật độ quang bằng quang phổ kế ở bước sóng thích hợp (hình 1.16).



1.16: Sơ đồ phương pháp *ELISA sandwich*

Kỹ thuật *ELISA sandwich* có khá nhiều ưu điểm vượt trội: thứ nhất là giảm được nhuộm màu nền và các phản ứng không đặc hiệu do đã loại bỏ được hầu hết các thành phần tạp. Thứ hai phản ứng được thực hiện dễ dàng, một có thể được gắn sẵn trên bề mặt rắn tạo thành các bộ KIT và có thể thực hiện các chẩn đoán mà trong đó KN không thể gắn được lên mặt rắn. Bên cạnh đó kỹ thuật cũng có những nhược điểm riêng, trong đó quan trọng nhất là làm tăng phản ứng chéo do liên kết không đặc hiệu giữa các lớp yếu tố phát hiện thứ cấp với kháng thể 1.

#### 1.4.4.4. Kỹ thuật *ELISA cạnh tranh*.

*ELISA cạnh tranh* là phương pháp *ELISA* rất hiệu quả cho định lượng các yếu tố hiện diện trong mẫu xét nghiệm với lượng nhỏ. *ELISA cạnh tranh* sử dụng một lượng KN cùng loại với KN mà ta muốn định lượng trong mẫu (KN cạnh tranh) cho phản ứng miễn dịch với cùng một loại KT đặc hiệu cố định trên mặt rắn, sau đó đo lượng KN cạnh tranh này thông qua hoạt tính enzyme được liên kết với nó. KN cạnh tranh càng hiện diện nhiều cho biết

loại KN đó trong mẫu càng ít và ngược lại. Có ba biến thể chính của phương pháp này:

❖ *Phương pháp ELISA cạnh tranh bão hòa cân bằng tương đối*

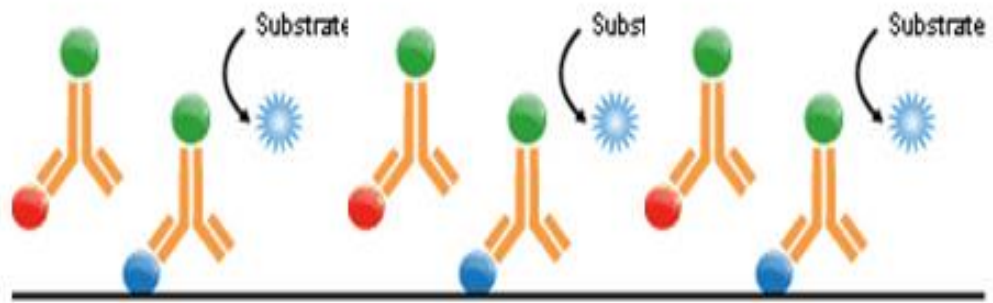
Trong phương pháp này KN mẫu và KN cạnh tranh được cho phản ứng cùng lúc với một KT đã cố định. Hai loại KN sẽ phản ứng với KT theo một tỉ lệ tương ứng với tỉ lệ nồng độ của hai loại KN, từ đó xác định được nồng độ KT khi đo tỉ lệ KN cạnh tranh còn lại sau phản ứng so với lượng KN sử dụng ban đầu.

❖ *Phương pháp ELISA cạnh tranh bão hòa thứ tự:*

Phương pháp này thường được sử dụng hơn phương pháp bão hòa cân bằng tương đối. Ở phương pháp bão hòa thứ tự KN mẫu được cho phản ứng trước. Sau đó, một lượng dư KN cạnh tranh được thêm vào để bão hòa lượng KT còn trống. Hoạt tính enzyme đo được sẽ cho biết lượng KN cạnh tranh phản ứng với bao nhiêu KT còn trống, từ đó tính được lượng KN đã chiếm chỗ KT.

❖ *Phương pháp ELISA cạnh tranh ức chế kháng thể:*

Thay vì cố định KT lên mặt rắn, người ta cũng có thể cố định KN cạnh tranh. Đầu tiên, người ta sẽ cho KN cần xác định phản ứng với một lượng KT biết trước. Sau đó, lượng KT còn lại chưa phản ứng sẽ được phản ứng với KN cạnh tranh, và được cố định lại. Sau bước rửa ta có thể đo lượng KT đã cố định từ đó suy ra lượng KT đã phản ứng với kháng nguyên cần xác định. Bên cạnh việc định lượng KN, phương pháp này còn có thể sử dụng để so sánh các KN với nhau (hình 1.17)[83].



*Hình 1.17: Sơ đồ phương pháp ELISA cạnh tranh ức chế*

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

##### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên UTTTL.

- Gen mã hóa polypeptide của kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm theo thiết kế của nhóm nghiên cứu (gen *polEPCA-2*) gắn trong vector tách dòng pBSK-GS53545 được đặt hàng từ hãng Cosmo Genetech. Trình tự gen này được thiết kế dựa trên trình tự acid amin của 2 epitop EPCA-2.22 và EPCA-2.19 công bố bởi Getzenberg năm 2009 [37].

EPCA-2.22: V I Q P Y P N F Y M V A

EPCA-2.19: F A Q D N D L

- Protein tái tổ hợp mang 8 lần lặp lại của hai epitope EPCA-2.22 và 2.19 đã được xác định có hoạt tính với kháng thể đặc hiệu trong bộ Kit ELISA của CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

- Mười tám thỏ xám giống Việt nam, khỏe mạnh, trọng lượng trung bình 2,5kg/con không phân biệt đực cái được nuôi dưỡng trong điều kiện thí nghiệm tại labo Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch, trường Đại học Y Hà Nội.

##### 2.1.2. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu tạo bộ sinh phẩm bằng kháng thể và bước đầu ứng dụng trong chẩn đoán UTTTL.

- Bốn mươi bệnh nhân đã được chẩn đoán là ung thư tuyến tiền liệt bằng phương pháp hóa mô bệnh học (nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) các mô bệnh phẩm sau phẫu thuật). Bệnh nhân không bị các bệnh ung thư khác và chưa điều trị bằng các thuốc chống ung thư.

- Bốn mươi bệnh nhân u phì đại lành tính TTL đã được chẩn đoán xác định bằng phương pháp hóa mô bệnh học (nhuộm HE các mô bệnh phẩm sau phẫu thuật).

- Ba mươi người nam khỏe mạnh không có bệnh lí của TTL, không bị các bệnh ung thư khác, tuổi từ 50 đến 89 (cùng lứa tuổi với 2 nhóm bệnh nhân nói trên).

## 2.2. HÓA CHẤT, SINH PHẨM NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Sinh phẩm

- Kháng thể thử đặc hiệu kháng hai epitope EPCA-2.22 và 2.19 đã được xác định có hoạt tính

- Các enzyme cắt giới hạn: *Nco* I, *Not* I (Biolabs).

- Các enzyme: *Taq* DNA polymerase, *T4* DNA ligase (Biolabs).

- Thang DNA: 1kb DNA ladder SM0311 (Fermentas).

- Thang protein: Unstained protein molecular weight marker SM0431 (Fermentas).

- Vi khuẩn *Escherichia coli* chủng DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3).

- Vi khuẩn *Escherichia coli* chủng BL21 (chủng biểu hiện).

- Vector biểu hiện pET-28a(+) (Novagen).

- Cặp môi sử dụng trong giải trình tự:

T7 F: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

T7 R: 5' TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG 3'

Đây là cặp môi của vector biểu hiện pET-28a(+). Cặp môi được phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện công nghệ sinh học cung cấp.

- Tá dược Freund' Adjuvant complete và Freund' Adjuvant incomplete

- Bộ Kit ELISA xác định EPCA-2 của hãng CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

### 2.2.2. Hóa chất

➤ Các hoá chất tinh khiết được sử dụng trong các nghiên cứu sinh học phân tử của BioLabs, Invitrogen, Novagen, Sigma và Bioscience, Fermentas... gồm:

➤ Các hoá chất dùng trong điện di DNA và protein: agarose; acrylamide; glycerol; *ethidium bromide*; comassie blue; APS; SDS; Tris-HCl; temed;...

➤ Kháng sinh: Kanamycin.

➤ Chất cảm ứng: IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside).

➤ Các dung dịch muối, dung dịch đệm, ...

➤ Môi trường: LB lỏng, LB đặc (Phụ lục). Môi trường được khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút.

### 2.3. TRANG THIẾT BỊ SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

Lò vi sóng (SamSung, Hàn Quốc)	Tủ cấy vô trùng (Sanyo, Nhật)
Máy li tâm (Eppendorf, Đức)	Pipetman các loại (Gilson)
Máy đo pH (Metter, Thụy Sĩ)	Máy Vortex (Rotolab OSI)
Máy soi gel (Pharmacia, Mỹ)	Tủ ấm 37 °C, 28 °C
Máy PCR (Mỹ)	Tủ lạnh sâu (Sanyo, Nhật)
Máy lắc ổn nhiệt 37 °C, 30 °C, 28 °C	Bể ổn nhiệt (Teche, OSI)
Cân phân tích 10 <sup>-4</sup> g (Mettler Toledo)	Bộ điện di protein (Bio-Rad)
Cân điện 10 <sup>-1</sup> g (Ohaus)	
Dàn máy ELISA Bio-Rad iMark™	Bộ điện di DNA,
Microplate Absorbance Reader.	

### 2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thử nghiệm tạo sinh phẩm cho kỹ thuật ELISA xác định EPCA-2 trong chẩn đoán UTTL.

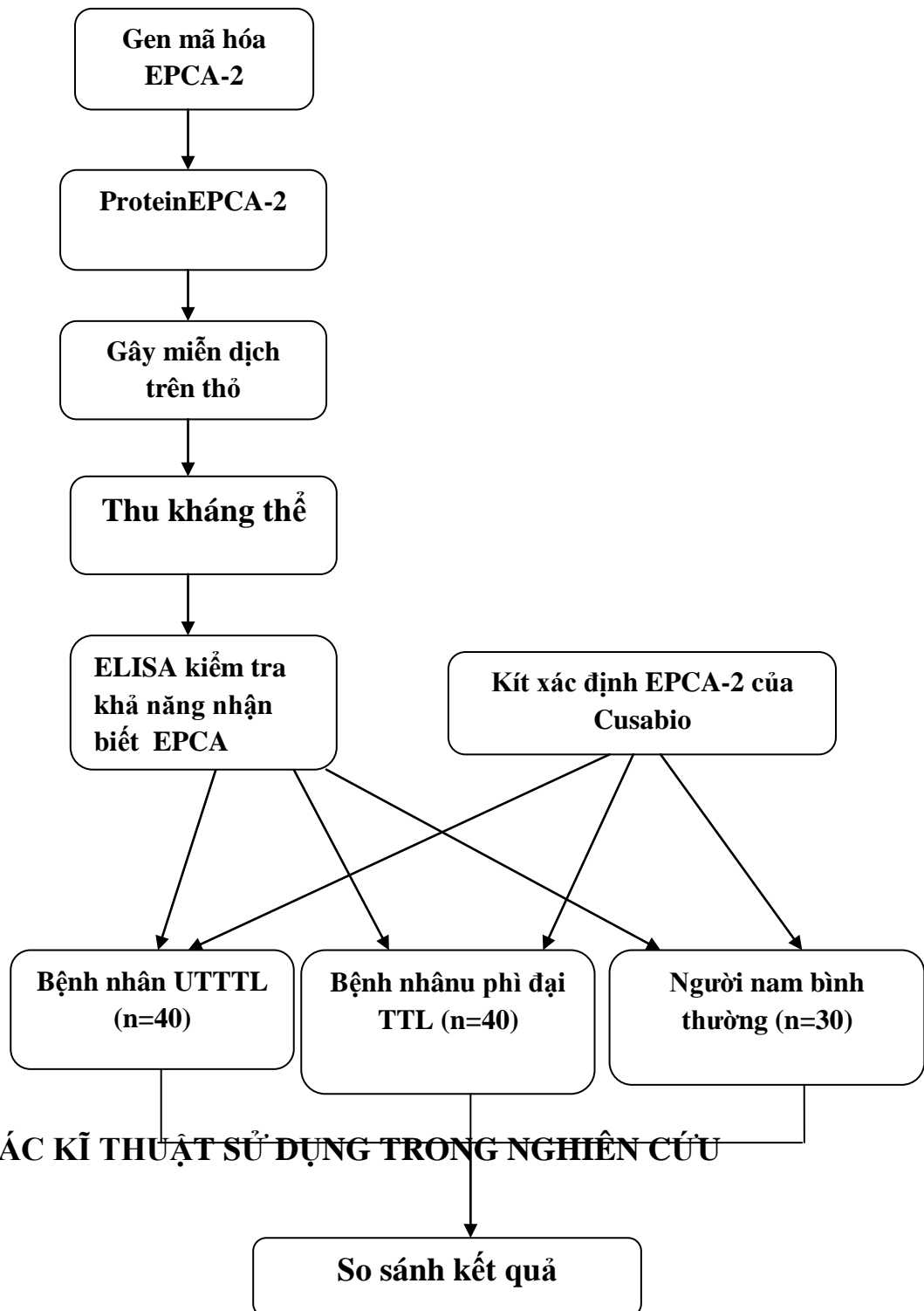
### 2.5. PHÂN TÍCH VÀ XỬ LÝ KẾT QUẢ TRONG NGHIÊN CỨU



- Xử lý số liệu bằng phần mềm: SPSS 6.0
- Sử dụng các thuật toán:  $\chi^2$ , tính tỷ lệ phần trăm, so sánh giá trị trung bình.

## 2.6. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU

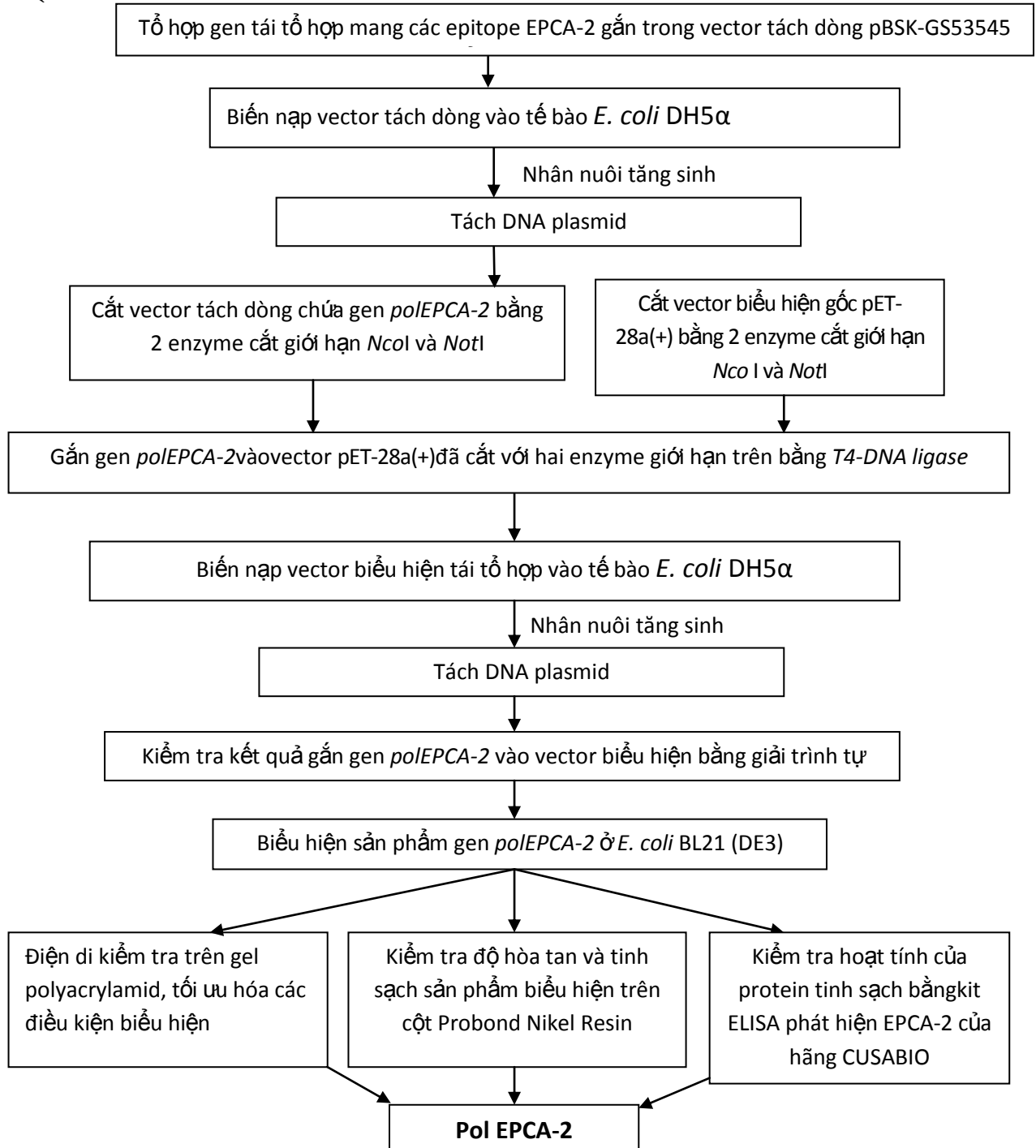
Quá trình nghiên cứu được tiến hành theo sơ đồ:



## 2.8. CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

### 2.8.1. Tạo kháng nguyên tái tổ hợp mang các epitope EPCA-2

Quy trình tái tổ hợp polEPCA -2 được thực hiện theo sơ đồ:



### 2.8.1.1. Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp

#### ❖ Phương pháp cắt DNA bằng enzym cắt giới hạn

##### ➤ Nguyên tắc:

Enzym cắt giới hạn có khả năng nhận biết trình tự đặc hiệu với nó trên DNA (trình tự này thường từ 4-6 bp, gọi là vùng giới hạn) và cắt DNA tại vùng này tạo thành những mảnh DNA có đầu bằng hoặc đầu dính. Dựa vào trình tự nucleotide trên đoạn DNA ban đầu mà ta có thể xác định được các vị trí có thể bị cắt bởi một enzym cắt giới hạn nhất định.

##### ➤ Tiến hành:

Hai enzym cắt giới hạn được sử dụng là *Nco* I và *Not* I.

Thành phần hỗn hợp phản ứng như sau:

*Bảng 2.1. Thành phần hỗn hợp phản ứng cắt bằng enzyme*

<b>Thành phần phản ứng</b>	<b>Thể tích</b>
Đệm NE buffer 4 (10x)	3 $\mu$ L
DNA	8 $\mu$ L
<i>Nco</i> I	0,5 $\mu$ L
<i>Not</i> I	0,5 $\mu$ L
Nước khử ion, vô trùng	18 $\mu$ L
Tổng thể tích	30 $\mu$ L

Cho nước vào ống phản ứng, sau đó thêm dung dịch đệm, DNA. Trộn nhẹ nhàng bằng pipetman, enzym lấy ra từ tủ lạnh sâu -20 °C được cho vào sau cùng và trộn nhẹ nhàng. Lúc này mới là lúc bắt đầu xảy ra phản ứng. Spin nhẹ trong 5- 10 giây để loại bọt khí. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 4 giờ.

#### ❖ Phương pháp điện di trên gel agarose

##### ➤ Nguyên tắc:

DNA là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của một điện trường, chúng sẽ di chuyển về phía cực dương của điện trường. DNA kích thước lớn di chuyển chậm hơn DNA kích thước nhỏ.

Trong một phạm vi nhất định nồng độ gel agarose, kích thước phân tử tỷ lệ tuyến tính với quãng đường di chuyển của DNA trên gel agarose. Thường thì các đoạn gen có kích thước từ 300- 10.000 bp có thể được phân tách trên gel agarose 0,8%.

➤ *Tiến hành:*

Chuẩn bị gel agarose 0,8%: Cân 0,8g agarose dạng bột hòa vào 100 mL TAE 1X (pha từ TAE 50X, xem phụ lục 2). Đun nóng trong lò vi sóng cho tan hoàn toàn. Để nguội khoảng 50°C, đổ vào khuôn đã đặt sẵn rãnh lược với độ dày thích hợp. Để bản gel đông lại và ổn định hoàn toàn.

Gỡ lược, đặt bản gel vào bể điện di chứa sẵn TAE 1X sao cho đệm ngập hoàn toàn bản gel.

Tra mẫu: Lấy một thể tích dung dịch chứa lượng DNA thích hợp (khoảng 1-2 µg DNA), trộn với khoảng 1µL màu, tra vào giếng. Nếu cần thiết thì tra thêm marker là tập hợp nhiều DNA có kích thước đã biết (thang DNA) để so sánh ước lượng kích thước đoạn gen.

Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V. Quan sát sự di chuyển của màu để biết khi tắt máy.

Nhuộm bản gel bằng *ethidium bromide* 2 µg/mL trong khoảng 5- 7 phút. Lấy bản gel ra tráng qua nước. Chụp ảnh dưới ánh sáng tử ngoại có bước sóng  $\lambda = 360$  nm.

❖ *Phương pháp thu DNA từ gel agarose (Phương pháp thổi gel)*

Phương pháp này được ứng dụng khi ta muốn thu nhận một đoạn DNA có kích thước nhất định đã biết trước, trong một hỗn hợp các đoạn DNA có kích thước khác với đoạn DNA mong muốn.

Chúng tôi sử dụng kit thoi gel của hãng Fermentas (Gene JET™ Gel Extraction Kit).

➤ *Nguyên tắc:*

Dựa vào khả năng bám của DNA lên màng silica khi có mặt nồng độ cao các muối chaotropic ở  $\text{pH} < 7,5$ . Đệm QG giúp hòa tan gel và tạo điều kiện thuận lợi để DNA bám lên màng. Sự bám DNA lên màng có tính đặc hiệu nên những thành phần khác không được giữ lại, đệm rửa PE sẽ loại hoàn toàn các thành phần này. DNA sau đó sẽ được thoi ra khỏi màng bằng đệm thoi EB hoặc nước.

➤ *Tiến hành:*

*Bước 1: Cắt phân gel agarose có DNA quan tâm*

Sau khi sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 0,8% ta tiến hành soi gel, cắt và thu nhận vùng gel có chứa băng DNA mong muốn, chuyển sang ống Eppendorf mới đã được xác định khối lượng.

Định lượng miếng gel: Xác định khối lượng đoạn gel vừa thu nhận được bằng cân phân tích. Bổ sung 3 lần thể tích đệm liên kết với gel (Gel Buffer Binding) (tính bằng mL) đối với 1 thể tích gel (tính bằng mg).

*Bước 2: Hòa tan gel*

Ủ ống Eppendorf có chứa miếng gel ở bể ổn nhiệt  $56^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút, cứ 2 - 3 phút lấy ống ra đảo để làm tan hoàn toàn miếng gel. Kiểm tra đảm bảo dung dịch sau khi ủ có màu vàng (chứng tỏ  $\text{pH} < 7,5$  là pH phù hợp để gắn DNA lên màng). Nếu dung dịch có màu cam hay tím, thêm 10  $\mu\text{L}$  Natri acetat pH5 để chuyển dung dịch sang vàng.

Chuyển toàn bộ phần dịch sang cột thoi gel. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, loại dịch.

Bổ sung 500  $\mu\text{L}$  đệm QG. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, loại dịch.

*Bước 3: Loại bỏ các thành phần không gắn lên màng silica*

Rửa cột: Bổ sung 750  $\mu\text{L}$  dung dịch đệm PE. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, loại dịch. Ly tâm tiếp một lần nữa để loại cạn dịch.

Thu DNA: Đặt cột vào ống Eppendorf 1,5 mL mới.

*Bước 4: “Thôi” DNA ra khỏi màng silica*

Bổ sung 30  $\mu\text{L}$  nước khử ion, vô khuẩn, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, thu dịch trong ống Eppendorf, giữ ở 4 °C.

❖ *Phương pháp gắn DNA vào vector biểu hiện*

➤ *Nguyên tắc:*

Do khả năng xúc tác hình thành liên kết giữa nhóm 5'-phosphat và 3'-OH tự do nên enzyme *T4 DNA ligase* có thể gắn nối hai phân tử DNA có đầu dính bổ sung với nhau để tạo thành DNA tái tổ hợp. Điều kiện tiên quyết để phản ứng xảy ra là sự có mặt của ATP hoặc NAD để hoạt hóa enzyme.

➤ *Tiến hành:*

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng:

*Bảng 2.2. Hỗn hợp phản ứng gắn bằng enzyme*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>
T4 DNA ligase buffer 10X	1 $\mu\text{L}$
Vector đã mở vòng	1 $\mu\text{L}$
Đoạn gen	5 $\mu\text{L}$
<i>T4 DNA ligase</i>	1 $\mu\text{L}$
Nước khử ion, vô trùng	2 $\mu\text{L}$
Tổng thể tích	10 $\mu\text{L}$

Cho nước vào ống phản ứng, thêm các thành phần T4 DNA ligase buffer, vector đã mở vòng, đoạn gen vào ống Eppendorf. Trộn nhẹ nhàng bằng pipetman. Enzyme được lấy từ tủ lạnh sâu -20 °C sẽ cho vào sau cùng và trộn nhẹ nhàng.

Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 5 giờ ở nhiệt độ 22 °C.

### 2.8.1.2. Biến nạp vector tái tổ hợp vào *E.coli* bằng phương pháp sốc nhiệt

Sốc nhiệt được sử dụng để chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào. Phương pháp này có thao tác khá đơn giản nhưng lại không kiểm soát được nhiều chỉ tiêu như: Số lượng bản sao của các đoạn DNA được đưa vào, biểu hiện của nó sẽ bền vững (nếu nó gắn xen vào bộ gen của tế bào chủ) hay chỉ tạm thời (nếu tồn tại dưới dạng plasmid và dần bị tế bào chủ loại bỏ). Tuy nhiên, không phải tất cả các vi khuẩn đều có thể biến nạp một cách dễ dàng.

#### ➤ Nguyên tắc:

Dưới tác dụng của  $\text{CaCl}_2$ , thành tế bào ở thời kì sinh trưởng trở nên xốp tạo điều kiện cho DNA có thể chui qua lỗ màng vào tế bào chất khi sốc nhiệt. Sau 30 phút, tế bào sẽ biểu hiện gen kháng kháng sinh có trong plasmid ngoại lai.

#### ➤ Tiến hành:

Bước 1: Tạo tế bào khả biến bằng muối  $\text{CaCl}_2$ .

Lấy chủng tế bào *E.coli* được cất giữ ở  $-80^\circ\text{C}$ .

Cấy vạch tế bào trên đĩa môi trường LB đặc, ủ đĩa cấy qua đêm ở  $37^\circ\text{C}$ .

Cấy chuyển một khuẩn lạc *E.coli* vào 5 mL môi trường LB lỏng, nuôi lắc 220 vòng/phút ở  $37^\circ\text{C}$  qua đêm.

Cấy chuyển 2% vào 15 mL môi trường LB lỏng, tiếp tục nuôi lắc khoảng 2 giờ đến khi  $\text{OD}_{600}$  đạt 0,6 - 0,8.

Chuyển dịch tế bào sang ống Eppendorf vô trùng, mỗi ống 1,5 mL, để trên đá 10 phút.

Ly tâm thu sinh khối (4000 vòng/phút,  $4^\circ\text{C}$  trong 5 phút)

Loại dịch nổi, đặt ống chứa tế bào trong đá 10 phút.

Hòa tan cặn tế bào trong 300  $\mu\text{L}$  dung dịch  $\text{CaCl}_2$  100 mM lạnh vô trùng. Để hỗn hợp phản ứng trên đá 30 phút.

Ly tâm 4000 vòng/ phút,  $4^\circ\text{C}$  trong 5 phút, tạo cặn tế bào thành dải rất mảnh, hút bỏ dịch cần thận (tránh bong dải cặn).

Hòa lại cặn tế bào vào 60  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  100 mM lạnh vô trùng, bung nhẹ.

Đề ống tế bào trong đá 2- 3 giờ trước khi biến nạp hoặc bảo quản  $-80^\circ\text{C}$  trong glycerol 10%.

***Bước 2: Biến nạp.***

Bổ sung 2  $\mu\text{L}$  sản phẩm vector tái tổ hợp cho vào ống tế bào khả biến. Đề trên đá 30 phút.

Chuyển dịch tế bào từ đá sang bể ổn nhiệt  $42^\circ\text{C}$ , sốc nhiệt trong 60 giây.

Mẫu được lấy ra, đặt ngay trên đá 5 phút.

Bổ sung 250  $\mu\text{L}$  môi trường LB lỏng ở nhiệt độ phòng, nuôi lắc 220 vòng/phút, ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Cấy trải 150  $\mu\text{L}$  dịch tế bào nuôi cấy trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh kanamycin. Nuôi ở tủ ấm  $37^\circ\text{C}$  qua đêm.

***2.8.1.3. Phương pháp tách DNA plasmid từ vi khuẩn E.coli***

Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid là một bước thí nghiệm quan trọng trong các nghiên cứu của lĩnh vực sinh học phân tử. Có nhiều phương pháp được sử dụng để tách chiết DNA plasmid như sử dụng các loại dung dịch tách, hoặc dùng kit chuyên dụng. Phương pháp được sử dụng trong đề tài là tách DNA plasmid bằng các loại dung dịch.

➤ ***Nguyên tắc:***

Dựa vào lợi thế của việc biến tính bằng kiềm đối với DNA plasmid và DNA nhân và sự hồi tính một cách chọn lọc DNA plasmid sau khi trung hòa dung dịch.

➤ ***Tiến hành:***

Chuẩn bị dung dịch Sol I, dung dịch Sol II, dung dịch Sol III theo công thức trong phụ lục 2, dung dịch phenol: chloroform: isoamylalcohol tỷ lệ thể tích 25:24:1.



Lấy dịch vi khuẩn đã nuôi qua đêm cho vào ống Eppendorf 1,5 mL, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút thu tế bào.

Bổ sung 150  $\mu$ L dung dịch Sol I, hòa cho cặn tan hoàn toàn.

Bổ sung 150  $\mu$ L dung dịch Sol II, đảo nhẹ 3- 4 lần.

Bổ sung 150  $\mu$ L dung dịch Sol III, đảo nhẹ 3- 4 lần luôn.

Bổ sung 450  $\mu$ L dung dịch phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1), đảo nhẹ.

Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút.

Chuyển pha trên sang ống Eppendorf 1,5 mL mới.

Bổ sung 400- 500  $\mu$ L dung dịch isopropanol (tương đương với lượng dịch thu được).

Để tủ  $-20^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút.

Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở  $4^{\circ}\text{C}$ , loại dịch thu cặn.

Rửa cặn bằng dung dịch cồn 70%.

Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, loại dịch thu tủa.

Làm khô tủa bằng máy speed vac, hòa trong 30  $\mu$ L nước khử ion vô trùng bổ sung RNase có nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , để tủ  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ.

Kiểm tra kết quả bằng cách điện di mẫu DNA plasmid thu được trên gel agarose 0,8%.

#### **2.8.1.4. Phương pháp PCR khuếch đại vector chứa *polEPCA-2***

Nguyên tắc của kỹ thuật PCR: Phối hợp khả năng lai đặc hiệu của DNA và khả năng tổng hợp DNA in vitro của DNA polymerase để nhân bản in vitro các đoạn DNA (gen) khác nhau lên hàng triệu lần so với ban đầu.

Do DNA polymerase hoạt động theo nguyên tắc cần phức hợp khuôn-mồi, trong môi trường thích hợp có các dNTP thì sẽ kéo dài mồi thành sợi bổ sung với sợi khuôn. Vì vậy, để nhân bản được đoạn DNA đích, người ta cần

phải biết được trình tự đoạn nucleotide ở 2 đầu của đoạn DNA cần nhân bản để từ đó thiết kế các cặp mồi (primer) đặc hiệu.

Ở đề tài này chúng tôi sử dụng mồi T7F và T7R khuếch đại đoạn của vector pET-28a(+) có chứa gen *polEPCA-2*, sản phẩm khuếch đại sau đó được điện di kiểm tra kích thước trên gel agarose, đồng thời sử dụng các mồi này trong giải trình tự vector tái tổ hợp chứa đoạn gen mong muốn.

Tiến hành phản ứng PCR theo quy trình sau:

❖ *Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng:*

*Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích(<math>\mu</math>L)</b>
Buffer 10X	2,5
DNTPs	2,5
T7F	1
T7R	1
DNA khuôn	0,5
<i>Taq polymerase</i>	0,125
Nước khử ion vô trùng	17,375
Tổng thể tích	25

❖ *Hỗn hợp phản ứng được đưa vào máy PCR để thực hiện chu trình nhiệt:*

Bước 1: Biến tính hay tách sợi DNA kép thành sợi DNA đơn ở nhiệt độ 94- 95°C trong 30 đến 60 giây.

Bước 2: Gắn mồi vào sợi DNA trong 30 đến 60 giây. Nhiệt độ phụ thuộc vào  $T_m$  của mồi. Nhiệt độ gắn mồi của cặp mồi T7F và T7R là 52°C.

Bước 3: Kéo dài chuỗi mới ở 72°C trong 30 giây đến vài phút tùy thuộc kích thước đoạn gen cần nhân bản. Nhiệt độ 72°C là nhiệt độ tối ưu đối với hầu hết DNA polymerase bền với nhiệt [84],[85].

*Bảng 2.4. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR*

Nhiệt độ	Thời gian	
95°C	5 phút	
95°C	30 giây	<b>30 chu kỳ</b>
52°C	30 giây	
72°C	30 giây	
72°C	5 phút	
15°C	Vô cùng	

❖ *Tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose để kiểm tra chất lượng sản phẩm.*

#### **2.8.1.5. Phương pháp giải trình tự gen bằng máy tự động**

❖ *Định nghĩa:*

Giải trình tự gen là phát hiện được thứ tự sắp xếp của 4 loại nucleotid trên phân tử DNA.

Có nhiều phương pháp giải trình tự gen như: giải trình tự bằng hóa học, bằng enzyme và bằng máy giải trình tự tự động.

❖ *Trong đề tài chúng tôi giải trình tự gen mã hóa polEPCA-2 bằng máy tự động*

Để thực hiện giải trình tự bằng máy tự động các mạch DNA đơn sản sinh trong ống phản ứng giải trình tự phải được đánh dấu huỳnh quang để các vạch điện di của các mạch đơn này phát sáng khi đi qua một chùm tia sáng laser. Nguyên tắc hoạt động của máy là trong suốt quá trình điện di, mỗi khi có một vạch điện di đi qua chùm tia laser thì vạch điện di sẽ phát sáng và sự phát sáng này sẽ được mắt cảm quang ghi nhận và lưu lại thành một đỉnh cường độ sáng trong biểu đồ. Từ biểu đồ của các đỉnh cường độ

sáng này, máy sẽ so dòng của các đỉnh tương ứng với các màu, cuối cùng phân tích thành trình tự của đoạn DNA.

Với các thế hệ máy mới sau này, người ta có thể dùng 4 màu huỳnh quang để đánh dấu 4 loại ddNTP, nhờ vậy phản ứng giải trình tự có thể thực hiện được chỉ trong một ống nghiệm và khi giải trình tự chỉ cần điện di trên một hàng mà không cần phải trên 4 hàng khác nhau như trước[84],[85].

### **2.8.1.6. Biểu hiện protein tái tổ hợp**

#### **❖ Cảm ứng promoter để tế bào *E.coli* biểu hiện protein tái tổ hợp**

##### **➤ Nguyên tắc:**

Nuôi cấy các thể biến nạp có vector tái tổ hợp mang gen trong môi trường có chất cảm ứng promoter để protein tái tổ hợp có thể được tế bào chủ tổng hợp.

##### **➤ Tiến hành:**

Cấy hoạt hóa 1 khuẩn lạc trong môi trường LB có bổ sung kanamycin (50 mg/mL) với nồng độ cuối là 50 µg/mL, nuôi lắc ở 37°C qua đêm.

Cấy chuyển 2% chủng vào 2 mL môi trường LB có bổ sung kháng sinh kanamycin nồng độ là 50 µg/mL và nuôi lắc ở 37°C để OD đạt 0,5- 0,8 (khoảng 2- 3 giờ).

Hút 1 mL làm đối chứng trước cảm ứng.

Phần còn lại cảm ứng IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)(100 mM) đạt nồng độ cuối là 0,4 mM, lần lượt từng ống nuôi ở 37°C qua đêm.

Thu mẫu sau cảm ứng.

Điện di kiểm tra protein trên gel polyacrylamid 12,6% [86].

#### **❖ Phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamid có chất khử (SDS-PAGE)**

##### **➤ Nguyên tắc:**

Điện di trên gel polyacrylamid là kỹ thuật để phân tách các protein theo tính linh động trong điện di của chúng (phụ thuộc vào chiều dài của chuỗi polypeptid hoặc khối lượng phân tử, cấu hình (xoắn) của protein, các biến đổi hậu dịch mã và các nhân tố khác).

SDS (sodium dodecyl sulfate) là một chất khử anionic gây biến tính protein bằng cách bao quanh khung polypeptid và tích điện âm cho nó tỷ lệ với chiều dài của mạch. Sau khi xử lý các protein đều có dạng hình cầu tích điện âm với cùng số điện tích trên một đơn vị chiều dài. Nhờ đó, các hỗn hợp protein sau khi biến tính có thể chuyển động trên gel polyacrylamid trong điện trường theo chiều từ cực âm đến cực dương và tách thành các băng theo khối lượng phân tử chứ không theo điện tích ban đầu của protein.

Để có được độ phân giải cao hơn ta sử dụng cách điện di ngắt quãng với 2 lớp gel cô và gel tách [86].

➤ *Tiến hành:*

*\*Chuẩn bị gel*

Bản gel gồm 2 lớp, một lớp có mạng lưới lớn gọi là gel cô đổ lên trên, một lớp có mạng lưới nhỏ gọi là gel tách được đổ bên dưới. Mỗi lớp có một loại đệm riêng và khác với đệm chạy. Thành phần của mỗi lớp như sau:

*Bảng 2.5. Công thức pha gel tách*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>
Tris-HCl (pH=8,8)	2,625 mL
Acrylamide-bis	2,8 MI
Nước	1,47 MI
SDS 10%	70 µL
APS 10%	35 µL
TEMED	3,5 µL

*Bảng 2.6. Công thức pha gel cô*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>
Tris- HCl (pH= 6,8)	0,375 mL
Acrylamide- bis	0,402 MI
Nước	2,205 MI
SDS 10%	30 $\mu$ L
APS 10%	15 $\mu$ L
TEMED	3 $\mu$ L

Kiểm tra kết quả: Bản gel sau khi chạy xong được nhuộm bằng Comassie Blue để phát hiện các băng.

*\* Xử lý mẫu*

Hút 1 mL dịch sau cảm ứng ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, loại dịch, thu cặn tế bào.

Hòa cặn trong 40  $\mu$ L nước, vortex.

Thêm 10  $\mu$ L SDS sample.

Biến tính ở 100°C trong 10 phút.

Để nguội, ly tâm 12.000 vòng/phút, 15-20 phút ở 4°C.

*\*Tra mẫu:* Lấy 15  $\mu$ L dịch protein đã biến tính tra vào mỗi giếng.

*\*Chạy điện di:* Điện di theo chiều thẳng đứng, với hiệu điện thế 110V, cường độ dòng điện 40mA.

*\*Nhuộm bản gel bằng dung dịch nhuộm CBB (Comassie Blue) khoảng 30 phút, sau đó tẩy bản gel bằng dung dịch tẩy, khoảng 1 giờ. Xác định kết quả.*

*❖ Khảo sát điều kiện thích hợp cho quá trình biểu hiện*

Khảo sát điều kiện nồng độ IPTG và thời gian thích hợp cho quá trình biểu hiện. Quá trình biểu hiện được thực hiện ở nhiệt độ 37°C với các nồng độ chất cảm ứng IPTG khác nhau (0,2 mM; 0,4 mM; 0,8 mM và 1 mM) và thu

mẫu theo thời gian (3 giờ; 5 giờ và qua đêm) để xác định nồng độ IPTG và thời gian thích hợp cho quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp.

Khảo sát điều kiện nhiệt độ thích hợp cho quá trình biểu hiện.

Cố định nồng độ IPTG và thời gian thích hợp cho quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp, biểu hiện ở các nhiệt độ khác nhau (37°C, 30°C và 18°C).

Thu mẫu và điện di kiểm tra trên gel polyacrylamid 12,6%.

❖ *Xác định khả năng hòa tan của protein*

➤ *Mục đích:*

Xác định khả năng hòa tan của protein để biết protein tạo thành ở dạng hòa tan tốt hay hòa tan kém, để từ đó lựa chọn phương pháp tinh sạch thích hợp.

➤ *Tiến hành:*

Lấy 1,5mL dịch tế bào sau cảm ứng ly tâm 4.000vòng/phút trong 10 phút. Thu cặn tế bào, loại dịch.

Hòa lại tế bào trong 400μL Lysis buffer (phụ lục2)

Đặt ống tế bào trên đá lạnh rồi mới tiến hành siêu âm phá tế bào.

Hút 20 μL dịch sau phá tế bào. Đây là mẫu tổng số.

Phần còn lại ly tâm 12.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4 °C

Hút dịch ly tâm. Đây là mẫu hòa tan.

Hòa lại cặn sau ly tâm trong 480μL Lysis buffer. Đây là mẫu cặn không hòa tan.

Điện di trên gel polyacrylamid các mẫu để kiểm tra.

Nếu lượng protein biểu hiện ở mẫu hòa tan nhiều, chứng tỏ protein có khả năng hòa tan tốt.

Nếu lượng protein biểu hiện ở mẫu cặn nhiều, chứng tỏ protein hòa tan kém.

**2.8.1.7. Tinh sạch protein tái tổ hợp mang EPCA-2 bằng Kit ProBond™  
Nikel Resin**

Protein tái tổ hợp biểu hiện ở dạng thể vùi. Chúng tôi chọn phương pháp tinh sạch bằng Kit ProBond™ Nikel Resin của hãng Invitrogen. Kit này có thể chuyển protein từ dạng không hòa tan thành dạng hòa tan, điều này hết sức quan trọng cho mục đích thu được các protein tái tổ hợp.

➤ *Chuẩn bị hóa chất:*

DBB (Denaturing Binding Buffer): 8M urea, 20 mM sodium phosphat, 500 mM NaCl, pH=7,8

DWB (Denaturing Wash Buffer): 8M urea, 20 mM sodium phosphat, 500 mM NaCl, pH= 6,0

NPB (Native Purification Buffer): 50 mM sodium phosphat, 500 mM NaCl, pH=8,0

NWB (Native Wash Buffer): NPB, Imidazole 20 mM, pH=8,0

NEB 100 mM, 250 mM và 500 mM (Native Elution Buffer): NPB, Imidazole 100 mM, 250 mM và 500 mM, pH= 8,0

➤ *Tiến hành:*

*Bước 1: Chuẩn bị dịch tế bào trước khi đưa lên cột*

Ly tâm huyền dịch tế bào (100 mL) đã kiểm tra khả năng biểu hiện, thu cặn tế bào.

Hòa lại tế bào trong 8 mL DBB, pH= 7,8

Làm tan cặn tế bào bằng cách lắc trên máy vortex ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 phút.

Đặt huyền dịch trên đá, phá màng tế bào bằng máy siêu âm (máy Labsonic) trong thời gian 20 phút.

Ly tâm dịch phá tế bào ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút, thu dịch nổi, loại xác tế bào.

*Bước 2: Chuẩn bị cột*

Lắc đều để ProBond™ Nikel Resin tạo thành huyền dịch đồng nhất



Dùng pipet hút 2 mL huyền dịch Nikel Resin đưa lên cột tinh sạch dung tích 10 mL

Rửa cột bằng 6 mL DBB, pH= 7,8

Hòa lại Resin bằng cách đảo cột bằng tay, sau đó để cột lại theo phương thẳng đứng để Resin lắng xuống và cho dịch chảy qua cột.

*Bước 3: Đưa protein lên cột và đẩy ra khỏi cột*

Đưa toàn bộ dịch nổi phá tế bào sau ly tâm lên cột

Lắc nhẹ cột trên máy vortex trong thời gian 15- 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó để cột lại theo phương thẳng đứng để huyền dịch lắng xuống và cho dịch chảy qua cột.

Rửa cột bằng 8 mL DBB, pH= 7,8

Rửa cột bằng 8 mL DWB, pH= 6,0

Rửa cột bằng 8 mL NWB, pH= 8,0 lặp lại 10 lần.

Đẩy protein tái tổ hợp ra khỏi cột lần lượt bằng 4 mL NEB có nồng độ Imidazol là 100 mM, 250 mM và 500 mM, thu 3 phân đoạn tương ứng với 3 nồng độ Imidazol gọi là phân đoạn  $I_{100mM}$ ,  $I_{250mM}$ ,  $I_{500mM}$

Kiểm tra protein sau tinh sạch bằng điện di trên gel polyacrylamid 12,6%.

### ***2.8.1.8. Kiểm tra hoạt tính sản phẩm bằng kỹ thuật miễn dịch gắn enzym (ELISA)***

Chúng tôi sử dụng kit ELISA phát hiện EPCA-2 của hãng CUSABIO (mã sản phẩm CSB-EQ027679HU) để kiểm tra hoạt tính của sản phẩm polePCA-2 tái tổ hợp. Sử dụng các dung dịch chuẩn đã biết nồng độ để xây dựng đường chuẩn. Sử dụng kết quả hấp thụ quang ở bước sóng 450 nm của mẫu kiểm tra dựa vào đường chuẩn để tìm nồng độ protein polePCA-2.

➤ *Nguyên tắc:*

Sử dụng kỹ thuật miễn dịch ELISA sandwich định lượng trực tiếp.

*Tiến hành:*

*Bước 1: Chuẩn bị mẫu kiểm tra*

Sản phẩm protein sau tinh sạch bằng Kit ProBond™ Nikel Resin được thẩm tích bằng màng thẩm tích (Dialysis tubing cellulose membrane- Sigma) trong đệm PBS (Phosphate Buffered Saline) qua đệm để loại Imidazol (Imidazol có trong thành phần của Native Elution Buffer). Ta thu được mẫu kiểm tra.

*Bước 2: Tiến hành phản ứng ELISA*

- Đánh dấu phân biệt giữa các giếng trắng (blank well), giếng các mẫu chuẩn và giếng chứa mẫu cần kiểm tra.

- Giếng trắng không bổ sung dung dịch.

- Nhỏ 100  $\mu$ L các mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra vào các giếng tương ứng.

- Nhỏ tiếp 50  $\mu$ L dung dịch chất cộng hợp HRP Conjugate vào mỗi giếng (không cho vào giếng trắng) và lắc kỹ.

- Đậy giếng bằng Parafilm và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 60 phút.

- Rửa mỗi giếng 3 lần với 200  $\mu$ L nước cất hai lần.

- Nhỏ 100  $\mu$ L dung dịch cơ chất vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.

- Nhỏ tiếp 50  $\mu$ L dung dịch dừng phản ứng (Stop Solution) vào mỗi giếng. Lắc kỹ các giếng để 10 phút.

- Đo giá trị hấp thụ ở bước sóng 450nm ( $OD_{450}$ ).

### **2.8.2. Các kĩ thuật sử dụng gây miễn dịch cho tổ tạo kháng thể đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19**

Kháng thể đơn dòng được ứng dụng trong nhiều kĩ thuật khác nhau phục vụ cho chẩn đoán và điều trị. Để tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu với một KN biết trước có thể sử dụng các phương pháp: (1) Gây miễn dịch trên động vật. (2) Tái tổ hợp DNA (3) Sàng lọc từ các thư viện kháng thể ( Phage

display, Aptamer). Trong nghiên cứu này chúng tôi tạo kháng thể bằng phương pháp gây miễn dịch trên thỏ.

### **2.8.2.1. Chuẩn bị dung dịch tiêm để gây miễn dịch:**

- Dung dịch dùng để gây miễn dịch với mục đích kích thích cơ thể động vật thí nghiệm tạo kháng thể có khả năng kháng đặc hiệu với kháng nguyên biết trước. Vì vậy dung dịch gây miễn dịch cần phải có các yếu tố: (1) Tính lạ so với cơ thể (2) Có thể tồn tại trong cơ thể động vật đủ lâu để gây xuất hiện các đáp ứng của hệ miễn dịch (3) Không độc, không gây chết động vật thí nghiệm.

- Để đảm bảo các tiêu chí (1) và (2) trong dung dịch gây miễn dịch ngoài kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch luôn cần được phối hợp với một tá dược có tác dụng giúp cho KN có thể tồn tại trong cơ thể động vật đủ lâu để các hệ thống đáp ứng miễn dịch có thể nhận biết được. Tá dược thường được sử dụng hiện nay đó là dung dịch Freund'Adjuvant, tên được đặt theo tên người đã tìm ra Jules T. Freund. Chúng tôi sử dụng Freund'Adjuvant của hãng Sigma. Đây là một dung dịch nhũ hoá trong dầu khoáng gồm hai loại đó là Freund'Adjuvant hoàn toàn (Freund'Adjuvant complete) và Freund'Adjuvant không hoàn toàn (Freund'Adjuvant incomplete). Cấu tạo Freund'Adjuvant hoàn toàn gồm dung dịch nhũ hoá trong dầu khoáng và một loại vi khuẩn bất hoạt đông khô (thường là vi khuẩn lao), còn Freund'Adjuvant không hoàn toàn thiếu các thành phần vi khuẩn đông khô, chỉ có nước và nhũ tương dầu.

- Freund'Adjuvant là một dung dịch nhũ hóa dầu còn polEPCA-2 bản chất là protein hoàn tan trong nước cát vì vậy rất khó hoàn tan hoàn cùng nhau. Nếu hai chất này không được hòa trộn hoàn toàn với nhau, khi tiêm cho động vật thí nghiệm polEPCA-2 sẽ nhanh chóng bị phân tán và đào thải không tồn tại đủ lâu để có thể gây được đáp ứng miễn dịch. Vì vậy kỹ thuật

hòa tan và trộn đều KN với tá dược là khâu hết sức quan trọng đảm bảo thành công của thí nghiệm.

- Sự hòa trộn này được thực hiện trong điều kiện vô khuẩn bằng khuấy từ trong thời gian từ 2 đến 3 giờ. Dung dịch từ dạng ban đầu là 2 lớp dịch phân tách nhau của polEPCA-2 nổi trên dịch Freund'Adjuvant trong suốt. Sau khuấy từ dần chuyển thành thể huyền dịch sệt và trắng đục như sữa.

- *Dung dịch tiêm gồm 4 loại:*

- Dung dịch 1 gồm: 2ml polEPCA-2 nồng độ 185ng/ml + 2ml Freund'Adjuvant hoàn toàn, đã được khuấy thành huyền dịch.

- Dung dịch 2 gồm: 2ml polEPCA-2 nồng độ 185ng/ml + 2ml Freund'Adjuvant không hoàn toàn, đã được khuấy thành huyền dịch.

- Dung dịch 3 gồm: 2ml NaCl 9‰ + 2ml Freund'Adjuvant hoàn toàn, đã được khuấy thành huyền dịch.

- Dung dịch 4 gồm: 2ml NaCl 9‰ + 2ml Freund'Adjuvant không hoàn toàn, đã được khuấy thành huyền dịch.

#### **2.8.2.2. Gây miễn dịch tạo kháng thể**

Các thử trong nghiên cứu được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 3 thử.

+ Nhóm 1: là 3 thử được gây miễn dịch với polEPCA-2. Dung dịch tiêm cho nhóm thử này là polEPCA-2.22, 2.19 + Freund'Adjuvant (gồm 2 loại: Dung dịch 1 và 2).

+ Nhóm 2: là 3 thử làm chứng, dung dịch tiêm cho nhóm này là NaCl 9‰ + Freund'Adjuvan (gồm 2 loại dung dịch 3 và 4).

❖ *Đường tiêm gây miễn dịch là tiêm vào cơ đùi và tiêm vào khoang màng bụng:*

- Đường tiêm vào cơ đùi được sử dụng khi gây miễn dịch cho thử ở các mũi tiêm 1, 2 và 3

- Kỹ thuật tiêm vào cơ đùi: thỏ được cố định nằm ngửa trên bàn mổ. Bộ lộ phần mặt trong cơ đùi của chân sau. Cắt sạch lông vùng tiêm. Sát trùng vùng tiêm bằng cồn 70<sup>0</sup>. Nâng nhẹ vùng cơ đùi, dùng kim đường kính lớn ( $\geq 2\text{mm}$ ) đưa nhẹ nhàng vào giữa khối cơ, giữ nguyên vị trí kim rút nhẹ pít tông để đảm bảo không tiêm vào mạch máu, từ từ bơm huyền dịch vào giữa cơ đùi. Rút kim và sát trùng lại vùng tiêm.

- Đường tiêm vào khoang màng bụng được sử dụng khi gây miễn dịch cho thỏ ở mũi tiêm 4.

- Kỹ thuật tiêm: thỏ được cố định nằm ngửa trên bàn mổ. Cắt sạch lông vùng bụng. Sát trùng vùng tiêm bằng cồn 70<sup>0</sup>. Dùng tay nâng cao vùng da bụng giữa 2 đùi sau, dùng kim đường kính lớn ( $\geq 2\text{mm}$ ) đưa nhẹ nhàng qua da vào trong ổ bụng. Giữ nguyên vị trí kim rút nhẹ pít tông để đảm bảo không đâm vào ruột, từ từ bơm dung dịch vào ổ bụng. Rút kim và sát trùng lại vùng tiêm.

❖ *Thời gian tiêm lặp lại:* Các thỏ thí nghiệm được gây miễn dịch theo phác đồ 4 mũi tiêm. Mỗi mũi cách nhau 7 ngày.

*Mũi tiêm 1:*

- Ba thỏ của nhóm gây miễn dịch được tiêm dung dịch 1 (gồm: 2ml polePCA-2 nồng độ 185ng/ml + 2ml Freund' Adjuvant hoàn toàn).

- Ba thỏ của nhóm chứng được tiêm dung dịch 3 (gồm: 2ml NaCl 9‰ + 2ml Freund' Adjuvant hoàn toàn).

*Mũi tiêm 2 (sau mũi tiêm 1 thời gian 7 ngày):*

- Ba thỏ của nhóm gây miễn dịch được tiêm dung dịch 2 (gồm: 2ml polePCA-2 nồng độ 185ng/ml + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn).

- Ba thỏ của nhóm chứng được tiêm dung dịch 4 (gồm: 2ml NaCl 9‰ + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn).

*Mũi tiêm 3 (sau mũi tiêm 2 thời gian 7 ngày):*

- Dung dịch tiêm của cả 2 nhóm thỏ giống ở mũi tiêm 2

- Sau tiêm mũi 3 được 7 ngày, thử được lấy máu tai, định lượng kháng thể trong huyết thanh, nếu nồng độ kháng thể tốt mới tiếp tục tiêm mũi 4.

*Mũi tiêm 4* (sau mũi tiêm 3 thời gian 7 ngày):

- Ba thỏ của nhóm gây miễn dịch được tiêm vào ổ bụng 4ml dung dịch polEPCA -2 nồng độ 185 ng/ml.

- Ba thỏ của nhóm chứng được tiêm vào ổ bụng 4ml dung dịch NaCl 9%.

- Sau mũi tiêm 4 tại thời điểm 15 ngày tất cả các thỏ được lấy máu tai để định lượng kháng thể. Ở ngày thứ 20 sau mũi tiêm 4 huyết thanh được định lượng KT lại thấy nồng độ KT đã đạt đỉnh lập tức thu máu thỏ toàn bộ để tủa loại bỏ albumin và đông khô để bảo quản kháng huyết thanh ở  $-80^{\circ}\text{C}$  (bảng 2.7)

*Bảng 2.7. Công thức chia nhóm và dung dịch tiêm miễn dịch*

Mũi tiêm	Dung dịch tiêm gây miễn dịch		Đường tiêm
	Nhóm thí nghiệm	Nhóm chứng	
Mũi 1	2ml polEPCA-2 + 2ml Freund' Adjuvant hoàn toàn	2ml NaCl 9% + 2ml Freund' Adjuvant hoàn toàn	Tiêm cơ đùi
Mũi 2	2ml polEPCA-2 + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	2ml NaCl 9% + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	Tiêm cơ đùi
Mũi 3	2ml polEPCA-2 + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	2ml NaCl 9% + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	Tiêm cơ đùi
Lấy máu tĩnh mạch rìa tai thỏ, định lượng kháng thể trong huyết thanh			
Mũi 4	4ml polEPCA -2	4ml NaCl 9%	Tiêm ổ bụng

Quá trình gây miễn dịch được lặp lại 3 lần trên 3 lô thỏ độc lập.

### **2.8.2.3. Kỹ thuật phân lập albumin bằng phương pháp tủa của Rodkey[109]**

Mục đích của kỹ thuật này là loại bỏ albumin trong kháng huyết thanh thô. Kỹ thuật sử dụng nguyên tắc tủa protein bằng muối trichloroacetate acid 2% (TCA 2%) và ethanol 84,5%.

#### *Tiến hành*

- Ly tâm máu thô tốc độ 1500 vòng/ phút trong 15 phút
- Thu lấy phần huyết thanh
- Thêm TCA 2% và ethanol 84,5% vào ống huyết thanh thô theo tỷ lệ cứ 0,2ml huyết thanh thô thì thêm 5 ml (gồm TCA 2% và ethanol 84,5%)
- Lắc mạnh ống sau đó đặt ống đứng ống ở nhiệt độ phòng lắc nhẹ ngắt quãng trong 2 giờ.
- Ly tâm 800 vòng/ phút trong 10 phút để làm lắng các globulin.
- Loại bỏ albumin là phần kết tủa trắng nổi lên trên.
- Dung dịch Globulin thu được, rửa sạch lại với TCA 2% trong ethanol 84,5% để thực hiện tiếp các kỹ thuật ELISA ở sau.

### **2.8.2.4 Kỹ thuật ELISA xác định nồng độ và tính đặc hiệu của kháng thể thô thu được với polEPCA-2.**

Kỹ thuật được thực hiện theo nguyên lý ELISA gián tiếp. Protein EPCA-2.22,2.19 được cố định trước trên đáy giếng. Tiếp theo ủ các giếng với kháng thể thô đặc hiệu EPCA-2.22,2.19. Các kháng thể không đặc hiệu được loại bỏ bằng bước rửa. Tiếp tục ủ với kháng thể kháng kháng thể thô có gắn enzyme. Nhờ cơ chất để kiểm tra phản ứng lên màu của phức hợp polEPCA-2 kết hợp kháng thể đặc hiệu. Dừng phản ứng bằng acid sulfuric. Mức độ lên màu được đo quang phổ ở bước sóng  $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ . Nồng độ kháng thể được suy ra từ giá trị OD dựa trên đường chuẩn kit của hãng Cusabio.

*Qui trình kỹ thuật được thực hiện như sau:*

1. Phủ mỗi giếng nhựa làm bằng polystyren 100  $\mu$ l dung dịch polePCA-2.22, 2.19 nồng độ 87ng/ml được pha trong Coating buffer. Phủ giấy bạc, ủ 4<sup>0</sup>C qua đêm để đảm bảo polePCA được cố định tốt trên đáy giếng.
2. Loại hết dịch trong giếng
3. Rửa 3 lần với PBS 1X + Tween 20 và rửa 3 lần với PBS 1X
4. Phủ mỗi giếng với 200  $\mu$ l PBS+2% skim milk.
5. Ủ ở nhiệt độ phòng ít nhất 1 - 2 giờ. Để bất hoạt các vị trí gắn không đặc hiệu chỉ để lại các vị trí gắn polePCA.
6. Rửa 3 lần với PBS 1X + Tween 20. Rửa 3 lần với PBS 1X
7. Phủ mỗi giếng 100  $\mu$ l kháng thể thử
8. Phủ kín giếng ủ ở 37<sup>0</sup> C trong 2 giờ ( hoặc 4<sup>0</sup>C qua đêm )
9. Rửa 3 lần với PBS 1X + Tween 20. Rửa 3 lần với PBS 1X
10. Phủ 100  $\mu$ l cho một giếng kháng thể kháng thử gắn enzyme (HRP)
11. Ủ các giếng ở 37<sup>0</sup> C trong 1- 2 giờ
12. Rửa 3 lần với PBS 1X + Tween 20. Rửa 3 lần với PBS 1X
13. Bổ xung 100  $\mu$ l cơ chất TMB cho một giếng
14. Ủ ở nhiệt độ phòng 10 -15 phút
15. Dừng phản ứng bằng nhỏ 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N cho một giếng
16. Đọc kết quả ở bước sóng 450nm trên dàn máy ELISA, các kết quả được lưu giữ trên máy tính.



### **2.8.3. Kỹ thuật ELISA xác định EPCA-2.**

#### **2.8.3.1. Định lượng EPCA-2 bằng kỹ thuật ELISA sử dụng kháng thể thỏ đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 tái tổ hợp.**

Kỹ thuật ELISA sử dụng KT thỏ đặc hiệu polEPCA-2 được thực hiện theo nguyên lý ELISA sandwich. Kháng thể thỏ đặc hiệu được cố định trước trên đáy giếng. Bất hoạt các vị trí gắn không phải là protein bằng dung dịch sữa (skim milk). Huyết thanh cần thử hoặc các chứng dương (pol EPCA-2 tái tổ hợp) sẽ được ủ vào các giếng, với giếng blank dung dịch ủ là nước cất. Ở các giếng thử, mẫu ủ là huyết thanh của bệnh nhân UTTTL, huyết thanh có EPCA-2 sẽ kết hợp với kháng thể trên đáy giếng. Sau bước rửa các giếng được bổ xung tiếp kháng thể cộng hợp. Các kháng thể cộng hợp không gắn sẽ bị loại bằng bước rửa tiếp theo. Nhỏ cơ chất để kiểm tra phản ứng lên màu của phức hợp EPCA-2 và kháng thể. Dừng phản ứng bằng acid sulfuric. Mức độ lên màu được đo quang phổ ở bước sóng  $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ . Nồng độ được suy ra từ giá trị OD dựa trên đường chuẩn kit của hãng CUSABIO. Mỗi mẫu thử được lặp lại qui trình trên 3 lần với 3 lần ủ mẫu độc lập. Trong mỗi lần thử đều có nội chuẩn với polEPCA-2 chuẩn và đối chứng với kết quả của kit xác định EPCA-2, hãng CUSABIO.

*Qui trình kỹ thuật được tiến hành theo các bước:*

1. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  huyết thanh thử cho mỗi giếng thử
2. Ủ ở 4°C từ 8- 16 giờ để kháng thể hấp phụ tốt trên đáy giếng.
3. Rửa 3 lần với đệm PBS 1X-Tween 20, 3 lần với đệm PBS 1X
4. Nhỏ 200 $\mu\text{l}$  skim milk vào mỗi giếng và ủ trong 2 giờ. để bất hoạt các vị trí gắn không đặc hiệu trên đáy giếng.
5. Rửa 3 lần với đệm PBS 1X-Tween 20, 3 lần với dung dịch đệm PBS 1X
6. Tiếp tục nhỏ 100 $\mu\text{l}$ :huyết thanh cần thử cho mỗi giếng thử, là dung dịch polEPCA-2 nếu là giếng chứng dương, và là nước cất nếu là giếng blank.

7. Đậy kín các giếng và ủ ở 37°C trong 2 giờ để EPCA-2 có thể gắn tốt với các kháng thể đã được cố định trên đáy giếng.

8. Sau 2 giờ hút hết dịch trong giếng, rửa 3 lần với đệm PBS 1X-Tween 20, rửa 3 lần với đệm PBS 1X.

9. Nhỏ tiếp 100µl kháng thể cộng hợp vào mỗi giếng.

10. Đậy kín và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1-2 giờ.

11. Rửa 3 lần với đệm PBS 1X-Tween 20, 3 lần với đệm PBS 1X.

12. Bổ sung 100µl cơ chất TMB cho mỗi giếng.

13. Ủ ở nhiệt độ phòng 10-15 phút. Enzyme (nếu có gắn) trong phức hợp kháng nguyên kháng thể sẽ thúc đẩy phản ứng đổi màu cơ chất TMB từ xanh tím thành màu hồng.

14. Nhỏ 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N không màu để dừng phản ứng. Các giếng màu hồng sẽ chuyển màu vàng.

15. Đo OD ở bước sóng 450nm trên dàn máy ELISA Bio-Rad iMark™ (Có phần mềm lưu trữ và xử lý số liệu). Nồng độ EPCA-2 được định lượng dựa trên đường chuẩn của bộ Kít ELISA của CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

### **2.8.3.2 Định lượng EPCA-2 bằng kit ELISA của CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.**

Kỹ thuật ELISA sử dụng kit xác định EPCA-2 được thực hiện theo nguyên lý ELISA sandwich. Kháng thể đặc hiệu EPCA-2 của hàng được cố định trước trên đáy giếng. Huyết thanh cần thử hoặc các chứng dương sẽ được ủ vào các giếng, với giếng blank dung dịch ủ là nước cất. Ở các giếng thử, mẫu ủ là huyết thanh của bệnh nhân UT TTL. Nếu huyết thanh có EPCA-2 sẽ kết hợp với kháng thể trên đáy giếng. Bổ xung tiếp kháng thể cộng hợp cho các giếng. Các kháng thể cộng hợp không gắn với EPCA-2 sẽ bị loại bằng bước rửa. Nhỏ cơ chất để kiểm tra phản ứng lên màu của phức hợp EPCA-2

và kháng thể. Dừng phản ứng bằng acid sulfuric. Mức độ lên màu được đo quang phổ ở bước sóng  $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ . Nồng độ được suy ra từ giá trị OD dựa trên đường chuẩn kit của hãng CUSABIO.

*Qui trình kỹ thuật được tiến hành theo chỉ dẫn của hãng:*

1. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  huyết thanh bệnh nhân cho mỗi giếng thử.
2. Nhỏ 50 $\mu\text{l}$  kháng thể cộng hợp gắn enzyme (HRP-conjugate) cho mỗi giếng thử.
3. Đậy kín và ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ.
4. Hút sạch dịch trong giếng
5. Rửa 3 lần với dung dịch đệm để làm sạch các kháng thể gắn enzyme không được gắn vào phức hợp kháng nguyên kháng thể.
6. Bổ xung 50 $\mu\text{l}$  substrate A (TMB) và 50 $\mu\text{l}$  substrate B (buffer) cho một giếng.
7. Ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút.
8. Nhỏ 50 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N không màu để dừng phản ứng.
9. Sau 10 phút, các giếng được đo quang phổ ở bước sóng 450nm trên dàn máy ELISA Bio-Rad iMark TM (Có phần mềm lưu trữ và xử lý số liệu).

## **2.9. ĐỊA ĐIỂM TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU**

- Phòng thí nghiệm trọng điểm về công nghệ gen, Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam
- Bộ môn Sinh lí bệnh-Miễn dịch, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Các mẫu nghiên cứu được thu thập tại Bệnh viện Hữu Nghị Hà Nội.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. TẠO GEN TÁI TỔ HỢP MANG CÁC EPITOPE EPCA-2 BẰNG PHƯƠNG PHÁP TÁI TỔ HỢP.

##### 3.1.1. Tạo vector tái tổ hợp mang gen polEPCA-2

Vector pET-28a(+) nguồn gốc từ hãng Novagen (Mỹ) đã được lựa chọn làm vector biểu hiện. Vector này được thiết kế để có thể mang gen ngoại lai, biểu hiện trong tế bào *E.coli* và cho sản phẩm protein mong muốn dưới dạng tiết. Sản phẩm protein dưới dạng tiết sẽ rất thuận lợi cho bước tinh sạch và thu nhận protein sau này.

Trong vùng cắt gán đa vị của vector này có vị trí nhận biết của 2 enzyme *Nco* I và *Not* I. Gen *polEPCA-2* với trình tự chứa 2 epitop của gen mã hóa kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm (EPCA-2) được lặp lại 8 lần nối đuôi nhau do nhóm nghiên cứu thiết kế. Gen *polEPCA-2* trong vector tách dòng pBSK-GS53545 đặt hàng tổng hợp từ hãng Cosmo Genetech. Ở 2 đầu của gen cũng có vị trí nhận biết 2 enzyme *Nco* I và *Not* I. Trình tự của gen *polEPCA-2* được thể hiện trong hình 3.1.

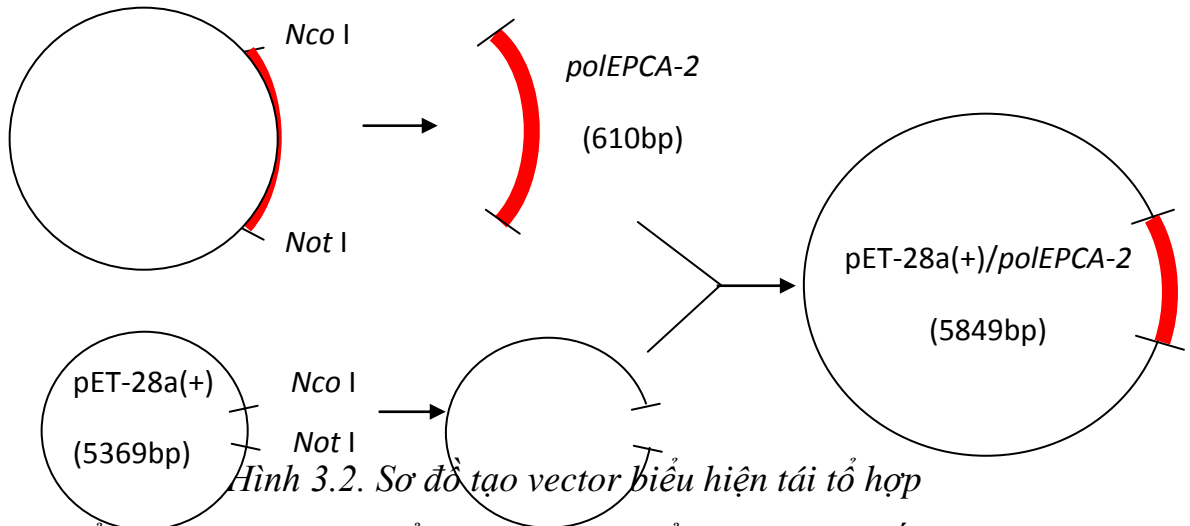
*Nco* I

T ACCAATGGGGGTGATTCAGCCGTATCCGAACTTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCG  
CGCAGGATAACGATCTGCCACCACCAGTGATTCAGCCGTATCCGAACTTTTATATGGTG  
GCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACCAGTGATTCAGCCGTATCC  
GAACTTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACCAG  
TGATTCAGCCGTATCCGAACTTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAAC  
GATCTGCCACCACCAGTGATTCAGCCGTATCCGAACTTTTATATGGTGGCCGGCGGG  
CTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACCAGTGATTCAGCCGTATCCGAACTTTTATA

TGGTGGCCGGCGGCGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACCAGTGATTCAGCCG  
 TATCCGAAC TTTTATATGGTGGCCGGCGGCGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACC  
 ACCAGTGATTCAGCCGTATCCGAAC TTTTATATGGTGGCCGGCGGCGGCTTCGCGCAGG  
 ATAACGATCTG GCGGCCGCA

↑  
Not I

Hình 3.1. Trình tự gen *polEPCA-2* (Phần in nghiêng đậm gạch bên dưới là vị trí nhận biết của *Nco I* và *Not I*)

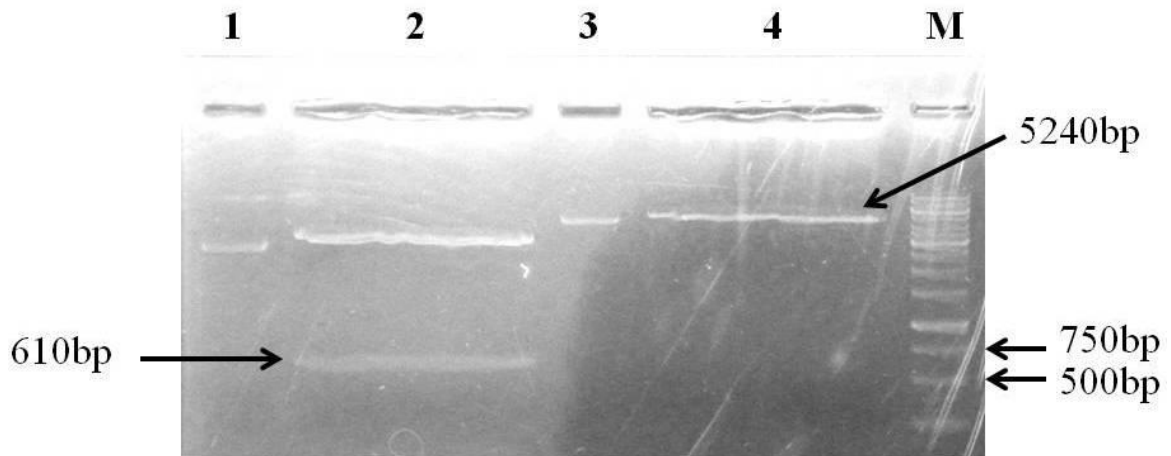


Hình 3.2. Sơ đồ tạo vector biểu hiện tái tổ hợp

Để tạo được vector biểu hiện gen tái tổ hợp, trước hết chúng tôi nuôi hoạt hóa một chủng chứa vector tách dòng mang gen *polEPCA-2* và một chủng *E.coli* chứa vector pET-28a(+) gốc. Sau đó chúng tôi tiến hành tách plasmid thu lượng lớn 2 loại DNA- plasmid này. Tiếp đó, xử lý 2 loại vector này với 2 enzym cắt giới hạn *Nco I* và *Not I* ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 0,8% và tinh sạch (bằng kit Gene JET™ Gel Extraction Kit (Fermentas) để thu được lượng lớn gen *polEPCA-2* và vector pET-28a(+) với 2 đầu dính tương ứng. Hai sản phẩm sau cắt này sẽ được gắn với nhau nhờ tác dụng của enzyme *T4 DNA Ligase*. Kết quả sẽ tạo được vector biểu hiện tái tổ hợp như hình 3.2.

### 3.1.1.1. Cắt vector tách dòng chứa gen *polEPCA-2* và cắt vector biểu hiện *pET-28a(+)* gốc bằng 2 enzym cắt giới hạn *Nco I* và *Not I*

Kết quả điện di sản phẩm phản ứng cắt gen *polEPCA-2* từ vector tách dòng và kết quả cắt vector gốc *pET-28a(+)* được thể hiện trên hình 3.3.



Hình 3.3. Kết quả cắt gen *polEPCA-2* và *pET-28a(+)* bằng 2 enzym *Nco I* và *Not I*

Giếng 1, 3: Vector *pBSK-GS53545/polEPCA-2* và *pET-28a(+)* gốc.

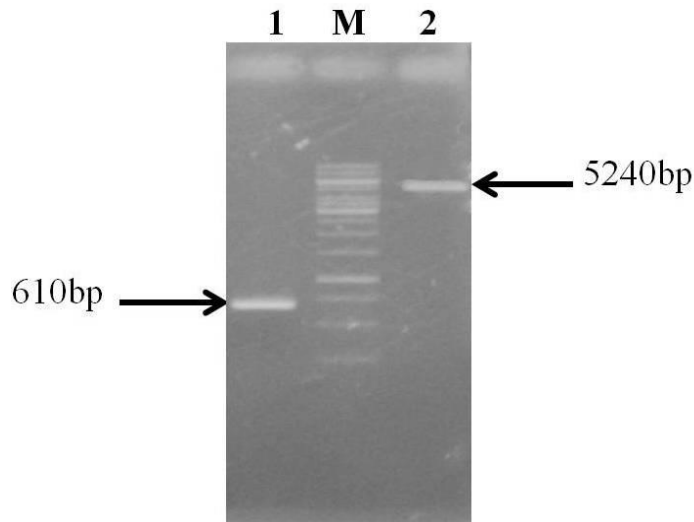
Giếng 2, 4: Vector *pBSK-GS53545/polEPCA-2* và *pET-28a(+)* cắt với *Nco I* và *Not I*

M: Marker DNA 1kb

**Nhận xét:** Trên ảnh điện di hình 3.3 cho thấy ở giếng 2 là sản phẩm cắt từ vector tách dòng tạo ra 2 băng sáng trong đó có một băng kích thước khoảng 610 bp, tương ứng với kích thước lý thuyết của gen *polEPCA-2* có 2 đầu dính. Đây là đoạn mong muốn thứ nhất. Ở giếng 4 là sản phẩm cắt từ vector *pET-28a(+)* gốc sẽ tạo một đoạn lớn kích thước khoảng 5240 bp và một đoạn ngắn giữa vị trí cắt của 2 enzym kích thước khoảng 130 bp. Đoạn ngắn này sẽ chạy ra khỏi bản điện di. Kết quả là sản phẩm cắt từ vector *pET-28a(+)* gốc sẽ cho 1 băng sáng chứa đoạn lớn có 2 đầu dính. Đây là đoạn mong muốn thứ hai.

### 3.1.1.2. Tinh sạch bằng phương pháp thổi gel thu gen *polEPCA-2* và vector *pET-28a(+)* với 2 đầu dính tương ứng

Sau khi tinh sạch bằng phương pháp thổi gel sử dụng kit Gene JET™ Gel Extraction Kit (Fermentas) thu được lượng lớn gen *polEPCA-2* và vector pET-28a(+) với 2 đầu dính tương ứng.



Hình 3.4. Kiểm tra sản phẩm tinh sạch gen *polEPCA-2* và pET-28a(+) với 2 đầu dính tương ứng. Giếng 1: Sản phẩm tinh sạch gen *polEPCA-2* với 2 đầu dính tương ứng. Giếng 2: Sản phẩm tinh sạch vector pET-28a(+) với 2 đầu dính tương ứng. M: Marker DNA 1kb

**Nhận xét:** Mỗi sản phẩm tinh sạch chỉ chứa 1 băng duy nhất chứng tỏ sản phẩm tinh sạch không bị lẫn với các đoạn DNA khác. Ở giếng 1, băng có kích thước khoảng 610 bp, tương ứng với kích thước lý thuyết của gen *polEPCA-2* có 2 đầu dính. Ở giếng 2, băng có kích thước khoảng 5240 bp, tương ứng kích thước của vector pET-28a(+) với 2 đầu dính. Hai sản phẩm này sẽ được gắn với nhau để tạo vector biểu hiện tái tổ hợp (hình 3.4).

### 3.1.1.3. Phản ứng gắn gen *polEPCA-2* và vector pET-28a(+) với 2 đầu dính tương ứng

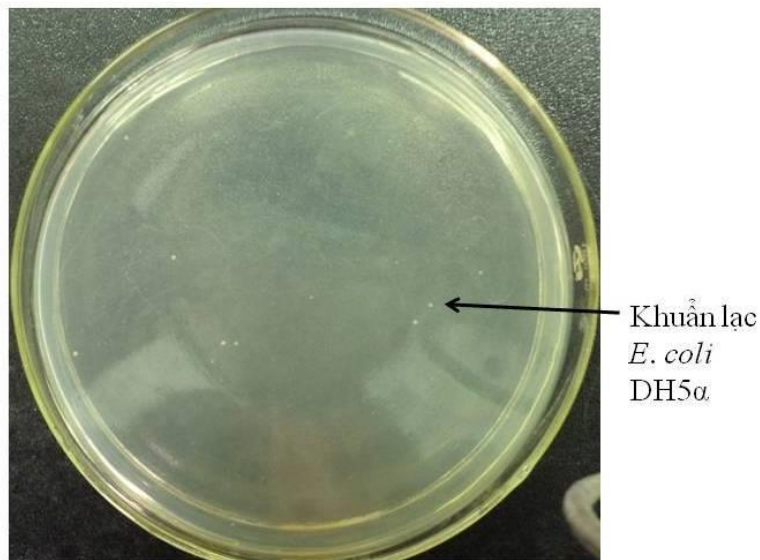
Đoạn gen *polEPCA-2* có 2 đầu dính sau khi tinh sạch từ gel agarose sẽ được gắn vào vector pET-28a(+) cũng có 2 đầu dính tương ứng nhờ enzyme *T4 DNA ligase* tạo vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2*.

Hỗn hợp phản ứng gắn sẽ được biến nạp vào *E.coli* chủng DH5 $\alpha$ . Mục đích của việc đưa vector biểu hiện tái tổ hợp vào chủng tách dòng *E.coli* DH5 $\alpha$  là để dễ dàng chọn được dòng mong muốn và thu được lượng lớn bản sao DNA-plasmid của dòng đó rồi mới đưa vào chủng biểu hiện. Làm như vậy khả năng chúng tôi thu được chủng biểu hiện mang vector biểu hiện có chứa gen *polEPCA-2* sẽ cao hơn.

#### 3.1.1.4. Chọn dòng tế bào mang gen *polEPCA-2*

Sản phẩm biến nạp được trải trên môi trường thạch có chứa kháng sinh kanamycin để tạo ra khuẩn lạc riêng rẽ và mang vector biểu hiện tái tổ hợp (trên vector này có gen kháng kháng sinh kanamycin). Theo lý thuyết, chỉ những tế bào chứa vector biểu hiện tái tổ hợp mới mọc được trên môi trường này.

Hình 3.5 thể hiện có 8 khuẩn lạc mọc khi trải sản phẩm biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào *E.coli* chủng DH5 $\alpha$ . Các khuẩn lạc này đều có đặc điểm dạng tròn, lồi, màu trắng phù hợp với đặc điểm khuẩn lạc của tế bào *E.coli*.



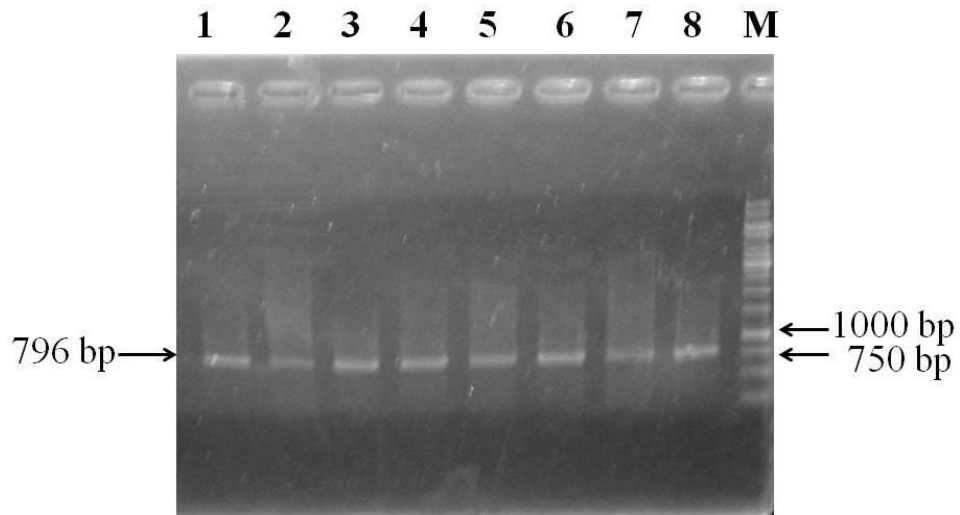
Hình 3.5. Đã biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp *pET28a(+)/polEPCA-2* vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 $\alpha$

Chúng tôi lấy 8 khuẩn lạc để kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp với cặp mồi của vector *pET-28a(+)* là T7 F và T7 R. Theo tính toán trong



thiết kế, khi tiến hành PCR sử dụng cặp mồi này sẽ khuếch đại đoạn của vector biểu hiện tái tổ hợp có chứa gen *polEPCA-2*.

Kết quả chọn dòng *E.coli* DH5 $\alpha$  chứa vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2* được thể hiện trên hình 3.6.



Hình 3.6. Kết quả PCR với cặp mồi T7F/R

Giếng 1→ 8: Sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc 1→ 8

Giếng M: Thang marker DNA 1 kb

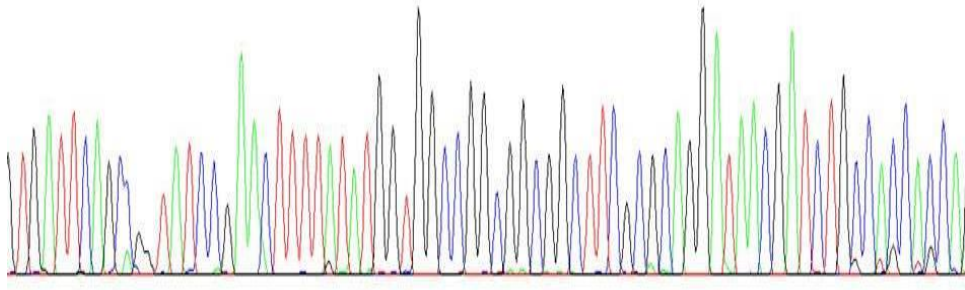
**Nhận xét:** Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm PCR của gen *polEPCA-2* khi chạy với cặp mồi T7F/R sẽ có kích thước 796 bp. Trên ảnh điện di ở mỗi giếng đều xuất hiện 1 băng sáng nằm cao hơn băng marker 750 bp một chút, không có sản phẩm phụ (hình 3.6). Như vậy, chúng tôi đã thu được cả 8 chủng đều chứa vector biểu hiện tái tổ hợp có mang gen *polEPCA-2*. Tuy nhiên, để có thể khẳng định chắc chắn gen đã được đưa vào vector đúng chiều, đúng khung đọc và sẽ dịch mã ra protein mong muốn, chúng tôi chọn 4 dòng (dòng 1, 3, 4, 6) để giải trình tự.

### 3.1.1.5. Xác định trình tự gen trong vector biểu hiện tái tổ hợp

Chúng tôi sử dụng plasmid tái tổ hợp của dòng 1, 3, 4, 6 làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi của vector pET-28a(+) là T7 F và T7 R, sau đó

ting sạch sản phẩm PCR. Mẫu thu được đem xác định trình tự bằng máy giải trình tự tự động. Một đoạn kết quả giải trình tự được thể hiện trong hình 3.7.

GTGATTCAGCCGATCCGAACCTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACCA



Hình 3.7. Một đoạn kết quả giải trình tự gen *polEPCA-2*

Trình tự gen *polEPCA-2* và trình tự acid amin suy diễn chúng tôi thu được được thể hiện trên hình 3.8.

```

          10          20          30          40          50          60
ACCATGGGGGTGATT CAGCCGATCCGAAC TTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCG
T M G V I Q P Y P N F Y M V A G G G F A
          70          80          90          100          110          120
CAGGATAACGATCTGCCACCACAGTGATT CAGCCGATCCGAAC TTTTATATGGTGGCC
Q D N D L P P P V I Q P Y P N F Y M V A
          130          140          150          160          170          180
GGCGGGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACAGTGATT CAGCCGATCCGAAC
G G G F A Q D N D L P P P V I Q P Y P N
          190          200          210          220          230          240
TTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACAGTGATT
F Y M V A G G G F A Q D N D L P P P V I
          250          260          270          280          290          300
CAGCCGATCCGAAC TTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTG
Q P Y P N F Y M V A G G G F A Q D N D L
          310          320          330          340          350          360
CCACCACAGTGATT CAGCCGATCCGAAC TTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCG
P P P V I Q P Y P N F Y M V A G G G F A
          370          380          390          400          410          420
CAGGATAACGATCTGCCACCACAGTGATT CAGCCGATCCGAAC TTTTATATGGTGGCC
Q D N D L P P P V I Q P Y P N F Y M V A
          430          440          450          460          470          480
GGCGGGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACAGTGATT CAGCCGATCCGAAC
G G G F A Q D N D L P P P V I Q P Y P N
          490          500          510          520          530          540
TTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTGCCACCACAGTGATT
F Y M V A G G G F A Q D N D L P P P V I
          550          560          570          580          590          600
CAGCCGATCCGAAC TTTTATATGGTGGCCGGCGGGCTTCGCGCAGGATAACGATCTG
Q P Y P N F Y M V A G G G F A Q D N D L
          610          620          630

GGCGCCCACTCGAGCACACCACCACCACCACTGA
A A A L E H H H H H H End

```

Hình 3.8. Trình tự gen *polEPCA-2* trong vector *pET-28a(+)* và trình tự acid amin suy diễn

**Nhận xét:** Từ trình tự DNA trong hình 3.8 có thể thấy đoạn gen ngoại lai (*polEPCA-2*) khi đưa vào vector *pET-28a(+)* đã có đầy đủ bộ ba mở đầu (ATG), bộ ba kết thúc (TGA) và 6 bộ ba mã hóa cho Histidin (CAC CAC CAC CAC CAC CAC) nằm trước bộ ba kết thúc, phục vụ cho việc tinh sạch protein sau này. Dịch mã bắt đầu từ bộ ba mở đầu trên, chúng tôi thu được trình tự acid amin suy diễn.

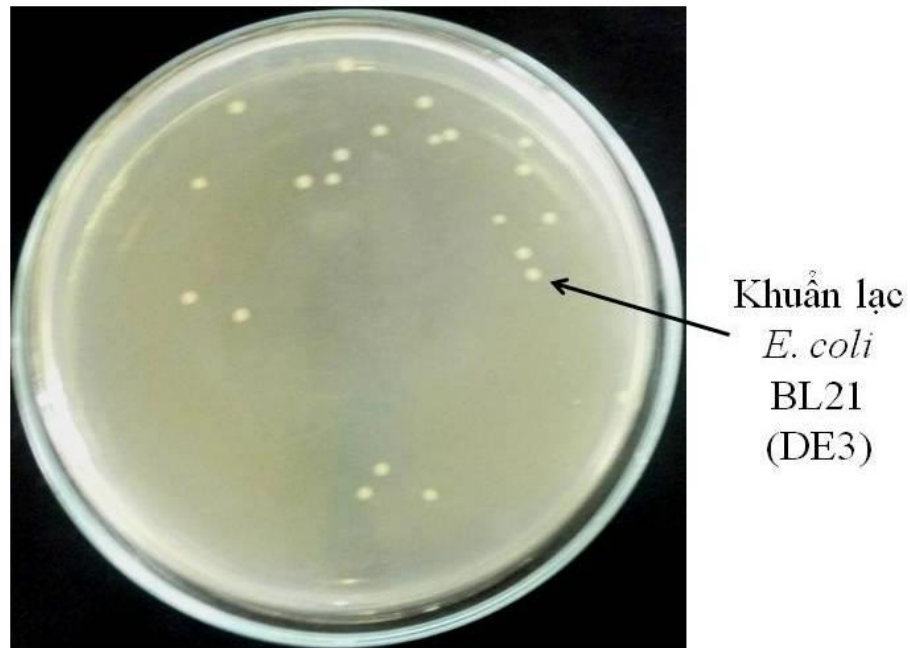
Kết quả dịch mã thu được trình tự protein nguyên vẹn gồm 210 acid amin tương ứng với khối lượng phân tử khoảng 23,1 kDa. Đến đây chúng tôi

có thể khẳng định đã gắn được gen *polEPCA-2* vào vector pET-28a(+) đúng chiều và đúng khung đọc.

### 3.1.2. Biểu hiện vector tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* chủng BL21 (DE3)

#### 3.1.2.1. Biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2* vào vi khuẩn *E.coli* BL21 (DE3)

Sau khi đã xác định được đúng trình tự gen *polEPCA-2* trong vector biểu hiện pET-28a(+) của cả 4 dòng (dòng 1, 3, 4, 6), chúng tôi biến nạp plasmid của cả 4 dòng vào chủng biểu hiện *E.coli* BL21 (DE3). Chúng tôi tiến hành biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào *E.coli* khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau khi biến nạp, dịch nuôi được trải trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 µg/mL và nuôi ở 37 °C qua đêm nhận thấy cả 4 dòng đều mọc tốt. Kết quả biến nạp được thể hiện ở hình 3.9.



Hình 3.9. Đĩa biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2* vào tế bào *E. coli* chủng BL21 (DE3)

**Nhận xét:** Trên đĩa nuôi cấy có nhiều khuẩn lạc với đặc điểm tròn, lồi, màu trắng. Các khuẩn lạc mọc lên chắc chắn có vector biểu hiện, vì trong

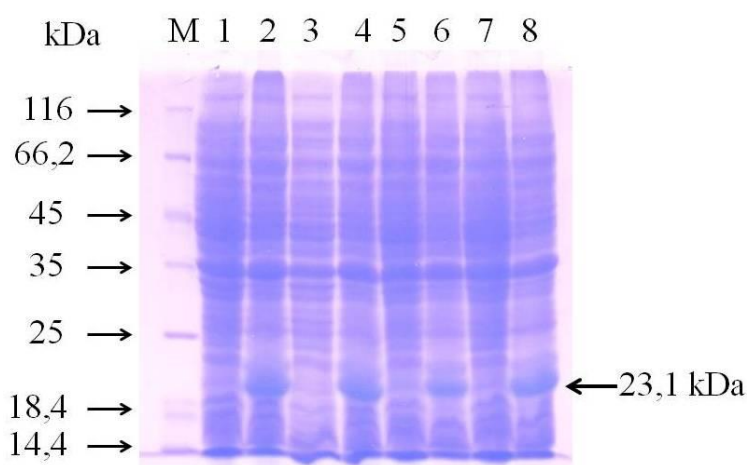
vector có chứa đoạn gen mã hóa tính kháng kanamycin, những tế bào không mang vector sẽ không thể tồn tại được trong môi trường nuôi cấy có kanamycin. Như vậy, có thể kết luận đã biến nạp thành công vector biểu hiện vào tế bào *E.coli* BL21 (DE3)(hình 3.9).

### 3.1.2.2. Nuôi biểu hiện và kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamid

Mỗi dòng chọn 1 khuẩn lạc phát triển tốt và mọc riêng rẽ được nuôi hoạt hóa trong môi trường LB lỏng có kháng sinh kanamycin qua đêm ở 37°C, lắc 220 vòng/phút. Sau đó, dịch nuôi được cấy chuyển 2% sang môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin, nuôi đến khi OD<sub>600nm</sub> đạt 0,6- 0,8 (khoảng 1,5-2 giờ). Cảm ứng bằng IPTG với nồng độ cuối là 0,4 mM, tiếp tục nuôi lắc 220 vòng/phút qua đêm ở 37°C.

Chất cảm ứng IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) rất cần thiết cho việc khởi đầu tổng hợp protein. IPTG làm cho operon Lac chuyển từ trạng thái bất hoạt sang trạng thái hoạt động và protein được tổng hợp.

Kết quả phân tích protein tái tổ hợp trên điện di gel SDS- polyacrylamid 12,6% và nhuộm gel bằng Coomassie Blue R250 thể hiện ở hình 3.10.



Hình 3.10. Kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp trong *E.coli* BL21 (DE3) (M): thang marker protein. (1, 3, 5, 7): Mẫu trước cảm ứng các dòng 1, 3, 4, 6.(2, 4, 6, 8): Mẫu sau cảm ứng các dòng 1, 3, 4, 6.

**Nhận xét:** Quan sát hình 3.10 cho thấy ở giếng 2, 4, 6, 8 (mẫu được cảm ứng bằng IPTG) xuất hiện 1 băng protein đậm, khác biệt hẳn so với các mẫu trước cảm ứng ở giếng 1, 3, 5, 7. Vị trí của băng protein này nằm dưới băng 25 kDa và trên băng 18,4 kDa của thang protein chuẩn, trong khi đó kích thước lý thuyết của đoạn protein tái tổ hợp của chúng tôi là 23,1 kDa. Như vậy, cả 4 dòng *E.coli* (dòng 1, 3, 4, 6) đều biểu hiện được protein polyepitop của kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm (protein polEPCA-2). Chúng tôi lựa chọn dòng 3 để làm các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.1.2.3. Khảo sát điều kiện thích hợp cho quá trình biểu hiện

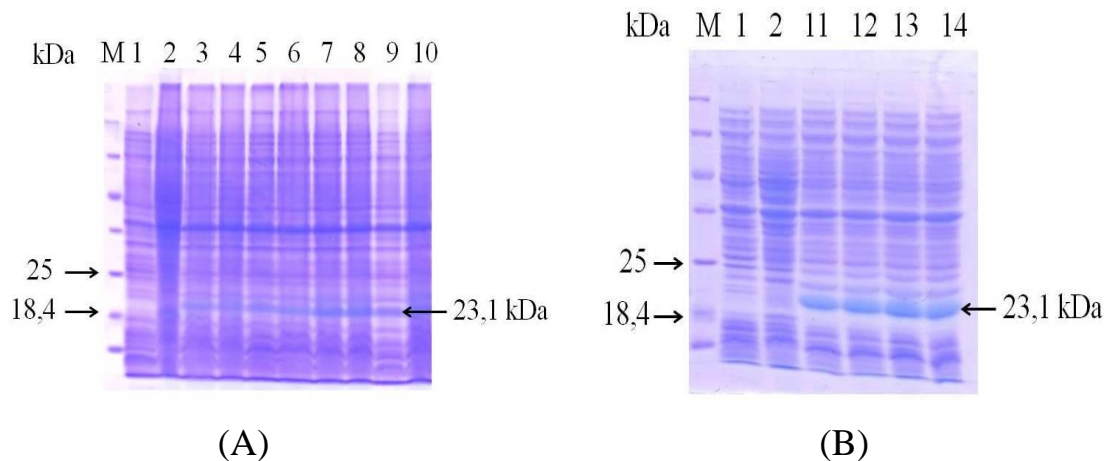
❖ *Khảo sát sự biểu hiện của protein tái tổ hợp ở nồng độ IPTG và thời gian khác nhau*

Từ ống giữ chủng của dòng 3, chúng tôi nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin với nồng độ cuối là 50 µg/mL, lắc 220 vòng/phút, ở 37 °C. Sau đó, dịch nuôi được cấy chuyển 2% sang môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin trong 4 ống Falcon và nuôi tiếp để OD đạt 0,6- 0,8 (khoảng 1,5- 2 giờ). Hút 1 mL thu tế bào làm mẫu trước cảm ứng. Hút 1mL dịch tế bào tiếp tục nuôi để có mẫu không cảm ứng nuôi cùng. Phần còn lại trong 4 ống falcon được cảm ứng với IPTG ở các nồng độ là 0,2 mM; 0,4 mM; 0,8 mM và 1 mM. Tiếp tục nuôi lắc 220 vòng/phút, 37 °C. Sau 3 giờ và 5 giờ từ thời điểm cảm ứng lấy 1 mL từ các ống falcon. Mẫu cảm ứng qua đêm cũng hút 1 mL thu tế bào kiểm tra trên gel polyacrylamid 12,6%. Cụ thể các nồng độ IPTG và thời gian thu mẫu được thể hiện trong bảng 3.1.

*Bảng 3.1. Nồng độ IPTG và thời gian khảo sát sự biểu hiện protein tái tổ hợp*

[IPTG]				
Thời gian sau cảm ứng	0,2 mM	0,4 mM	0,8 mM	1 mM
3 giờ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
5 giờ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Qua đêm (khoảng 20 giờ)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Kiểm tra sự biểu hiện của vector tái tổ hợp ở các nồng độ cảm ứng IPTG và thời gian khác nhau trên hình 3.11.



**Hình 3.11.** Kiểm tra sự biểu hiện protein tái tổ hợp ở các nồng độ IPTG theo thời gian; (M): Thang marker protein. (1): Mẫu trước cảm ứng. (2): Mẫu không cảm ứng nuôi cùng. (3→ 6): Mẫu sau cảm ứng 3 giờ với các nồng độ IPTG 0,2 mM→ 1 mM. (7→ 10): Mẫu sau cảm ứng 5 giờ với các nồng độ IPTG 0,2 mM→ 1 mM. (11→ 14): Mẫu sau cảm ứng qua đêm với các nồng độ IPTG 0,2 mM→ 1 mM

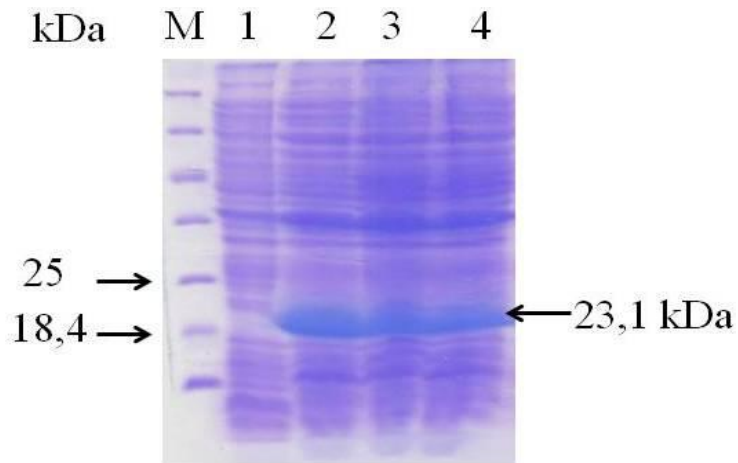
**Nhận xét:** Hình 3.11 cho thấy ở tất cả các mẫu cảm ứng (giếng 3→ 14) đều xuất hiện 1 băng protein, khác biệt so với các mẫu trước cảm ứng (giếng 1) và mẫu không cảm ứng nuôi cùng (giếng 2). Băng biểu hiện này cũng nằm dưới băng 25 kDa và trên băng 18,4 kDa của thang protein chuẩn, tương đương kích thước theo tính toán. Khi so sánh các mẫu sau cảm ứng, lượng protein tái tổ hợp thu được ở mẫu cảm ứng qua đêm nhiều hơn cả so với thời điểm 3 giờ và 5 giờ. Đồng thời, tại các nồng độ IPTG khác nhau trong cùng một thời điểm, lượng protein tái tổ hợp khác nhau không nhiều. Vì vậy chúng tôi lựa chọn nồng độ IPTG cảm ứng tối thiểu là 0,2 mM và thời gian cảm ứng là qua đêm.

❖ *Khảo sát sự biểu hiện ở nhiệt độ khác nhau*

Nhiệt độ cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới năng suất biểu hiện protein tái tổ hợp. Trong thí nghiệm này, nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0,2



mM; thời gian cảm ứng là qua đêm được giữ cố định để khảo sát sự biểu hiện protein tái tổ hợp theo nhiệt độ (37°C, 30°C và 18°C). Kết quả thể hiện trong hình 3.12.

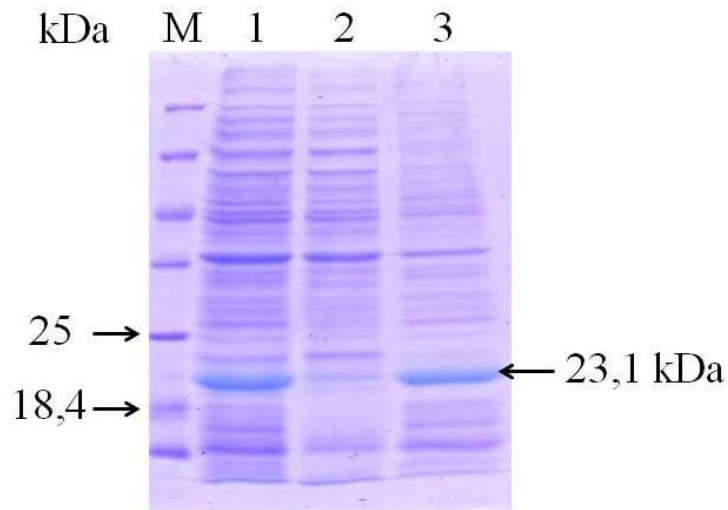


*Hình 3.12. Kiểm tra sự biểu hiện protein tái tổ hợp ở các nhiệt độ khác nhau*  
*Giếng M: Thang marker protein, (1): Mẫu trước cảm ứng. (2, 3, 4):*  
*Mẫu cảm ứng ở 37 °C, 30 °C và 18 °C.*

**Nhận xét:** Trên hình 3.12, lượng protein tái tổ hợp ở 37°C nhiều hơn ở 30°C và 18°C. Do đó, chúng tôi lựa chọn biểu hiện ở 37°C.

#### **3.1.2.4. Xác định khả năng hòa tan của protein**

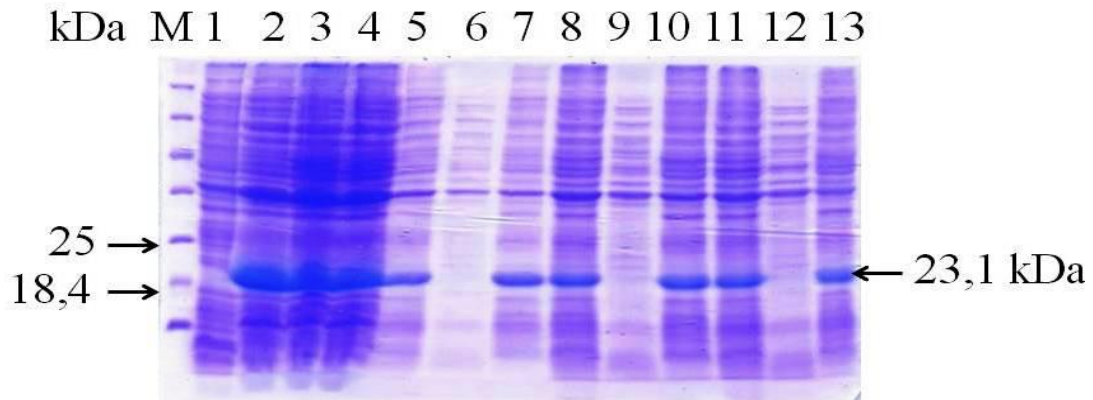
Để lựa chọn phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp thích hợp, chúng tôi tiến hành xác định khả năng hòa tan của protein này theo phương pháp đã nêu trong chương 2 và điện di kiểm tra trên gel polyacrylamid 12,6%, kết quả thể hiện ở hình 3.12.



Hình 3.13. Kiểm tra độ hòa tan của protein tái tổ hợp

(M): Thang marker protein. (1):mẫu tổng số. (2):mẫu hòa tan; (3): Mẫu cặn

**Nhận xét:** Khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp được đánh giá trên cơ sở so sánh giữa mẫu hòa tan và mẫu cặn đối chiếu với mẫu tổng số trong cùng một lần cảm ứng. Mẫu hòa tan là phần dịch nổi, mẫu này sẽ chứa các protein hòa tan. Mẫu cặn là phần cặn thu được sau khi phá tế bào bằng siêu âm và ly tâm, mẫu này chứa các protein không hòa tan. Hình 3.13 cho thấy protein tái tổ hợp có chủ yếu trong mẫu cặn, tức là dạng thể vùi, không hòa tan. Khi biểu hiện ở các nhiệt độ thấp hơn ( $30^{\circ}\text{C}$  và  $18^{\circ}\text{C}$ ) tính tan của protein cũng không được cải thiện, chúng vẫn tồn tại chủ yếu trong mẫu cặn (hình 3.14). Do đó, chúng tôi vẫn biểu hiện protein tái tổ hợp ở  $37^{\circ}\text{C}$  và không thể tinh sạch protein này ở điều kiện bình thường mà phải siêu âm phá tế bào và tinh sạch trong điều kiện biến tính.

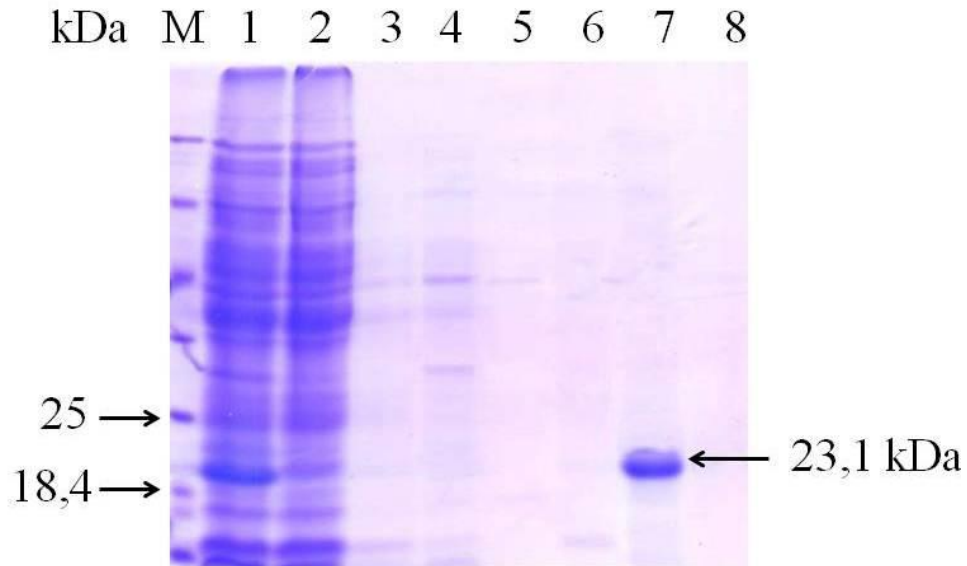


Hình 3.14. Kiểm tra độ hòa tan của protein tái tổ hợp ở các nhiệt độ khác nhau (M): Thang marker protein. (1): Mẫu trước cảm ứng. (2-4): Mẫu sau cảm ứng qua đêm với 0,2 mM IPTG ở 37 °C, 30 °C và 18 °C. (5-7): Mẫu tổng số, mẫu hòa tan, mẫu cặn khi biểu hiện ở 37 °C. (8-10): Mẫu tổng số, mẫu hòa tan, mẫu cặn khi biểu hiện ở 30 °C. (11-13): Mẫu tổng số, mẫu hòa tan, mẫu cặn khi biểu hiện ở 18 °C.

### 3.1.2.5. Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng Kit ProBond™ Nikel Resin

Do chúng tôi đã thiết protein tái tổ hợp có đuôi 6-Histidin có ái lực với  $\text{Ni}^{2+}$ , vì vậy chúng tôi sử dụng cột tinh sạch theo phương pháp sắc ký ái lực, với chất giá đỡ nhồi cột là agarose- $\text{Ni}^{2+}$ . Dịch tế bào biểu hiện được nuôi với lượng 100 mL, cảm ứng bằng IPTG với nồng độ cuối là 0,2 mM ở 37°C qua đêm. Sau khi ly tâm, cặn tế bào được hòa lại trong 8 mL dịch Denaturing Binding Buffer và siêu âm với thời gian phát sóng siêu âm là 20 phút. Dịch phá tế bào được ly tâm 12.000 vòng/phút, phần dịch nổi có chứa protein tái tổ hợp được đưa lên cột. Các protein có His- Tag sẽ có ái lực với  $\text{Ni}^{2+}$  và được bám chặt vào chất giá trên cột. Sau khi rửa bằng đệm rửa (DBB, DWB và NWB) các protein của *E.coli* sẽ bị trôi khỏi cột, chỉ còn lại các protein tái tổ hợp với His- Tag có ái lực với  $\text{Ni}^{2+}$  được giữ lại. Sau đó protein có ái lực ra khỏi cột nhờ buffer đẩy (NEB) với các nồng độ Imidazol là 100 mM, 250 mM và 500 mM. Chúng tôi thu 3 phân đoạn tương ứng với 3 nồng độ Imidazol gọi là phân đoạn  $I_{100\text{mM}}$ ,  $I_{250\text{mM}}$ ,  $I_{500\text{mM}}$ . Sau khi

ting sạch protein tái tổ hợp, sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamid 12,6% (Hình 3.15).



Hình 3.15. Kiểm tra sản phẩm tinh sạch protein polEPCA-2

(M): Thang marker protein. (1): Mẫu dịch siêu âm phá tế bào. (2): Mẫu dịch siêu âm sau qua cột. (3): Mẫu dịch rửa bằng dung dịch Denaturing Binding Buffer. (4): Mẫu dịch rửa bằng dung dịch Denaturing Wash Buffer. (5): Mẫu dịch rửa bằng dung dịch Native Wash Buffer. (6): Mẫu dịch thu phân đoạn  $I_{100mM}$ . (7): Mẫu dịch thu phân đoạn  $I_{250mM}$ . (8): Mẫu dịch thu phân đoạn  $I_{500mM}$

**Nhận xét:** Hình 3.15 cho thấy mẫu dịch siêu âm phá tế bào có chứa băng protein tái tổ hợp rất đậm, chứng tỏ đã biểu hiện được protein này khi nuôi cảm ứng biểu hiện lượng lớn (100 mL).

Mẫu dịch siêu âm sau qua cột còn lại rất ít sản phẩm protein tái tổ hợp. Điều này chứng tỏ protein tái tổ hợp đã được giữ trên cột, và lượng dịch nuôi cảm ứng 100 mL là phù hợp với khả năng gắn của cột.

Rửa cột bằng dung dịch DBB và DWB đã loại bớt nhiều protein khác gắn không đặc hiệu trên cột.

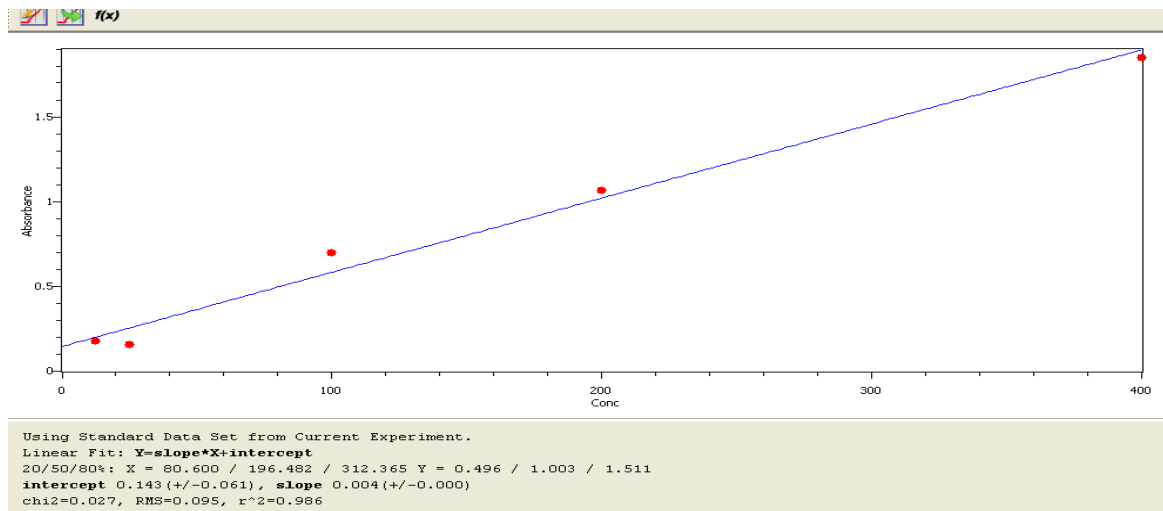
Trong phân đoạn  $I_{100\text{mM}}$  và  $I_{500\text{mM}}$  không thu được protein tái tổ hợp, còn ở phân đoạn  $I_{250\text{mM}}$  thu được protein tái tổ hợp với một băng duy nhất ở vị trí dưới băng 25 kDa và trên băng 18,4 kDa của thang protein chuẩn, tương ứng kích thước như tính toán (23,1 kDa). Như vậy, protein polEPCA-2 đã được tinh sạch thành công bằng cột sắc ký ái lực His-Tag, sản phẩm này có thể sử dụng để làm các thí nghiệm tiếp theo.

### **3.1.2.6. Xây dựng đường chuẩn định lượng kháng nguyên hoặc kháng thể**

Để có thể tính được nồng độ kháng nguyên hay kháng thể dựa trên sự kết hợp đặc hiệu của kháng nguyên và kháng thể cần dựa trên đường chuẩn với các điểm chuẩn nồng độ biết trước. Đường chuẩn này còn sử dụng cho các bước định lượng kháng nguyên sau này. Chúng tôi tiến hành dựng đường chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất ( Kit xác định EPCA-2, CSB-EQ 027679HU )

*Bảng 3.2: Các nồng độ EPCA-2 của đường chuẩn Kít ELISA (CSB-EQ 027679HU)*

<b>TT</b>	<b>Nồng độ ( ng/ml)</b>	<b>Giá trị OD</b>
<b>1</b>	<b>12,5</b>	0.069
<b>2</b>	<b>25</b>	0.077
<b>3</b>	<b>100</b>	0.184
<b>4</b>	<b>200</b>	0.288
<b>5</b>	<b>400</b>	0.591



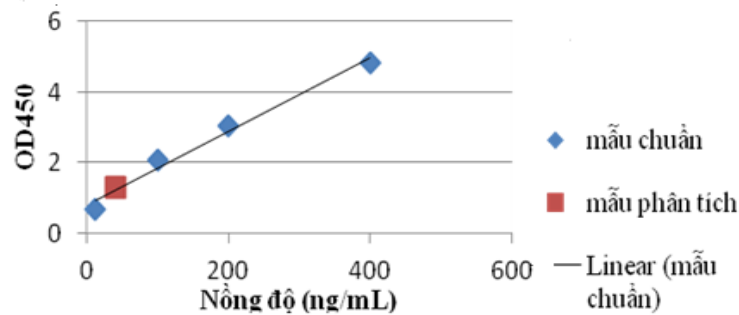
Hình 3.16: Biểu đồ đường chuẩn kit

**Nhận xét:** Đường chuẩn dựng được với  $r^2 = 0,986$

### 3.1.2.7. Kiểm tra hoạt tính của sản phẩm polEPCA sau tinh sạch bằng kit ELISA

Protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện và tinh sạch mang 2 epitop EPCA-2 có vai trò là yếu tố kháng nguyên sẽ được tiêm gây miễn dịch để tạo kháng thể trên thử thí nghiệm. Kháng thể thu được trong huyết thanh thử là đặc hiệu với polEPCA-2. từ đó chúng tôi sử dụng kháng thể này để xác định EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân. Điều kiện tiên quyết phải có ở protein sau tinh sạch là có hoạt tính và có thể kết hợp đặc hiệu với kháng thể. Để đảm bảo hiệu quả sử dụng của kháng thể tạo ra chúng tôi tiến hành thử hoạt tính đồng thời sơ bộ kiểm tra nồng độ protein EPCA-2 sau tinh sạch bằng phản ứng ELISA với kháng thể đặc hiệu trong kit chẩn đoán của CUSABIO.

Sản phẩm tinh sạch protein tái tổ hợp phân đoạn I<sub>250mM</sub> được thẩm tích trong đệm PBS, qua đêm. Sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp thu được thay cho kháng nguyên chuẩn trong kit ELISA và tiến hành các bước của phản ứng ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả được trình bày ở hình 3.16.



Hình 3.17. ELISA xác định nồng độ protein polEPCA-2 trong mẫu phân tích. Mẫu chuẩn: là mẫu protein EPCA-2 với 5 nồng độ do nhà sản xuất cung cấp. Mẫu phân tích: mẫu protein polEPCA-2 tinh sạch đã qua thẩm tích.

**Nhận xét:** Sản phẩm tinh sạch đã qua thẩm tích (polEPCA-2) có hoạt tính, kết hợp đặc hiệu với kháng thể kháng EPCA-2 trong kit ELISA. Khi so sánh với đường chuẩn, nồng độ kháng nguyên thu được tương đương 41,185 ng/mL (hình 3.17).

### 3.2. KẾT QUẢ GÂY MIỄN DỊCH Ở THỎ BẰNG KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP PoIEPCA-2.

Để tạo kháng thể kháng EPCA-2 ứng dụng cho kit chẩn đoán sau này, chúng tôi sử dụng phương pháp gây miễn dịch trên thỏ. Kỹ thuật được tiến hành theo qui trình gây miễn dịch bằng dung dịch kháng nguyên (polEPCA-2) kết hợp tá dược (Freund adjuvant) theo phác đồ 4 mũi tiêm. Qui trình gây miễn dịch được tiến hành lặp lại 3 lần độc lập với 3 lô thí nghiệm khác nhau. Mỗi lô thí nghiệm gồm 6 thỏ được chia thành 2 nhóm. Mỗi nhóm gồm 3 thỏ. Kết quả trình bày trong báo cáo này là lô thỏ có nồng độ kháng thể tốt nhất.

#### 3.2.1. Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ.

Các thỏ thí nghiệm về lí thuyết từ ngày thứ 7 trở đi sau mũi tiêm thứ 3 là có xuất hiện kháng thể đặc hiệu kháng nguyên trong huyết thanh. Vì vậy chúng tôi tiến hành lấy máu tĩnh mạch rìa tai thỏ để thử nồng độ kháng thể trong huyết thanh trước khi tiến hành tiêm mũi 4. Kết quả nồng độ kháng thể

thu được ở thỏ có được gây miễn dịch và lô thỏ không được gây miễn dịch (thỏ chứng âm) được trình bày ở bảng 3.3.

*Bảng 3.3. Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ sau tiêm mũi 3.*

<b>Mẫu xác định</b>	<b>Giá trị OD</b>	<b>Nồng độ (ng/ml)</b>
<b>Blank</b>	0.046	8.33
<b>Thỏ 01</b>	0.081	<b>26.3</b>
<b>Thỏ 02</b>	<b>0.084</b>	<b>27.27</b>
<b>Thỏ chứng âm</b>	<b>0.047</b>	<b>8.5</b>

**Nhận xét:**

- Sau tiêm mũi 3 cả 2 thỏ được gây miễn dịch (thỏ 01 và 02) đều đã có kháng thể trong huyết thanh (26,3 ng/ml và 27.27ng/ml) với nồng độ kháng thể thu được là tương đương nhau.

- Nồng độ kháng thể sau mũi 3 ở các thỏ có gây miễn dịch cao gấp 3,5 lần so với thỏ không được gây miễn dịch (thỏ chứng âm).

Vào các ngày thứ 15 và 20 sau mũi tiêm 4, chúng tôi lại tiếp tục lấy máu tĩnh mạch của thỏ để kiểm tra lại nồng độ kháng thể trong huyết thanh. Kết quả định lượng kháng thể được trình bày ở bảng 3.4 và 3.5.

*Bảng 3.4. Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ sau tiêm mũi 3 và 4.*

<b>Mẫu xác định</b>	<b>Giá trị OD</b>	<b>Nồng độ (ng/ml)</b>
<b>Blank</b>	0.047	8.36
Sau tiêm mũi 3	0.089	28.3
Sau mũi 4, ngày 15	<b>0.182</b>	<b>98.91</b>
<b>Thỏ chứng âm</b>	<b>0.049</b>	<b>8.7</b>



**Nhận xét:** Sau tiêm mũi 4 ngày thứ 15 thử có kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh cao gấp 3,5 lần sau mũi tiêm 3. Nồng độ kháng thể trong huyết thanh thử chứng âm không có sự khác biệt so với lần thử sau mũi 3.

*Bảng 3.5. So sánh nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ ngày thứ 15 và ngày thứ 20 sau tiêm mũi 4.*

<b>Mẫu xác định</b>	<b>Giá trị OD</b>	<b>Nồng độ (ng/ml)</b>
<b>Blank</b>	0.047	8.36
Sau mũi 4, ngày 15	<b>0.176</b>	<b>95.65</b>
Sau mũi 4, ngày 20	<b>0.35</b>	<b>243.05</b>
<b>Thỏ chứng</b>	0.049	8.7

**Nhận xét:** Sau tiêm mũi 4 ngày thứ 20 kháng thể trong huyết thanh thỏ tăng cao gấp 2,54 lần sau mũi tiêm 4 ngày thứ 15.

*Bảng 3.6. Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ 20 ngày sau tiêm mũi 4 ở các độ pha loãng khác nhau.*

<b>Mẫu xác định</b>	<b>Giá trị OD</b>	<b>Nồng độ (ng/ml)</b>
<b>Toàn phần</b>	<b>0.33</b>	<b>229.17</b>
<b>Loãng 1/2</b>	<b>0.188</b>	<b>102.17</b>
<b>Loãng 1/4</b>	0.063	11.41
<b>Thỏ chứng</b>	0.047	8.5

**Nhận xét:**

- Nồng độ kháng thể nguyên mẫu kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ ngày thứ 20 là 229,17 ng/ml, nồng độ này cao gấp nồng độ sau mũi 3 là 8,4 lần.

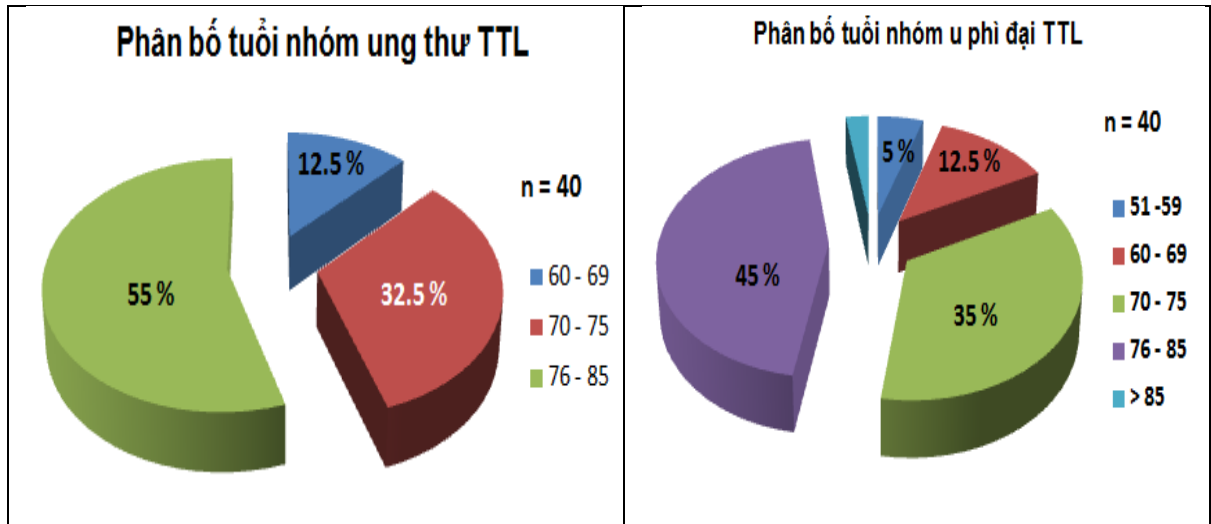
- Độ pha loãng kháng thể nguyên mẫu 1/2 vẫn đạt nồng độ 102,17ng/ml đủ hiệu giá để làm xét nghiệm phát hiện kháng nguyên EPCA-2.

- Ở độ pha loãng 1/4, nồng độ kháng thể xấp xỉ bằng nồng độ kháng thể của mẫu chứng, không đạt yêu cầu để làm xét nghiệm định lượng EPCA-2.

### **3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH EPCA-2 TRONG HUYẾT THANH 3 NHÓM NGHIÊN CỨU**

### 3.3.1. Thông tin chung của nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt

#### 3.3.1.1. Thông tin về tuổi của nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt



Hình 3.18: Sự phân bố tuổi ở 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt.

Bảng 3.7. Phân bố tuổi ở nhóm bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt.

Tuổi	n	%
51 – 59	0	0
60 – 69	5	12,5
70 – 75	13	32,5
<b>76 – 85</b>	<b>22</b>	<b>55</b>
> 85	0	0

**Nhận xét:** Bệnh nhân UTTL có độ tuổi mắc bệnh cao nhất là từ 76 đến 85, độ tuổi mắc bệnh thấp nhất là dưới 60.

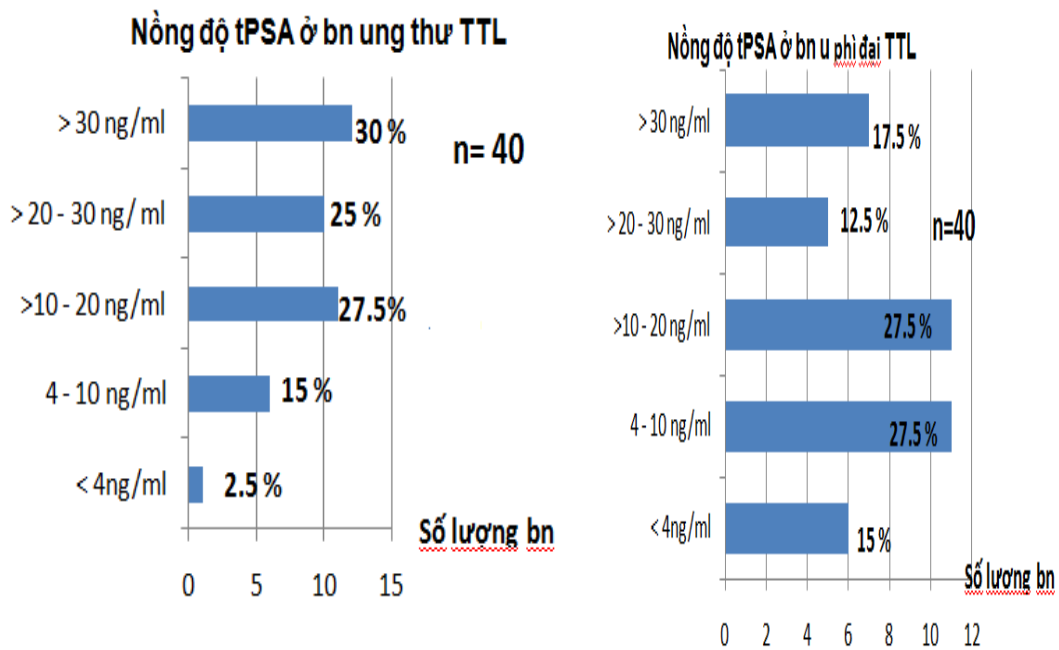
*Bảng 3.8. Phân bố tuổi ở nhóm bệnh nhân u phì đại tuyến tiền liệt.*

<b>Tuổi</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
51 – 59	2	5
60 – 69	5	12,5
70 – 75	14	35
<b>76 – 85</b>	<b>17</b>	<b>42,5</b>
> 85	2	5

**Nhận xét:**

- Bệnh nhân u phì đại TTL độ tuổi mắc bệnh cao nhất là từ 76 đến 85.
- Độ tuổi mắc bệnh thấp nhất là dưới 60.

**3.3.1.2 Nồng độ tPSA trong huyết thanh của ba nhóm nghiên cứu**



*Hình 3.19: Nồng độ tPSA ở 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt*

*Bảng 3.9. Nồng độ tPSA trung bình trong huyết thanh các nhóm nghiên cứu.*

Nhóm nghiên cứu	n	Nồng độ tPSA	
		$\bar{X}$	SD
Bình thường	30	1.21	0.781
U phì đại TTL	40	24.452	16.973
Ung thư TTL	40	34.68	40.204

**Nhận xét:**

Nồng độ tPSA trung bình của nhóm UT TTL cao gấp 1,4 lần nhóm u phì đại lành tính TTL, và gấp 28 lần nhóm nam bình thường.

*Bảng 3.10. Sự phân bố các mức nồng độ tPSA ở 3 nhóm nghiên cứu.*

Nồng độ tPSA ng/ml	Bệnh nhân UT TTL		Bệnh nhân u phì đại TTL		Nam bình thường	
	n	%	n	%	n	%
< 4	1	2,5	6	15	30	100
4-10	6	15	<b>11</b>	<b>27,5</b>		
>10 - 20	11	27,5	<b>11</b>	<b>27,5</b>		
>20 -30	10	25	<b>5</b>	12,5		
> 30	<b>12</b>	<b>30</b>	7	17,5		
Tổng số	40		40		30	

**Nhận xét:**

- Hai nhóm bệnh nhân UT TTL và UPĐLT TTL có nồng độ tPSA ở tất cả các mức nồng độ từ cao đến thấp
- Nồng độ tPSA > 30 ng/ml chiếm tỷ lệ cao nhất ở nhóm UT TTL (30%)

- Nồng độ tPSA 4- 20 ng/ml chiếm tỷ lệ cao nhất ở nhóm u phì đại TTL (55%).

### 3.3.2. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân UTTTL và UPĐLTTL được định lượng bằng kháng thể thử kháng EPCA-2 và kit CUSABIO

#### 3.3.2.1. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt

*Bảng 3.11. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt ở các mức nồng độ*

<b>Nồng độ EPCA 2 (ng/ml)</b>	<b>Kít ELISA CSB-EQ 027679HU</b>	<b>Kháng thể thử đặc hiệu</b>
<b>&lt;25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>25 - &lt; 100</b>	3	8
<b>100 - &lt; 200</b>	13	19
<b>200 - &lt; 400</b>	15	11
<b>≥ 400</b>	<b>9</b>	<b>2</b>
<b>Tổng</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

#### *Nhận xét:*

- Ở nồng độ thấp nhất (<25ng/ml) cả 2 phương pháp ELISA đều không phát hiện được EPCA-2 trong nhóm bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt.

- Bệnh nhân có nồng độ EPCA-2 từ 100 đến < 400ng/ml chiếm tỷ lệ cao nhất là 28/40 với kết quả xác định bằng kít ELISA, và 30/40 với kết quả xác định bằng KT thử đặc hiệu.

*Bảng 3.12. Giá trị trung bình nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt.*

<b>Nhóm nghiên</b>	<b>n</b>	<b>Nồng độ EPCA-2</b>
--------------------	----------	-----------------------

<b>cứu</b>		<b><math>\bar{X}</math></b>	<b>SD</b>
<b>Kit ELISA</b>	40	279.8974	172.1579
<b>Kháng thể thở kháng pol EPCA-2</b>	40	208.658	136.651

**Nhận xét:**Giá trị trung bình nồng độ EPCA- 2 của nhóm bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt được phát hiện bằng kit ELISA cao hơn kết quả được phát hiện bằng kháng thể thở

### 3.3.2.2. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân u phì đại lành tính tuyến tiền liệt.

*Bảng 3.13.Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân u phì đại lành tính tuyến tiền liệt.*

<b>Nồng độ EPCA 2 (ng/ml)</b>	<b>Kit ELISA CSB-EQ 027679HU</b>	<b>Kháng thể thở đặc hiệu</b>
<b>Âm tính</b>	<b>38</b>	<b>38</b>
<b>12.5</b>	0	<b>2</b>
<b>25</b>	2	<b>0</b>
<b>100</b>	0	0
<b>200</b>	0	0
<b>400</b>	0	0
<b>&gt; 400</b>	0	0
<b>Tổng</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

**Nhận xét:**

- Kết quả xác định kháng thể bằng kit thương phẩm cũng tương tự như kết quả xác định bằng kháng thể thở cho thấy có 38/40 bệnh nhân u phì đại lành tính TTL không có EPCA-2 trong huyết thanh.

- Có 2/40 bệnh nhân u phì đại lành tính TTL có EPCA-2 trong huyết thanh với nồng độ thấp.

*Bảng 3.1.4. So sánh giá trị trung bình của nồng độ EPCA-2 và tPSA trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt.*

Nồng độ ng/ml	Ung thư TTL		U phì đại TTL	
	<b>X̄</b>	<b>SD</b>	<b>X̄</b>	<b>SD</b>
EPCA-2	208,658	136,651	6.3922	4.4606
tPSA	34,68	40,204	24.452	16.973

***Nhận xét:***

- Có sự khác biệt nồng độ EPCA-2 và tPSA ở nhóm bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt so với nhóm u phì đại lành tính tuyến tiền liệt.

- Giá trị trung bình của nồng độ EPCA-2 ở nhóm ung thư tuyến tiền liệt cao khác biệt so với nồng độ này ở nhóm u phì đại lành tính tuyến tiền liệt (208,658 so với 6.3922).

- So sánh giá trị trung bình của nồng độ EPCA-2 và tPSA ở nhóm ung thư tuyến tiền liệt cao khác biệt so ở nhóm u phì đại lành tính tuyến tiền liệt (208,658 và 34,68 so với 6,3922 và 24,452)



### 3.3.3. Nồng độ EPCA- 2 trong huyết thanh nam giới khỏe mạnh.

*Bảng 3.1.5. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh người nam bình thường định lượng bằng KT thử đặc hiệu kháng EPCA-2 và Kit ELISA.*

<b>EPCA 2</b>	<b>Kit ELISA CSB-EQ 027679HU</b>	<b>Kháng thể thử đặc hiệu</b>
<b>Âm tính</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>Dương tính</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Tổng</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

**Nhận xét:** EPCA-2 âm tính trong 100 % mẫu huyết thanh nhóm nam giới khỏe mạnh (chứng âm).

### 3.3.4. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của kháng thể thử đặc hiệu kháng EPCA-2 với kháng thể trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO

*Bảng 3.16. So sánh độ nhạy của kháng thể thử đặc hiệu kháng EPCA-2 với Kit ELISA ở nhóm bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt.*

<b>Bn UT TTL EPCA- 2</b>	<b>Kit ELISA CSB-EQ 027679HU</b>	<b>Kháng thể thử đặc hiệu</b>
<b>Âm tính</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Dương tính</b>	<b>40</b>	<b>40</b>
<b>Tổng</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

**Nhận xét:** Cả 2 phương pháp ELISA dùng KT thử và dùng kit CUSABIO đều cho kết quả dương tính ở 100 % mẫu huyết thanh nhóm bệnh nhân ung thư TTL, độ nhạy đạt 100%.

*Bảng 3.17. So sánh độ đặc hiệu của kháng thể thử đặc hiệu kháng polEPCA-2 với kit ELISA ở nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL.*

<b>Bn u phì đại TTL (EPCA- 2)</b>	<b>Kít ELISA CSB-EQ 027679HU</b>	<b>Kháng thể thở đặc hiệu</b>
<b>Âm tính</b>	<b>38</b>	<b>38</b>
<b>Dương tính</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Tổng</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

***Nhận xét:***

- Cả 2 phương pháp ELISA đều cho kết quả EPCA-2(-) ở 38/40 mẫu huyết thanh nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL, độ đặc hiệu đạt 95%.
- Cả 2 phương pháp ELISA đều cho kết quả EPCA-2(+) ở 2/40 mẫu huyết thanh nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL.

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. VỀ THIẾT KẾ GEN MÃ HÓA POLYPEPTIDE CỦA KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT SỚM

##### 4.1.1. Lựa chọn biểu hiện các epitope của kháng nguyên thay vì biểu hiện toàn bộ phân tử kháng nguyên

Sự liên kết giữa kháng nguyên với kháng thể hòa tan hay giữa kháng nguyên với tế bào lympho luôn mang tính đặc hiệu cao. Tính đặc hiệu này tương tự như giữa enzym với cơ chất, nghĩa là khớp với nhau như chìa khóa với ổ khóa. Sự liên kết đặc hiệu này không xảy ra với toàn bộ kháng nguyên mà chỉ với một phần nhất định của kháng nguyên. Các vùng cấu trúc có sự liên kết đặc hiệu này gọi là quyết định kháng nguyên hay epitope. Phần tương ứng gắn với kháng nguyên trên mỗi kháng thể gọi là paratope.

EPCA-2 đã được biết là protein có trọng lượng khoảng 30 kDa, với nhiều phân đoạn peptid khác nhau. Bất kỳ đoạn peptid nào của EPCA-2 đều có thể tạo liên kết đặc hiệu với kháng thể. Năm 2008 nhóm nghiên cứu của tiến sĩ Robert H Getzenberg đã công bố trình tự 3 đoạn peptid được cho là 3 epitope của EPCA-2 đó là EPCA-2.22, EPCA-2.19 và EPCA-2.4. Trong đó hai epitope EPCA-2.22, EPCA-2.19 đã được chứng minh là xuất hiện sớm và phổ biến trong huyết thanh của bệnh nhân UTTL [37],[38].

Bên cạnh đó các nghiên cứu của Trần Ngọc Tân về gen mã hóa cho phần chứa epitope của Neuraminidase trên vỏ của vi rút cúm A/H5N1 bằng tái tổ hợp biến nạp vào tế bào *E.coli* BL21 (DE3)[87]. Nghiên cứu của Gong Q và cộng sự năm 2010 biểu hiện đoạn gen PEDF34 mã hóa epitope chức năng của PEDF vào vector PGEX-4T-1 rồi được biểu hiện ở *E.coli*(PEDF-pigment epithelium-derived factor-một yếu tố ức chế tăng sinh tế bào nội mạc mạch

máu)[88]. Kết quả của các nghiên cứu đều cho thấy protein sau biểu hiện vẫn giữ được tính đặc hiệu KN như trong tự nhiên. Một nghiên cứu khác của He. Năm 2011 đã tiến hành tạo vector tái tổ hợp chứa bốn epitope của virus viêm gan C (mảnh C, NS3, NS4 và NS5) và biểu hiện ở *E.coli*. Hoạt tính của sản phẩm tái tổ hợp được thử bằng phản ứng ELISA có đối chứng với kết quả của bộ kit CHIRON RIBA HCV 3.0 SIA trên 10 mẫu thử. Kết quả thu được ở thử nghiệm với protein tái tổ hợp tương tự như của kit [89].

Các nghiên cứu trên đã chứng tỏ dùng phương pháp tái tổ hợp biểu hiện gen mã hóa epitope của kháng nguyên có thể tạo được sản phẩm của gen là protein vẫn đảm bảo hoạt tính sinh học là đặc hiệu với kháng thể tương ứng. Đồng thời khi tạo nhiều epitope trong một protein tái tổ hợp giúp tránh được sự tổn kém so với khi biểu hiện từng epitope, từ đó tạo bước tiến mới trong sản xuất KN chẩn đoán để phát hiện KT.

Dựa trên trình tự hai epitope EPCA-2.22, 2.19 của nhóm tiền sử Robert H Getzenberg thuộc bệnh viện Johns Hopkins [37],[38], cùng nhiều nghiên cứu trong nước và nước ngoài về tính sinh miễn dịch của KN vẫn đảm bảo khi KN chỉ mang các epitope mà không cần cấu trúc toàn bộ [88],[89],[90]. Nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thiết kế gen mã hóa kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm chỉ mang 8 lần lặp lại của hai trình tự epitope EPCA-2.22 và EPCA-2.19 thay vì biểu hiện toàn bộ phân tử KN. Bên cạnh đó do chưa biết rõ toàn bộ cấu trúc và trình tự acid amin của EPCA-2, nên bằng việc không biểu hiện toàn bộ phân tử kháng nguyên chúng tôi sẽ tránh được một số bất lợi có thể xảy ra do chức năng ở những phần chưa biết.

#### 4.1.2. Thiết kế lặp nhiều lần trình tự các epitope

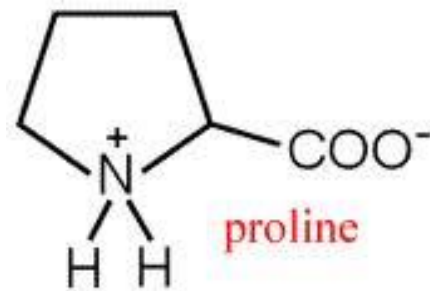
Chúng tôi chủ định thiết kế trình tự gen mã hóa *polEPCA-2* được tạo thành từ 8 lần lặp lại nối đuôi nhau của cặp trình tự epitope EPCA-2.22 và EPCA-2.19. Giữa các đoạn lặp là đoạn nối gồm 3 acid amin prolin (PPP)(Hình 3.8).

Việc thiết kế lặp 8 lần epitope trong gen *polEPCA-2* của chúng tôi nhằm tới hai mục đích:

Thứ nhất, các epitope được lặp lại nhiều lần sẽ làm tăng khả năng bắt cặp của KN với KT. Một phân tử protein tái tổ hợp có nhiều epitope sẽ có khả năng cao trình diện được các vị trí epitope để kết hợp với các paratope tương ứng trên KT.

Thứ hai, protein *polEPCA-2.22*, và *2.19* với 8 lần lặp lại đã đạt được kích thước 23,1 kDa, nhờ việc lặp lại nhiều lần epitope làm phân tử protein tái tổ hợp đạt được kích thước tương đương với kích thước của EPCA-2 trong tự nhiên. Điều này giúp làm tăng khả năng phát hiện EPCA-2 trên bệnh nhân. Đồng thời 23,1 kDa là kích thước đủ lớn để chúng tôi có thể quan sát và phát hiện bằng điện di trên gel polyacrylamid 12,6% và marker protein Unstained protein molecular weight marker SM0431 (Fermentas). Nếu nghiên cứu của chúng tôi chỉ biểu hiện một lần epitope thì kích thước protein tái tổ hợp thu được chỉ đạt 4,49 kDa. Với kích thước nhỏ ở mức này bắt buộc chúng tôi phải sử dụng gel điện di peptid và marker tương ứng. Việc tiến hành điện di trên gel peptid sẽ phức tạp hơn, cộng với marker protein với kích thước nhỏ thường có thời hạn sử dụng ngắn hơn sẽ là những khó khăn và tốn kém cho việc thực hiện nghiên cứu.

Khi thiết kế gen *polEPCA-2* chúng tôi còn chọn đoạn nối giữa các trình tự epitope lặp lại là 3 acid amin prolin (PPP) do kế thừa từ những nghiên cứu về vai trò của acid amin prolin trong cấu trúc protein (hình 4.1).



Hình 4.1. Cấu trúc acid amin prolin

Nghiên cứu của Morgan đã ứng dụng tin học vào sinh học (bioinformatics) khi nghiên cứu các trình tự chứa acid amin prolin trong phân tử protein. Kết quả nghiên cứu cho thấy cấu trúc prolin chiếm số lượng lớn trong cấu trúc protein ở người (687.434 trình tự có prolin trên tổng số 18.666 protein đã được phân tích). Prolin chiếm 6,3% trong tổng số 10.882.808 acid amin [91]. Prolin là acid amin duy nhất trong 20 acid amin thường gặp có nitơ trong nhóm amin nằm trong vòng 5 cạnh. Điều quan trọng là trên phân tử protein, ở vị trí nào xuất hiện acid amin prolin thì ở đó phân tử protein bị giảm tính linh hoạt do prolin khi tham gia cấu tạo chuỗi polypeptid sẽ tạo một góc gấp khúc cho chuỗi polypeptid [91]. Trong tổng số các trình tự chứa prolin, có 4,4% là các trình tự của prolin lặp lại từ 3 lần trở lên. Khi trên phân tử protein có đoạn gồm 3 prolin liên tiếp thì tại vị trí này protein có thể cuộn lại tạo cấu trúc xoắn polyprolin.

Trong thiết kế gen *polEPCA-2*, chúng tôi thiết kế đoạn nối giữa các cặp EPCA-2.22,2.19 là 3 prolin liên tiếp tức là cấu trúc xoắn polyprolin giữa các đoạn lặp sẽ làm cho protein *polEPCA-2* có cấu trúc gấp khúc mà không bị cuộn xoắn che lấp các epitope trong phân tử protein tái tổ hợp. Do đó, các epitope trong protein tái tổ hợp do chúng tôi tạo ra sẽ dễ dàng tương tác với các paratope tương ứng trên kháng thể.

#### 4.1.3. Thiết kế gen *polEPCA-2* có trình tự nhận biết của các enzyme cắt giới hạn

Để phục vụ cho việc tách dòng và biểu hiện được gen *polEPCA-2*, ở hai đầu của gen trước trình tự của các epitope, chúng tôi thiết kế trình tự ACCATGGGG là vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Nco* I.

Tương tự như vậy, phía cuối của gen *polEPCA-2*, sau trình tự của các epitope, chúng tôi cũng thiết kế trình tự GCGGCCGCA là vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Not* I.

Ngoài ra để đảm bảo gen *polEPCA-2* không bị cắt vụn thành nhiều mảnh khi ủ với enzyme cắt giới hạn chúng tôi kiểm tra ngoài 2 vị trí cắt này, trong gen *polEPCA-2* không còn vị trí cắt khác của 2 enzym *Nco* I và *Not* I. Hai enzyme cắt giới hạn mà chúng tôi lựa chọn cũng là các enzyme cắt duy nhất ở vị trí MCS (multiple cloning site) của vector pET-28a(+). Điều này đảm bảo sản phẩm sau khi cắt gán, được biểu hiện chắc chắn là *polEPCA-2* như thiết kế.

#### **4.1.4. Tạo vector tái tổ hợp mang gen *polEPCA-2***

Biến nạp DNA plasmid vào tế bào *E.coli* là phương pháp kinh điển được sử dụng phổ biến để biểu hiện các gen ngoại lai mong muốn. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng sốc nhiệt để biến nạp DNA plasmid vào tế bào *E.coli* BL21 (DE3). Trước khi sốc nhiệt các tế bào cần được làm lỏng màng để dễ dàng tiếp nhận DNA plasmid. Để thực hiện điều này chúng tôi ủ *E.coli* BL21 trong dung dịch  $\text{CaCl}_2$ . Tiếp theo chúng tôi đưa DNA plasmid vào trong tế bào bằng cách sốc nhiệt nhanh (40-60 giây). Các tế bào biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp chọn lọc dương tính trên đĩa agar chứa môi trường LB với kháng sinh Kanamycin. Mỗi khuẩn lạc trên đĩa kháng sinh đại diện cho một thể biến nạp đơn.

Ở đây, sở dĩ chúng tôi sử dụng *E.coli* BL21 (DE3) làm chủng vi khuẩn biểu hiện trong nghiên cứu bởi vì *E.coli* BL21 (DE3) là vật chủ thích hợp cho cả việc biểu hiện gen đồng thời cũng là vật chủ thích hợp cho biểu hiện protein khi dùng vector biểu hiện có chứa promoter lac như vector pET-28a(+).

Đồng thời *E.coli* BL21 (DE3) không có khả năng kháng kháng sinh kanamycin nên chúng tôi có thể sử dụng đặc tính này để chọn đúng dòng tế bào có mang *polEPCA-2* sau nuôi cấy. Bởi sau khi biến nạp DNA plasmid vào *E.coli* BL21 và nuôi cấy trên môi trường LB đặc có bổ sung kanamycin 50 µg/mL sẽ có hai trường hợp sau xảy ra: (1) Các tế bào không chứa vector tái tổ hợp chỉ là *E.coli* BL21 thì không có khả năng kháng kháng sinh nên sẽ không mọc được trên môi trường có chứa kháng sinh kanamycin. (2) Các tế bào chứa vector tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2* mang gen *polEPCA-2* và có gen kháng kháng sinh nên mọc được trên môi trường chọn lọc.

Trong nghiên cứu này, từ các khuẩn lạc mọc được trên môi trường chọn lọc chứa gen kháng kháng sinh của vector tái tổ hợp, chúng tôi kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với 2 cặp mồi T7 F và T7 R. Kết quả cho thấy sản phẩm thu được ở các giếng từ 1 đến 8 là một băng rõ nét có kích thước tương đương với kích thước tính toán khi so với thang marker (hình 3.6). Như vậy, chúng tôi đã biến nạp thành công vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2* vào tế bào *E.coli* BL21 (DE3).

#### **4.1.5. Biểu hiện protein tái tổ hợp**

##### **4.1.5.1. Tối ưu hóa điều kiện biểu hiện của protein tái tổ hợp**

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là tạo được số lượng protein EPCA-2 tái tổ hợp cao nhất làm nguyên liệu cho qui trình tinh sạch. Vì vậy việc tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện của protein tái tổ hợp là cần thiết.

Hình 3.10 đã chứng tỏ cả 4 dòng tế bào đều đã được biểu hiện thành công và cho sản phẩm protein có kích thước tương đương như kích thước tính toán. Với điều kiện tối ưu chung cho sự biểu hiện protein là chủng biểu hiện, vector biểu hiện, môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, tốc độ lắc), nồng độ chất cảm ứng, thời điểm cảm ứng và thời gian thu mẫu sau cảm ứng.



Chúng biểu hiện và vector biểu hiện đã được xem xét lựa chọn từ đầu phụ thuộc vào đặc điểm gen cần biểu hiện. Trong các yếu tố còn lại, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy yếu tố thời gian cảm ứng và nhiệt độ cảm ứng ảnh hưởng rõ nét tới hiệu suất biểu hiện protein tái tổ hợp.

Theo hình 3.11, lượng protein tái tổ hợp thu được ở mẫu cảm ứng qua đêm nhiều hơn so với thời điểm 3 giờ và 5 giờ. Theo hình 3.12, lượng protein tái tổ hợp ở 37°C nhiều hơn ở 30°C và 18°C. Như vậy điều kiện tối ưu cho biểu hiện *polEPCA-2* (trong DE3) trong nghiên cứu của chúng tôi là mẫu được cảm ứng qua đêm ở 37 °C.

*Khảo sát khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp khi thay đổi nhiệt độ cảm ứng*

Protein được tạo ra do tái tổ hợp thường tồn tại dưới hai dạng đó là dạng hòa tan và thể vùi [92]. Khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp phụ thuộc vào quá trình cuộn xoắn sau dịch mã. Nếu chuỗi polypeptide sau tổ hợp vẫn giữ nguyên trạng thái duỗi rồi cuộn xoắn để đạt được cấu trúc có hoạt tính và chức năng thì đó là dạng hòa tan. Ngược lại, nếu protein cuộn xoắn không đúng, có xu hướng tích tụ dần trong tế bào vi khuẩn để tránh gây độc cho tế bào chủ thì đó là thể vùi (inclusion body).

Khi biểu hiện protein tái tổ hợp, các nhà nghiên cứu luôn mong muốn thu được sản phẩm protein có khả năng hòa tan để protein vẫn giữ được hoạt tính sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Tuy nhiên, sự hình thành và tích tụ của protein lạ dưới dạng thể vùi là hiện tượng khá phổ biến. Cơ chế của quá trình này vẫn chưa được biết đầy đủ. Nhưng dường như các yếu tố như pH nuôi cấy, nhiệt độ và thành phần các acid amin của protein tái tổ hợp có thể ảnh hưởng tới khả năng hòa tan của protein [92],[93].

Một số nghiên cứu với mong muốn làm tăng khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp đã thay đổi yếu tố nhiệt độ-một yếu tố dễ kiểm soát hơn 2 yếu tố còn lại (là pH môi trường và trình tự acid amin). Như nghiên cứu của

Chen S. và cộng sự (2011), Kim E (2012) và Yong G và cộng sự (2013) Các tác giả này đều nhận thấy hạ thấp nhiệt độ biểu hiện sẽ làm tăng khả năng hòa tan của protein [86],[93],[94].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tiến hành khảo sát độ hòa tan của protein tái tổ hợp khi biểu hiện ở nhiệt độ thấp (tại 30°C và 18°C) kết quả cho thấy tính hòa tan của protein cũng không được cải thiện, chúng vẫn tồn tại chủ yếu trong cặn (hình 3.14).

#### **4.1.5.3. Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng Kit ProBond<sup>TM</sup> Nikel Resin**

Tinh sạch để thu nhận protein mong muốn sau tái tổ hợp là bước tiếp theo của công nghệ protein. Để thu được khối lượng lớn protein còn hoạt tính đòi hỏi phương pháp tinh sạch phải phù hợp với dạng tồn tại của protein sau tái tổ hợp.

Sau khi kiểm tra khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp, kể cả khi hạ thấp nhiệt độ cảm ứng, chúng tôi nhận thấy protein vẫn tồn tại chủ yếu ở dạng không hòa tan. Với mục đích mong muốn sản phẩm protein sau tinh sạch vẫn còn hoạt tính, chúng tôi lựa chọn phương pháp hybrid để tinh sạch.

Hybrid là phương pháp kết hợp vừa gây biến tính để đưa protein không hòa tan về dạng hòa tan ở giai đoạn đầu, đồng thời loại chất có thể gây biến tính protein ở giai đoạn sau kết hợp rửa nhiều lần để protein gắn trên cột được hồi tính.

Chúng tôi sử dụng đệm DBB có chứa 8M urea để gây biến tính các cặn tế bào trong quá trình siêu âm. Protein tái tổ hợp sau khi được giải phóng khỏi tế bào sẽ bị biến tính, trở về cấu trúc bậc 1 và hòa tan được. Vì vậy phần dịch nổi sau ly tâm dịch siêu âm sẽ chứa protein tinh sạch.

Sử dụng dịch nổi sau ly tâm gắn lên cột, các protein có His- tag sẽ bị giữ lại nhờ ái lực với Ni<sup>2+</sup>-agarose. Trong bước rửa bằng dung dịch DWB đã loại bớt nhiều protein khác gắn không đặc hiệu trên cột.

Rửa bằng NWB là bước rất quan trọng. Trong thành phần của NWB không còn chất gây biến tính. Khi rửa bằng NWB thì protein dần cuộn xoắn lại, về trạng thái hồi tính, tức là trạng thái có hoạt tính. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã rửa bằng NWB với thể tích khoảng 80 mL.

#### *Thời gian siêu âm*

Thời gian tiến hành siêu âm cũng có vai trò quyết định đến sản phẩm protein sau tinh sạch. Vì nếu lựa chọn thời gian nghỉ và phát sóng siêu âm không phù hợp sẽ gây nóng protein dẫn đến protein bị biến tính không hồi phục và mất hoạt tính. Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng máy siêu âm Labsonic với chu kỳ phát sóng và nghỉ là 30 giây kế tiếp nhau trong tổng thời gian phát sóng siêu âm là 20 phút. Thành phẩm protein sau biến tính để tinh sạch tiếp tục được kiểm tra hoạt tính.

#### **4.1.5.4. Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp**

Để kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp chúng tôi sử dụng kit ELISA phát hiện EPCA-2 của hãng CUSABIO. Trong qui trình kỹ thuật này chúng tôi sử dụng polEPCA-2 đóng vai trò là kháng nguyên cần xác định tương tự như EPCA-2 trong huyết thanh của bệnh nhân UTTTL. Kết quả đã khẳng định sản phẩm tinh sạch thu được có hoạt tính, có khả năng kết hợp đặc hiệu với kháng thể kháng EPCA-2 trong kit của nhà sản xuất.

Giá trị nồng độ polEPCA-2 thu được là 41,185 ng/mL. Như vậy, sản phẩm polEPCA-2.22, 2.19 sau tinh sạch có hoạt tính kháng nguyên và có thể sử dụng để thực hiện các bước gây miễn dịch tiếp theo (hình 3.17).

## **4.2. VỀ KẾT QUẢ TẠO KHÁNG THỂ THỎ ĐẶC HIỆU KHÁNG PolEPCA-2**

### **❖ Lựa chọn phương pháp tạo kháng thể**

Chúng tôi tiếp tục sử dụng *PolEPCA-2* thu được để tạo kháng thể đặc hiệu bằng phương pháp gây miễn dịch trên động vật thí nghiệm. Sở dĩ chúng tôi

lựa chọn phương pháp gây miễn dịch trên động vật bởi đây là phương pháp tạo kháng thể tương đối dễ thực hiện và có tính ứng dụng cao. Đồng thời nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng đã thành công với việc gây miễn dịch trên động vật với kháng nguyên là protein tái tổ hợp. Nghiên cứu của Simin (2011) sử dụng yếu tố VIII tái tổ hợp tiêm nhiều lần nhắc lại trên thỏ để tạo kháng thể đặc hiệu [86]. Nghiên cứu của Rattana (2011) sử dụng kháng nguyên là HBcAg tái tổ hợp kết hợp với tá dược Freund tiêm cho thỏ và thu nhận kháng thể trong huyết thanh thỏ sử dụng làm nguyên liệu cho phản ELISA xác định HBcAg ở người [95]. Các nghiên cứu đều chỉ ra rằng phương pháp này có ưu điểm tạo được số lượng lớn sản phẩm, các trang thiết bị sử dụng trong qui trình không quá đắt tiền. Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của kỹ thuật là phải sử dụng đến một lượng lớn kháng nguyên trong qui trình triển khai kỹ thuật. Vì những lý do trên chúng tôi quyết định chọn phương pháp gây miễn dịch trên thỏ để tạo kháng thể.

❖ *Lựa chọn qui trình gây miễn dịch và thời điểm thu nhận kháng thể phù hợp*

Có nhiều qui trình khác nhau để gây miễn dịch tạo kháng thể. Nhìn chung kết quả tạo kháng thể bằng phương pháp gây miễn dịch trên động vật phụ thuộc chủ yếu vào 3 yếu tố: (1) Bản chất của kháng nguyên. (2) Đường vào của kháng nguyên. (3) Thời điểm thu nhận kháng thể [81].

Trong nghiên cứu, chúng tôi dùng *PoIEPCA-2* là protein mang 2 epitop EPCA-2.22, 2.19 (sản phẩm sau tinh sạch) như một kháng nguyên để gây miễn dịch cho thỏ. Yếu tố kháng nguyên *poIEPCA-2* ở đây có bản chất là protein, kích thước 210 acid amin đạt những tiêu chuẩn của một kháng nguyên tốt để gây kích thích hệ miễn dịch thỏ tạo kháng thể đặc hiệu. Kinh nghiệm của chúng tôi cho thấy các kháng nguyên có cấu tạo protein có khả năng gây kích thích sinh kháng thể tốt với cả 2 hệ thống đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào của cơ thể. Đồng thời kích thích này còn

để lại các tế bào trí nhớ miễn dịch, vì vậy với nhiều lần tiêm lặp lại của kháng nguyên, cơ thể sẽ có phản ứng của trí nhớ miễn dịch và việc tạo kháng thể ở các lần tiêm gây miễn dịch sau sẽ nhanh và mạnh hơn [96].

Từ những hiểu biết và kinh nghiệm, chúng tôi quyết định tiến hành qui trình gây miễn dịch cho thỏ theo phác đồ 4 lần tiêm, thời gian giữa các lần tiêm cách nhau 7 ngày và dung dịch gây miễn dịch là hỗn hợp polEPCA-2 tái tổ hợp kết hợp với Freund (bảng 2.7). Đây là một qui trình gây miễn dịch được cải tiến từ qui trình gây miễn dịch thường qui trên thỏ tại labo Miễn dịch của bộ môn Sinh lí bệnh - Miễn dịch trường Đại học Y Hà Nội. Vì vậy việc thực hiện qui trình chuẩn của chúng tôi khá thuận lợi. Qui trình này sử dụng 2 đường vào của kháng nguyên đó là đường tiêm vào cơ đùi và tiêm ổ bụng. Cả 2 đường tiêm này đều được đánh giá là có khả năng sinh miễn dịch tốt hơn so với đường tiêm tĩnh mạch hay đường uống, đặc biệt là với kháng nguyên có bản chất protein (do KN có bản chất là protein nếu vào cơ thể theo đường uống hoặc tiêm tĩnh mạch có thể có sự cảm ứng dung nạp miễn dịch của tế bào lympho T hay B với kháng nguyên) [81],[73].

Với thời điểm thu hoạch kháng thể, chúng tôi căn cứ theo lý thuyết về thời gian sinh kháng thể của quá trình đáp ứng miễn dịch. Thông thường kháng thể bắt đầu được sinh ra là từ ngày thứ 6 sau lần tiếp xúc đầu tiên của kháng nguyên với cơ thể. Ở lần tiếp xúc thứ 2 của cơ thể với kháng nguyên chỉ cần 10 giờ sau đã có kháng thể trong máu và xuất hiện phản ứng viêm tại chỗ tiêm. Phản ứng này tăng dần và nồng độ kháng thể đạt tối đa khoảng 48 - 72 giờ sau. Tuy nhiên nồng độ kháng thể sau lần gây miễn dịch mũi thứ 2 thường chưa cao nên thường chưa định lượng được. Nồng độ kháng thể thường tăng cao đáng kể và có thể định lượng được từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 10 sau mũi tiêm nhắc lại từ lần 3 trở đi. Và đặc biệt nồng độ kháng thể sẽ đạt đỉnh tại thời điểm ngày thứ 15 đến 20 sau mũi tiêm 4. Từ sau ngày

thứ 20 nồng độ KT sẽ giảm dần [73]. Vì vậy, để thu được kháng thể với nồng độ cao nhất, chúng tôi thu nhận toàn bộ huyết thanh của thỏ tại đúng thời điểm nồng độ kháng thể đạt đỉnh trong máu, thời điểm ngày thứ 20 sau mũi tiêm gây miễn dịch thứ 4. Tuy nhiên để chắc chắn về thời điểm thu nhận KT có nồng độ tốt chúng tôi tiến hành kiểm tra nồng độ kháng thể ở các thời điểm khác nhau. Lần đầu định lượng kháng thể là khi huyết thanh thỏ được lấy ở ngày thứ 7 sau tiêm mũi 3. Kết quả của cả 3 lô thí nghiệm đều cho thấy các thỏ có được gây miễn dịch với kháng nguyên polePCA-2 đều có xuất hiện kháng thể đặc hiệu với nồng độ lần lượt là 26.3 và 27.27 ng/ml. Nồng độ kháng thể tại thời điểm sau mũi tiêm 3 được 7 ngày tuy chưa cao nhưng sự tăng này đã có khác biệt so thỏ chứng (8,5 ng/ml)(bảng 3.3 ). Các thỏ này tiếp tục được gây miễn dịch mũi thứ 4. Để dò tìm thời điểm kháng thể đạt đỉnh, chúng tôi lấy máu tĩnh mạch rìa tai thỏ và xác định nồng độ kháng thể trong huyết thanh ở các ngày thứ 15 và 20 sau mũi tiêm 4. Kết quả ở ngày thứ 15 sau mũi tiêm thứ 4, kháng thể trong huyết thanh được định lượng bằng phương pháp ELISA cho thấy lượng kháng thể thu được ở thời điểm này tiếp tục tăng cao gấp 3,5 lần so với nồng độ kháng thể tại thời điểm 7 ngày sau mũi tiêm 3 (98,91ng/ml so với 28,3ng/ml - bảng 3.4). Theo lý thuyết các kháng thể sau mũi tiêm nhắc lại thường có thời gian duy trì và giảm dần khá lâu từ 3 đến 6 tuần [73],[97]. Để xác định nồng độ kháng thể ở huyết thanh thỏ với thời điểm xa hơn, kỹ thuật ELISA tiếp tục được tiến hành với huyết thanh thỏ tại thời điểm 20 ngày sau mũi tiêm 4. Kết quả, kháng thể tại thời điểm này tăng cao rõ rệt, gấp 8,4 lần so với sau mũi 3 và 2,3 lần so với thời điểm ngày thứ 15 sau mũi tiêm 4 (229,17ng/ml so với 27.27 và 98.91ng/ml - bảng 3.3, 3.4 và 3.5). Như vậy kháng thể thỏ thu được tại thời điểm 20 ngày sau tiêm mũi 4 đã có nồng độ đạt đỉnh đúng như dự kiến. Chúng tôi tiến hành lấy máu thỏ toàn bộ thu tối đa

lượng huyết thanh, đông khô lượng huyết thanh thu được để hạn chế sự giảm hiệu giá của kháng thể trong huyết thanh.

Để tối ưu hóa sử dụng kháng thể trong kỹ thuật ELISA xác định EPCA-2, chúng tôi tiến hành pha loãng kháng thể ở các nồng độ giảm dần để kiểm tra khả năng xác định EPCA của KT với KN. Kết quả thu được, nếu ở độ pha loãng 1/2 nồng độ KT vẫn đạt 102,17ng/ml đủ để phát hiện EPCA-2, còn ở độ pha loãng 1/4 nồng độ KT giảm rất thấp không đảm bảo để xác định KN (bảng 3.6).

Như vậy, kết quả gây miễn dịch tạo kháng thể cho đặc hiệu kháng EPCA-2 ở người đã thu được tổng lượng kháng huyết thanh cho là 330 ml, nồng độ kháng thể tạo được là 229,17ng/ml, thời điểm thu kháng thể tốt nhất là khoảng 20 ngày sau mũi tiêm thứ 4.

### **4.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH EPCA-2 TRONG HUYẾT THANH 3 NHÓM NGHIÊN CỨU**

EPCA-2 với đặc điểm rất đáng lưu ý là chỉ tăng sớm và tăng mạnh ở tế bào ác tính tuyến tiền liệt [35],[36],[37]. Các nghiên cứu về EPCA-2 đã xác nhận hai epitope này được tìm thấy phổ biến trong huyết thanh bệnh nhân UTTL sớm 5 năm so với kết quả mô bệnh học và các biểu hiện trên lâm sàng [35],[37].

Huyết thanh cho có kháng thể đặc hiệu kháng hai epitope EPCA-2.22 và 2.19 sau khi được kiểm tra xác định có hoạt tính với kháng nguyên chuẩn và kiểm tra đối chứng với kháng thể trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO, được chúng tôi sử dụng trong kỹ thuật ELISA để xác định KN trong mẫu huyết thanh của 3 nhóm nghiên cứu đó là: 40 bệnh nhân UTTL, 40 bệnh nhân u phì đại lành tính TTL và 30 mẫu huyết thanh đối chứng âm của người nam bình thường cùng nhóm tuổi.

#### **4.3.1. Một số thông tin của 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt.**

##### **4.3.1.1. Thông tin về tuổi**

Trong nghiên cứu của chúng tôi với 110 mẫu nghiên cứu đã gặp tuổi thấp nhất là 55 và tuổi cao nhất là 101. Cả hai nhóm bệnh nhân UT TTL và u phì đại lành tính tuyến tiền liệt (UPĐLT TTL) đều có độ tuổi mắc bệnh cao nhất là từ 76 đến 85. Ở nhóm UT TTL tỷ lệ mắc bệnh ở độ tuổi này là 55% và nhóm UPĐLT TTL là 45%. Tỷ lệ mắc bệnh thấp nhất của 2 nhóm này là tuổi dưới 60, với nhóm UT TTL không có bệnh nhân dưới 60 còn nhóm UPĐLT TTL có 2 bệnh nhân tuổi dưới 60 (5%) (bảng 3.7, 3.8). Kết quả này của chúng tôi cũng tương đương với kết quả của Nguyễn Thị Phương Ngọc nghiên cứu trên 1270 nam giới trên 50 tuổi cũng thấy độ tuổi thấp nhất của các bệnh nhân TTL là 50, cao nhất là 89 và độ tuổi mắc UPĐLT TTL cao nhất trong nghiên cứu của Thị Phương Ngọc là trên 70 [94].

#### **4.3.1.2. Chỉ số PSA**

PSA là một protein được sản xuất bởi tế bào TTL. Bình thường chỉ một lượng rất nhỏ của PSA thoát được vào hệ tuần hoàn. Trong UT TTL, cấu trúc mô học bị phá vỡ, PSA được tiết trực tiếp vào khoảng gian bào, đi thẳng vào hệ tuần hoàn. Do đó trong UT TTL, nồng độ PSA huyết thanh thường tăng cao có thể gấp 10 lần so với mô tuyến tăng sinh lành tính [23],[24]. Tuy nhiên theo các nghiên cứu của Thompson, Catalon, Đỗ Khánh Hỷ và Hoàng Thị Phương Liên, nồng độ PSA tăng không là dấu hiệu đặc trưng của UT TTL bởi PSA còn có thể tăng do UPĐLT TTL, viêm, hay sau các thủ thuật thăm khám TTL...[24],[25],[26],[67],[68]. Giá trị PSA hiện vẫn được sử dụng để sàng lọc UT TTL. Với giá trị PSA < 4ng/ml thường ít gặp ở những bệnh nhân UT TTL. Giá trị PSA từ 4 - 10 ng/ml được gọi là vùng xám vì không cho phép phân biệt UT TTL và UPĐLT TTL. Giá trị PSA 10 - 20 ng/ml có giá trị định hướng chẩn đoán UT TTL còn khu trú. Giá trị PSA > 30ng/ml nghĩ đến UT TTL đã có di căn hạch.



Trong nghiên cứu của chúng tôi giá trị tPSA trung bình của nhóm UT TTL cao gấp 1,4 lần nhóm u phì đại lành tính TTL, và gấp 28 lần nhóm nam bình thường (bảng 3.9). Nếu chỉ xét riêng 2 nhóm bệnh nhân TTL kết quả cho thấy cả nhóm UT TTL và u phì đại TTL đều có bệnh nhân ở tất cả các mức nồng độ tPSA từ thấp < 4ng/ml đến cao trên 30ng/ml. Tuy nhiên chiếm tỷ lệ cao nhất ở nhóm UT TTL là những bệnh nhân có nồng độ tPSA > 30 ng/ml (30%) còn nhóm UPĐLT TTL là ở mức nồng độ 4 - 20 ng/ml (55%) (bảng 3.10). Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu của Thomson và Catalon cho rằng có sự tăng cao có ý nghĩa của chỉ số PSA ở những bệnh nhân UT TTL, tuy nhiên cũng có bệnh nhân UT TTL không có tăng PSA trong huyết thanh [24],[25],[26].

#### **4.3.2. Kết quả xác định EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt bằng kháng thể thử có đối chứng với kit thương phẩm**

EPCA-2 là dấu ấn sinh học đặc trưng của tuyến tiền liệt bị ung thư [37]. Hai epitope EPCA-2.22, 2.19 đã được chứng minh là xuất hiện sớm và phổ biến trong huyết thanh các bệnh nhân UT TTL [6],[38]. Sử dụng kháng thể đặc hiệu để xác định EPCA-2 không chỉ cho phép xác định bệnh mà còn có thể chẩn đoán giai đoạn bệnh [36],[5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 do chúng tôi tạo ra để xác định nồng độ kháng nguyên trong huyết thanh 3 nhóm nghiên cứu. Các kết quả được đối chứng với kết quả xác định EPCA-2 của bộ Kit ELISA (CUSABIO, mã số CSB - EQ 027679HU). Nồng độ EPCA-2 của hai phương pháp ELISA được định lượng dựa trên đường chuẩn của kit ELISA.

Đường chuẩn kit ELISA được dựng trên 5 điểm nồng độ có  $r^2 = 0,986$  gần tương đương với 1 cho thấy đây là đường chuẩn đáng tin cậy để suy ra nồng độ các kết quả đo được (bảng 3.2, hình 2.16).

Kết quả xác định nồng độ EPCA-2 của cả hai phương pháp ELISA trong nghiên cứu của chúng tôi đều khẳng định có sự hiện diện của EPCA-2 ở 100% huyết thanh bệnh nhân UTTTL. Đồng thời chiếm đa số là nồng độ EPCA-2 ở mức cao từ trên 100ng/ml đến 400 ng/ml. Số lượng bệnh nhân ở mức nồng độ này là 28/40 bệnh nhân với kết quả xác định bằng kit ELISA, và 30/40 bệnh nhân với kết quả xác định bằng kháng thể thỏ đặc hiệu (bảng 3.11). Đồng thời kết quả nghiên cứu của chúng tôi không thấy có bệnh nhân UTTTL với mức nồng độ EPCA-2 ngưỡng thấp nhất có thể phát hiện được (12,5ng/ml). Giá trị dương tính thu được ở nghiên cứu của chúng tôi cao bởi khi chọn mẫu nghiên cứu cho nhóm bệnh, chúng tôi đã chọn những bệnh nhân UTTTL chắc chắn có bệnh. Do tất cả các bệnh nhân này đều đã có đầy đủ kết quả dương tính với UTTTL bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch nhiều lát cắt (8 đến 10 lát cắt ) tại khối u sau phẫu thuật từ hai trung tâm giải phẫu bệnh của bệnh viện Hữu Nghị và bệnh viện Việt Đức. Kết quả này không chỉ khẳng định giá trị đặc hiệu của dấu ấn sinh học mới EPCA-2 mà còn cho thấy giá trị ứng dụng tốt của kháng thể đặc hiệu kháng EPCA-2 trong chẩn đoán UTTTL.

Để so sánh giá trị nồng độ phát hiện kháng nguyên EPCA-2 của hai phương pháp ELISA. Chúng tôi tính giá trị trung bình của nồng độ EPCA-2 trong 40 mẫu huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt được xác định song song bằng 2 phương pháp ELISA (phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thỏ so sánh với phương pháp ELISA dùng kit thương phẩm). Kết quả cho thấy giá trị trung bình nồng độ EPCA- 2 được phát hiện bằng kit ELISA cao hơn kết quả được phát hiện bằng kháng thể thỏ. Giá trị trung bình và phương sai của kết quả từ hai phương pháp ELISA kể trên lần lượt là  $279.8974 \pm 172.1579$  so với  $208.658 \pm 136.651$  (bảng 3.12).

### **4.3.3. Kết quả xác định EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân u phì đại lành tính tuyến tiền liệt và nam giới bình thường bằng 2 phương pháp ELISA.**

Để thêm khẳng định kết quả nghiên cứu, chúng tôi chọn 2 nhóm đối chứng cho nghiên cứu đó là: Nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL, và nhóm người nam bình thường cùng nhóm tuổi với nhóm nghiên cứu.

Sở dĩ chúng tôi chọn nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL, bởi thực tế hiện nay các xét nghiệm đều khó khăn trong chẩn đoán phân biệt UTTTL và u phì đại lành tính TTL. Các bệnh nhân chỉ được chọn vào nhóm nghiên cứu của chúng tôi khi đã có kết quả mô bệnh học nhuộm HE âm tính với UTTTL trên các mẫu mô sau phẫu thuật cắt bỏ TTL.

Kết quả thu được từ cả 2 phương pháp ELISA là 38/40 bệnh nhân của nhóm UPĐLTTL không có EPCA-2 trong huyết thanh (bảng 3.13). Điều này càng cho thấy EPCA-2 xuất hiện là đặc hiệu với UTTTL. Sở dĩ kết quả đạt được từ cả hai phương pháp ELISA xác định EPCA-2 ở đây gần như tuyệt đối là do chúng tôi đã sử dụng kết quả của phương pháp mô bệnh học (tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh TTL) làm cơ sở đối chứng cho kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Điều này đã góp phần làm tăng độ tin cậy của các kết quả nghiên cứu. Tuy nhiên trong số 40 bệnh nhân của nhóm UPĐLTTL chúng tôi phát hiện được 2 bệnh nhân có EPCA-2(+) trong huyết thanh với nồng độ thấp <25ng/ml (bảng 3.13 và phụ lục 3). Kiểm chứng lại với các biểu hiện khác trên lâm sàng thấy rằng: 2 bệnh nhân này có trọng lượng TTL đo được qua siêu âm là không lớn 24g và 32g, kèm theo chỉ số tPSA không tăng (0,77ng/ml và 3,66ng/ml). Từ kết quả của hai bệnh nhân trên cho thấy liệu đây có phải là giá trị của EPCA-2 trong chẩn đoán sớm UTTTL. Để khẳng định được cần thêm các minh chứng khác. Bởi cả 2 trường hợp này lâm sàng biểu hiện về hình thể và kích thước đều không lớn, kết quả mô bệnh học chưa xác định được. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với

ngiên cứu của Hansel (2009) và Barbara (2005) về giá trị chẩn đoán UTTL sớm 5 năm trước các biểu hiện rõ ràng về lâm sàng và mô bệnh học của EPCA-2 [35],[5].

Chúng tôi sử dụng huyết thanh của 30 nam giới bình thường không có các biểu hiện lâm sàng của bệnh TTL, không mắc các bệnh ung thư khác, có cùng nhóm tuổi với hai nhóm bệnh nhân của tuyến tiền liệt để làm đối chứng âm. Kết quả từ cả hai phương pháp ELISA đều trả lời 100% các mẫu huyết thanh của nhóm đối chứng âm này không có sự hiện diện của EPCA- 2 (bảng 3.14). Kết quả này một lần nữa khẳng định tính đặc hiệu cao của EPCA-2 đối với UTTL cũng như giá trị đặc hiệu tốt của xét nghiệm xác định EPCA-2 bằng kháng thể thỏ đặc hiệu kháng EPCA-2.22, 2.19.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Getzenberg khi đo nồng độ EPCA-2 ở 330 đàn ông thấy rằng kết quả của thử nghiệm EPCA-2 âm tính ở 97% những người đàn ông không UTTL[41].

Một nghiên cứu khác sử dụng phương pháp ELISA xác định nồng độ EPCA trong huyết thanh 449 bệnh nhân đã được phẫu thuật cắt bỏ TTL do phì đại so sánh với 112 nam giới khỏe mạnh. Với ngưỡng cutoff 10ng/ml, kết quả cho thấy EPCA huyết thanh ở bệnh nhân UTTL là  $17,63 \pm 2,42$  ng/ml, với những người không UTTL là  $5,58 \pm 1,61$  ng/ml và người khỏe mạnh là  $4,95 \pm 1,43$  ng/ml[5],[40].

Ngoài ra khi sử dụng phương pháp ELISA định lượng EPCA trong huyết tương của 46 người, bao gồm các nhóm: bệnh nhân UTTL, nhóm người khỏe mạnh, nhóm bệnh nhân ung thư khác, nhóm bệnh nhân bị chấn thương dây sống, và những bệnh nhân bị viêm tuyến tiền liệt (giá trị ngưỡng xác định 1,7 hấp thụ ở 450 nm). Kết quả cho thấy chỉ có các bệnh nhân UTTL có sự hiện diện của EPCA ở trên ngưỡng 1,7. Các phân tích thống kê cũng chỉ ra một sự khác biệt đáng kể trong mức độ biểu hiện EPCA

giữa các bệnh nhân UTTTL và các nhóm khác, đặc biệt là với nhóm người bình thường ( $p < 0.0001$ ) [38].

Thêm vào đó, khi sử dụng phương pháp ELISA định lượng EPCA trong huyết tương, độ nhạy của xét nghiệm dùng kháng thể đặc hiệu xác định EPCA cho bệnh nhân UTTTL là 92% độ đặc hiệu là 94%. Độ đặc hiệu của nhóm người khỏe mạnh là 100%. Nghiên cứu này càng chứng minh việc dùng KT đặc hiệu để xác định sự có mặt của EPCA trong máu để chẩn đoán sớm UTTTL là hoàn toàn có cơ sở [5],[40],[98].

Một số đề xuất hiện nay là nên sử dụng kết hợp cả EPCA-2 và tPSA để chẩn đoán sàng lọc UTTTL. Bởi mối tương quan mức độ biểu hiện của EPCA-2 và tPSA có sự khác biệt có ý nghĩa ở các bệnh nhân UTTTL so với bệnh nhân UPĐLTTL. Nghiên cứu của chúng tôi cũng nhận thấy có sự tương quan khác biệt này ở 2 nhóm bệnh nhân UTTTL và UPĐLTTL (bảng 3.15) tương tự như nghiên cứu của Akram và cộng sự năm 2012 tại Sudan hay Leman và cộng sự năm 2009 [99].

#### **4.3.4. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của 2 phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 và kháng thể trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO**

Để củng cố dữ liệu cho giá trị chẩn đoán của phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2. Chúng tôi tiến hành kiểm tra độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật. Với kết quả EPCA-2 dương tính ở 100% mẫu huyết thanh nhóm bệnh nhân UTTTL cho thấy độ nhạy của kỹ thuật đạt 100% (bảng 3.16). Đồng thời phương pháp này cũng cho kết quả EPCA-2 âm tính ở 38/40 mẫu huyết thanh nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL tương đương độ đặc hiệu đạt 95% (bảng 3.17).

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2 của chúng tôi hoàn toàn tương đồng với độ nhạy

và độ đặc hiệu của kit thương phẩm xác định EPCA-2 của hãng Cusabio (bảng 3.16, 3.17).

Độ nhạy và độ đặc hiệu này cũng phù hợp với kết quả của Barbara khi sử dụng kỹ thuật ELISA nghiên cứu trên 385 mẫu huyết thanh nam giới cũng thu được kết quả với độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 92% và 94% [5].

Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Getzenberg khi đo nồng độ EPCA-2 ở 330 nam giới. Kết quả xác định chính xác tới 90% cho những nam giới bị UTTTL còn khu trú và 98% những người có khối u đã lan ra ngoài tuyến. Các thử nghiệm này âm tính ở 97% những nam giới không UTTTL. Nghiên cứu này còn khuyến cáo thử nghiệm EPCA-2 cho phép xác định bệnh khi còn ở dạng vết với độ chính xác tới 94% [37],[39].

## KẾT LUẬN

1. Đề tài đã tái tổ hợp thành công polyepitpe EPCA-2.22,2.19 có hoạt tính với kháng thể đặc hiệu.

2. Bằng qui trình gây miễn dịch trên thỏ, đề tài đã tạo thành công kháng thể thỏ đặc hiệu với EPCA-2 (với tổng lượng huyết thanh thỏ thu được là 330ml và nồng độ kháng thể là 229,17ng/ml).

Kết quả thử nghiệm bước đầu cho thấy việc xác định EPCA-2 bằng kháng thể thỏ cho kết quả tương đương với kit thương phẩm của CUSABIO.

**KIẾN NGHỊ**

Kháng thể thu được của đề tài nên được tiếp tục hoàn thiện và sử dụng cho việc tạo kit xác định EPCA-2.



## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Đàm Thị Tú Anh, Phan Mai Hoa, Ngô Thị Thu Hiền, Lê Minh Phúc (2013), Tạo kháng thể thử đặc hiệu kháng kháng nguyên ung thư sớm tuyến tiền liệt (EPCA-2), *Y học Việt Nam*, tháng 11, 1.
2. Đàm Thị Tú Anh, Phan Mai Hoa, Lê Quang Huấn, Phạm Thiên Ngọc (2014), Xác định kháng nguyên ung thư sớm tuyến tiền liệt ( EPCA-2) trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt, *Y học lâm sàng*, tháng 10, 80.
3. Ngô Thị Thu Hiền, Đàm Thị Tú Anh, Lê Thị Minh Phúc, Phạm Thiên Ngọc, Lê Quang Huấn (2014), Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa Polyepitop của kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm (EPCA-2) trên vi khuẩn E.coli, *Y học lâm sàng*, tháng 10, 80.
4. Giải nhì, Hội nghị Khoa học nghiên cứu sinh, Trường Đại học Y Hà nội, năm 2013.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. DeVries S.H, Postma R, Raaijmakers R.H et al (2007). Overall and disease-specific survival of patients with screen-detected prostate cancer in the European randomized study of screening for prostate cancer, section Rotterdam. *European Urology*, 51(2), 366-374.
2. Roemeling S, Roobol M.J, deVries SH et al (2007). Active surveillance for prostate cancers detected in three subsequent rounds of a screening trial: characteristics, PSA doubling times, and outcome. *European Urology*, 51(2), 1244-1250.
3. Tenenholz T.C, Shields C, Ramesh V.R et al (2007). Survival benefit for early hormone ablation in biochemically recurrent prostate cancer. *Urologic Oncology*, 25(2), 101-109.
4. Eddy S.L, Grant W.C, Bruce J.T et al (2007). EPCA 2: A Highly Specific Serum Marker for Prostate Cancer. *Urology*, 69(4), 714-720.
5. Barbara P, Rajiv D, Douglas L et al (2005). Detection of Prostate Cancer with a Blood-Based Assay for Early Prostate Cancer Antigen. *Cancer Research*, 65, 40-97.
6. Shiyun Z, Alexa D, Garcia D.A et al (2014). Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Royal Society of Chemistry*, **139**, 439-445.
7. Australian Institute of Health and Welfare (2014). *Australian Cancer Incidence and Mortality (ACIM) Books*. Canberra: AIHW.
8. Globocan2012 (IARC) WHO(2014). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. *Section of Cancer Surveillance*  
<[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)> [28/10/2015].

9. Ferlaya J, Parkinb D, Steliarova E.F et al (2008). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, 46(4), 765-781.
10. Liz C (2015). National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 2015 Updated. <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>> [31/10/2015].
11. Breslow N, Chan C.W, Dhom G et al (1977). Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Internation Journal Cancer*, 20 (5), 680-688.
12. NHS Scotland (2010) Information and Statistics Division. *NHS Scotland. ISD Online*.
13. Office for National Statistics (2010) Welsh Cancer Intelligence and Surveillance Unit. Website hosted by *NHS Wales Informatics Service*
14. Office for National Statistics (2007) Registrations of cancer diagnosed in 2007. England Series MB1 no.38, *London: National Statistics*
15. National Cancer Institute (2000) *SEER 9 Cancer Statistics Review 1975-2002*.
16. Nguyễn Văn Hưng, Nguyễn Việt Hải, Nguyễn Thụy Linh (2004). Nghiên cứu đặc điểm mô bệnh học của ung thư tuyến tiền liệt. *Tạp chí Y dược học quân sự*, 5. 67-71.
17. Vũ Quang Huy, Nguyễn Thi Hồng Nhung (2010). Đánh giá độ chính xác, chất lượng của kỹ thuật PSA và sơ bộ thăm dò giá trị trong chẩn đoán nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt kết hợp với nội soi sinh thiết. *Y học thực hành*. 704(2). 43-47.

18. Vu Le Chuyen, Nguyen Hoai Nga, Nguyen Quang et al. (2010). Mass screening of prostate cancer in Vietnam: current status and our opinions. *Urologic Oncology*, **28** (6), 673-6.
19. H Shimada, T Noie, M Ohashi et al (2014). Clinical significance of serum tumor markers for cancer. A systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association, *33*, 17-26.
20. Lê Ngọc Bằng (2005). *Vai trò của sinh thiết kết hợp với PSA và siêu âm trong chẩn đoán ung thư tuyến tiền liệt*. Luận văn Thạc sĩ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội.
21. Nguyễn Văn Hưng (2005). *Nghiên cứu mô bệnh học quá sản lành tính, tân sản nội biểu mô và ung thư biểu mô tuyến tiền liệt*. Luận án Tiến sĩ y học. Trường Đại học Y Hà Nội.
22. Weinstein M.H, Epstein J.I (1993). Significance of high-grade prostatic intraepithelial neoplasie (PIN) on needle biopsy. *Human Pathology*, *24* (6), 624-629.
23. Salomon L, Descazeaud A (2008). Prostate cancer: news in 2008. *Prog Urol*, *18*(6), 116-24.
24. Myrtle J, Ivor L (1989). Measurement of prostate- specific antigen (PSA) in serum by a two- site immunometric method (Hybritech Tandem-R/ Tandem-E PSA). *Clinical aspects of prostate cancer*, Elsevier, New York.
25. Catalona W.J, Smith D.S, Ornstein D.K (1997). Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *The Journal of the American Medical Association*, *277* (18), 1452-5.

26. Thompson I.M, Ankerst D.P, Chi C et al (2005). Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *The Journal of the American Medical Association*, 294 (1), 66-70.
27. Thompson I.M, Pauler D.K, Goodman P.J et al. (2004) Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  4.0 ng per milliliter. *The New England Journal of Medicine*, 350 (22), 2239-46.
28. Catalona W.J, Richie J.P, Ahmann F.R et al (1994). Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *Journal of Urology*, 151 (5), 1283-90.
29. Lodeta B, Benko G, Car S, et al (2009). Prostate specific antigen density can help avoid unnecessary prostate biopsies at prostate specific antigen range of 4-10 ng/ml. *Acta Clinica Croatica*, 48 (2), 153-5.
30. Shariat S.F, Karakiewicz P.I (2008). Screening for prostate cancer in 2007: the PSA era and its challenges are not over. *European Urology*, 53 (3), 457-60.
31. Michael J.S, Thomas S, Matthias G et al (2014). Artifact reduction in non-destructive testing by means of complementary data fusion of x-ray computed tomography and ultrasonic pulse-echo testing. *Meas Science Technology*, 85, 053701-9
32. Venkaiah C. Kavuri D, Hanli L (2014). Hierarchical Clustering Method to Improve Transrectal Ultrasound-guided Diffuse Optical Tomography for Prostate Cancer Imaging. *Academic Radiology*, 21(2), 250–262.
33. *Radiology Info.org* (2015) Positron Emission Tomography - Computed Tomography.Review<<http://www.mountsinai.org/patient-care/health-library/treatments-and-procedures/pet-ct-scan>> [3/11/2015].

34. Giampiero G, Maria P, Rita G. Pet al (2014). C-Choline PET/CT Predicts Prostate Cancer–Specific Survival in Patients with Biochemical Failure During Androgen-Deprivation Therapy. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(2), 233-241.
35. Hansel D.E, DeMarzo A.M, Platz et al (2009). Early prostate cancer antigen expression in predicting presence of prostate cancer in men with histologically negative biopsies. *PubMed*, 177(5), 1736-40.
36. Eddy S. Lemana, Grant W (2007). EPCA 2: A Highly Specific Serum Marker for Prostate Cancer. *The Juornal Urology*, .
37. Getzenberg, Robert, H (2009). Early Prostate Cancer Antigen-2 (EPCA-2) As a Novel Serum Specific Marker for Prostate Cancer Detection, *University of Pittsburgh* posted on November 05.
38. Zhigang Z, Guohua Z, Wen Z (2011). Serum early prostate cancer antigen (EPCA) as a significant predictor of incidental prostate cancer in patients undergoing transurethral resection of the prostate for benign prostatic hyperplasia. *Wiley-Liss, Inc.* Article first published online.
39. Sohiya Y, Hiroshi M(2014).Evaluation of serum-based cancer biomarkers: A brief review from a clinical and computational viewpoint. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. doi:10.1016/j.critrevonc.10.002.
40. Shiyun Z, Alexa D, Garcia D'Aet al (2014). Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Royal Society of Chemistry*, **139**, 439-445.
41. Han K.R, Seligson D.B, Liu X et al. ( 2008). Prostate stem cell antigen expression is associated with Gleason score, seminal vesicle invasion and capsular invasion in prostate cancer. *Juornal Urology*, 17, 1117–21.

42. Lam J.S, Yamashiro J, Shintaku I.P et al ( 2009). Prostate stem cell antigen is overexpressed in prostate cancer metastases. *Clinical Cancer Research*, 11, 2591–6.
43. Lei W, Hua X, Fengxia W(2014). Hexokinase 2-Mediated Warburg Effect Is Required for PTE-and p53–Deficiency-Driven. *Prostate Cancer Growth*. 8(5), 1461–1474.
44. Girish S, Barry D, Eleftherios P (2008). Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Clinical Chemistry*, 54(12), 1951–1960.
45. Mariela V, Rebeca R.G (2013) Serum Osteoprotegerin and Sex Steroid Levels in Patients With Prostate Cancer. *Journal of Andrology*, 33(4), 594–600.
46. Spyros G, Anthos C, Eliona G, et al (2013). Osteoprotegerin expression during the micr and macrometastatic phases of the osteoblastic metastasis in prostatecancer:therapeutic implication. *Information Healcare*, 17(12), 1395-1403.
47. Vicki M, Henry H, Cristobal G (2013). Current status of biomarker for prostate cancer. *Internation Journal*, 14, 11034-11060.
48. Stephan C, Jung K, Lein M et al (2000). Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epi- demiol Biomarkers*, 9, 1133–47.
49. Shahrokh F, Shariat, Jose (2008) Improved predition of disease relapse after radical prostatectomy through a panel of preoperative blood based biomarkers. *Clinical cancer research*, 14, 3785-3791.
50. Frederic R, Kamilla M, Zoran C et al (2010). Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion

and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 17, 241-253.

51. El-Gohary Y.M, Silverman J.F, Olson P.R et al (2009). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*, 127, 572–9.
52. Pan L, Baek S, Edmonds P.R et al (2013). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in locally advanced prostate cancer: secondary analysis of radiation therapy oncology. *Radiation Oncology*, 8, 100-8.
53. Viktor Berge, Louise Dickinson, Neil McCartan et al (2014) Morbidity Associated with Primary High Intensity Focused Ultrasound and Redo High Intensity Focused Ultrasound for Localized Prostate Cancer. *The Journal of Urology*. 91 (6), 1764–1769.
54. Philip M. Arlen H (2011). Immunotherapy for the treatment of Prostate Cancer. *Nature Review Clinical Oncology*, 8, 551-556.
55. Morris J.C, Ramlogan S, Yu P et al (2014). Vaccination with tumor cells expressing IL-15 and IL-15R $\alpha$  inhibits murine breast and prostate cancer. *Gene Therapy*. 21, 393–401.
56. Catharine P, Elankumaran et al (2013). Virus That Kills Prostate Cancer Cells Shows Treatment Potential. <http://www.prostate.net/2013/prostate-cancer/virus-treatment-for-prostate-cancer/> [3/11/2015].
57. Raghunath S, Siba K. Subbiah E (2013). Prostate Specific Antigen Retargeted Recombinant Newcastle Disease Virus for Prostate Cancer Virotherapy. *Journal of Virology*, 87(7), 3792-3800.



58. Megan Brooks (2014) FDA Grants Expanded Indication for Enzalutamide (*Xtandi*). *Medscape*. <<http://www.medscape.com/viewarticle/831548>> Sep 11, 2014.
59. Members of the ACS Medical Content Staff (2014). FDA Approves Xofigo for Advanced Prostate Cancer. *American Cancer Society*, <<http://www.cancer.org/cancer/news/fda-approves-xofigo-for-advanced-prostate-cancer>> [May 15, 2013].
60. Denny WA (2001). Prodrug strategies in cancer therapy. *European Journal Medicine Chemistry*, 36 (7–8), 577–595.
61. Stenman H.U (2011). A new therapeutic target in cancer?. *Clinical chemistry*, 57(11), 1474-1475.
62. Veitonmaki T, Kumar S.K, Murtura I.T, et al (2008). Targeted inhibition of hedgehog signaling by cyclopamine prodrugs for advanced prostate cancer. *Medicine Chemistry*, 16(6), 2764–2768.
63. Ross J.S, Sheehan C.E, Fisher H.A.G et al (2003) Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 9(17), 6357–6362.
64. Mhaka A, Singh P (2004) Use of methotrexate-based peptide substrates to characterize the substrate specificity of prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Cancer Biology Therapy*, 3 (6) (2004) 551–558.
65. Shanta D, Frank X.G, Robert L, et al (2008). Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci*. 105(45), 17356–17361.

66. Yoneda Y, Steiniger S.C, Capková K et al (2008). A cell-penetrating peptidic GRP78 ligand for tumor cell-specific prodrug therapy, *Bioorg. Med Chem. Lett*:18(5):1632–6.
67. Đỗ Thị Khánh Hỷ (2003). *Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học của u phì đại tuyến tiền liệt và đánh giá vai trò của PSA huyết thanh trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh*. Luận án tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
68. Hoàng Thị Phương Liên (2007). *Nhận xét một số yếu tố ảnh hưởng tới nồng độ PSA huyết thanh ở bệnh nhân phì đại tuyến tiền liệt*. Luận văn thạc sĩ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội.
69. Nguyễn Thị Phương Ngọc (2009). *Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học, chỉ số sinh hóa và mức độ biểu hiện gen HIP trong u tuyến tiền liệt*. Luận án Tiến sĩ Y học. Trường Đại học dược Hà Nội.
70. Lê Quang Huân (2011). *Nghiên cứu kháng nguyên biểu hiện sớm, đặc hiệu ung thư tuyến tiền liệt (EPCA) để tạo kit chẩn đoán. Đề tài cấp bộ công nghệ sinh học*.
71. Nguyễn Đình Bảng, Nguyễn Linh Toàn, Hồ Anh Sơn và cs (2011). *Nghiên cứu tạo khối ung thư người trên chuột và đánh giá độ tập trung của thuốc kháng thể kháng nhân gắn iod phóng xạ vào khối ung thư. Tạp chí Y- Dược học Quân sự, 51(4), 53-59*
72. Hồ Anh Sơn, Bùi Khắc Cường, Li Feng Zhang và cs (2014). *Nghiên cứu trị liệu ung thư tuyến tiền liệt bằng phối hợp hai oncolytic virus Sởi (Measle) và quai bị (Mump) trên thực nghiệm. Tạp chí Y- Dược học Quân sự, 2 – Kết quả nghiên cứu chương trình KHCN KC.10/11-15.*
73. Trường Đại học Y Hà Nội (2007) *Sinh lí bệnh- Miễn dịch*, Nhà xuất bản Y học, Hà nội.

74. Kohler.G, Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
75. Nguyễn Hoàng Lộc, Lê Việt Dũng, Trần Quốc Dung (2007). *Giáo trình Công nghệ DNA tái tổ hợp*. NXB Đại học Quốc gia, TP Hồ Chí Minh.
76. **Robert I. Roth (2001)**. Antibody Technology -- From Mice to Cells, to Mice Again and Finally, to Microbes. 41(3) © American Pharmacists Association.
77. Zhen H, Jack W, Szostak (2010). Evolution of aptamer with a new specificity and new secondary structure from an ATP aptamer. *Cold Spring Harbor Labor Laboratory Press*, 11, 1456-1463.
78. Wang W, JIA L.Y (2009). Progress in Aptamer screening methods. *Chinese Journal of analytical chemistry*, 37(3), 1055-1062.
79. Nguyễn Hoàng Lộc (2007) *Giáo trình nhập môn công nghệ sinh học, chương 6*, Nhà xuất bản Đại học Huế.
80. Lê Thanh Hòa (2005). *Sinh học phân tử: Nguyên lý và ứng dụng*. Tài liệu giảng dạy sau đại học, Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia.
81. Bộ môn Sinh lí bệnh (1981). *Những kĩ thuật cơ bản dùng trong miễn dịch học tập 1*, Nhà xuất bản Y học, 95- 116.
82. Takuzo I, Hiromi I, James F.H (1968). Isolation of Albumin from Human Serum by Mean of Trichloroacetic Acid and Ethanol A Comparison of Methods. *Clinical Chemistry*, 14 (1), 22-30.
83. John M Walker (2008). *The ELISA Guide Book*, 2nd edition, Methods In Molecular Biology, 516, Humana Press, Springer, New York, USA.
84. Tạ Thành Văn (2010). *PCR và một số kĩ thuật y sinh học phân tử*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

85. Phạm Hùng Vân (2009). *PCR và realtime-PCR các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
86. Kim E.K, Moon J.C, Lee J.M, et al (2012). Large-scale production of soluble recombinant amyloid- $\beta$  peptide 1-42 using cold-inducible expression system. *Protein Expression and Purification*, 86 (1), 53-7.
87. Trần Ngọc Tân, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải (2007). Biểu hiện gen Neuraminidase mã hóa cho phần epitope kháng nguyên (NAE) của virus cúm A/H5N1 trong tế bào *E. coli*. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 5(1), 25-30.
88. Gong Q, Yang X, Cai W, et al (2010). Expression and purification of functional epitope of pigment epithelium-derived factor in *E.coli* with inhibiting effect on endothelial cells. *Protein Journal*, 29 (3), 168-73.
89. He J, Xiu B, Wang G, et al (2011). Construction, expression, purification and biotin labeling of a single recombinant multi-epitope antigen for double-antigen sandwich ELISA to detect hepatitis C virus antibody. *Protein and Peptide Letters*, 18 (8), 839-47.
90. Vaillancourt P.E (2003). *E.coli gene expression protocols*. Humana Press, New Jersey- USA.
91. Morgan A.A, Rubenstein E (2013). Proline: The distribution, frequency, positioning, and common functional roles of proline and polyproline sequences in the human proteome. *PLoS ONE*, 8(1).
92. David L.N, Micheal M.C (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*, Palgrave Macmillan, USA.
93. Chen S, Liu Z, Chen J, et al (2011). Study on improvement of extracellular production of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165 (2), 666-75.
94. Yong G.X, Han F.F, Luan C, et al (2013). High-yield soluble expression and simple purification of the antimicrobial peptide OG2

using the intein system in *Escherichia coli*. *BioMed Research International*, Article ID 754319, 6 pages.

95. Simin S, Azim A, Dariush N et al (2011). Production and Purification of Rabbit's Polyclonal Antibody Against Factor VIII. *Indian Journal Clinical Biochemistry*, 26(4), 354–359.
96. Rattana W, Beng T.T, Wen S.T et al (2011). Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. *Process Biochemistry*, 46, 101–107.
97. Abul K.A, Andrew H. Lichtman (2012). *Basic immunology function and disorders of the immune system*. The Curtis Center Philadelphia PA 19106-3399.
98. Leman E.S, Magheli A, Canon G.W et al (2009). Analysis of a serum test for prostate cancer that detects a second epitope of EPCA-2. *Prostate*, 69, 1188-1194.
99. Akram H.A, Bader E.H, Abdelgader A.A (2012). Evaluation of Prostate Specific Antigen and Early Prostate Cancer Antigen 2 as Diagnostic Markers for Prostate Cancer among Sudanese with Prostate Enlargement. *Sudanese Journal of public health*, 7(2), 47-50.

**PHỤ LỤC 1**  
**DANH SÁCH NGƯỜI CHO MẪU NGHIÊN CỨU**

<b>TT</b>	<b>Họ và tên</b>	<b>Tuổi</b>	<b>Mã bệnh án</b>	<b>Địa chỉ</b>
1	Ng Tiến X.	75	1208455	
2	Ng Văn C.	70	1208570	
3	Ng Việt M.	78	1209069	
4	Tăng Th.	84	1209187	
5	Lê Văn V.	59	1209457	
6	Bùi Văn B.	84	1208917	
7	Vũ Anh T.	81	1209644	
8	Ng Hồng V.	82	1209551	
9	Phạm Đức Th.	71	1210758	
10	Phan M.	63	1209824	
11	Lê Văn Nh.	79	1209671	
12	Ng Văn M.	78	1210984	
13	Đào Việt M.	73	1211415	
14	Nghiêm Quý Ch.	82	1211802	
15	Ng Văn V.	71	1212015	
16	Phan Ngọc Qu.	73	1211786	
17	Ng Trí Th.	77	1211793	
18	Vũ Hồng Đ.	66	1213115	
19	Trần Đình O.	74	1212146	
20	Ng Công T.	65	121378	
21	Đông Văn C.	71	1212298	
22	Vũ Xuân M.	56	1214655	

23	Ng Đức O.	79	1214317	
24	Ng Hải S.	84	1209578	
24	Lê Văn H.	69	1216367	
26	Ng Quang Đ.	101	1217457	
27	Đỗ Trọng L.	75	1302020	
28	Hà Huy S.	79	1304942	
29	Đỗ H.	78	1303552	
30	Đỗ Duy Th.	75	1302832	
31	Đỗ Đức H.	78	1302246	
32	Ng Quý Ph.	80	1302723	
33	Đỗ Văn Tr.	71	1302494	
34	Tạ Ngọc H.	69	1304550	
35	Phí Mạnh H.	76	1302471	
36	Vương Chí H.	77	1309217	
37	Chu Duy Ph.	74	1305876	
38	Ng Tiến X.	75	1208455	
39	Ng Văn C.	70	1208570	
40	Ng Việt M.	78	1209069	
41	Ông Vĩnh B.	75	1211670	
42	Ng Văn T.	78	1212274	
43	Ng Quốc Kh.	80	1216133	
44	Ng Văn Tr.	67	1356	
45	Bạch Công Ch.	64	1361	
46	Ng Văn Ch.	77	1212692	
47	Trần Mạnh H.	70	BV Đại Học Y	
48	Bùi Văn T.	85	1304310	

49	Nguyễn Đ.	77	1303760	
50	Phạm Xuân Tr.	88	1304623	
51	Lê Viết L.	64	Bv K cơ sở 2	
52	Nguyễn Văn Kh.	79	Bv K cơ sở 2	
53	Phạm Xuân S.	67	1309482	
54	Đặng Văn D.	78	1308717	
55	Đào Bá Ch.	78	1311378	
56	Bùi Thọ H.	68	Bv K cơ sở 2	
57	Đỗ Trọng L.	75	1302020	
58	Nguyễn Ngọc B.	71	1311201	
59	Nguyễn Văn A.	70	13201373	
60	Trần Hồng T.	78	1312159	
61	Nguyễn Văn Nh.	71	1313285	
62	Nguyễn Mậu C.	75	1312971	
63	Nguyễn Trọng Kh.	80	1313399	
64	Đỗ Xuân Y.	76	1313769	
65	Vũ Hữu T.	74	1313710	
66	Lê Mạnh H.	76	1313868	
67	Nguyễn D.	80	1314734	
68	Đinh Văn L.	80	1314756	
69	Nguyễn Quang H.	72	1314791	
70	Trần Thanh T.	83	1316655	
71	Phan Tất G.	79	1316525	
72	Vũ Đình Đ.	70	1317060	
73	Nguyễn Năng V.	74	1316950	
74	Võ Thế A.	79	1316936	



75	Văn Hữu Th.	83	13126255	
76	Nguyễn Hữu H.	82	1314021	
77	Phùng Văn D.	75	BV K cơ sở 2	
78	Nguyễn Hữu C.	81	1307950	
79	Khuất Duy Ng.	73	1304762	
80	Nguyễn Văn X.	78	1304795	
81	Nguyễn Tiến Th.	72		298 Tây Sơn HN
82	Lê Phương Ng.	77		169 Tây Sơn HN
83	Nguyễn Hữu Gi.	83		218 Hàng Bột
84	Vũ Xuân D.	65		137 Ng Ngọc Vũ
85	Vũ K.	77		D3 Thành Công
86	Vũ Công Nh.	80		96 Thanh Nhàn
87	Nguyễn Văn Ch.	71		206 C4 Nghĩa Tân
88	Nguyễn Văn T.	76		86/98/165 Chùa Bộc
89	Trần Đức H.	55		6/249 Chùa Bộc
90	Phùng Đức Ng.	80		41/47 Thanh Xuân
91	Đỗ Văn Ph.	63		TT pin Văn Điển
92	Hoàng Hải Q.	64		16/B2 Bach Đằng
93	Đình Mạnh H.	65		Yên Viên, Gia Lâm
94	Nguyễn Văn Tr.	71		278 Hàng Bột
95	Phạm Hoàng K.	70		20/100 Văn Hương
96	Nguyễn Văn Th.	84		18/325 Kim Ngưu
97	Đỗ Việt Đ.	67		8 Bát Đàn
98	Lưu Huy V.	73		Ba Đình, HN
99	Nguyễn Hữu B.	67		10/61 Yên Hòa
100	Phạm Hữu D.	64		60 B2 Văn Chương

101	Bùi Đức D.	67		10/101 Thanh Nhân
102	Trần Công Ch.	75		310/A1 Đại La
103	Nguyễn Đ.	73		211 Hồng Hà
104	Lại Ngọc S.	59		Hàng Bài
105	Nguyễn Tiến T.	71		A1/51 Cẩm Hội
106	Phan Ngọc D.	72		Thượng Đình
107	Nguyễn Hữu M.	67		25/93 Văn Cao
108	Phạm Ngọc Tr.	71		389 Trương Định
109	Phạm Văn C.	68		Phúc Xá, Ba Đình
110	Nguyễn D.	84		306/10b Bách Khoa

**Ngày 25 tháng 12 năm 2014**

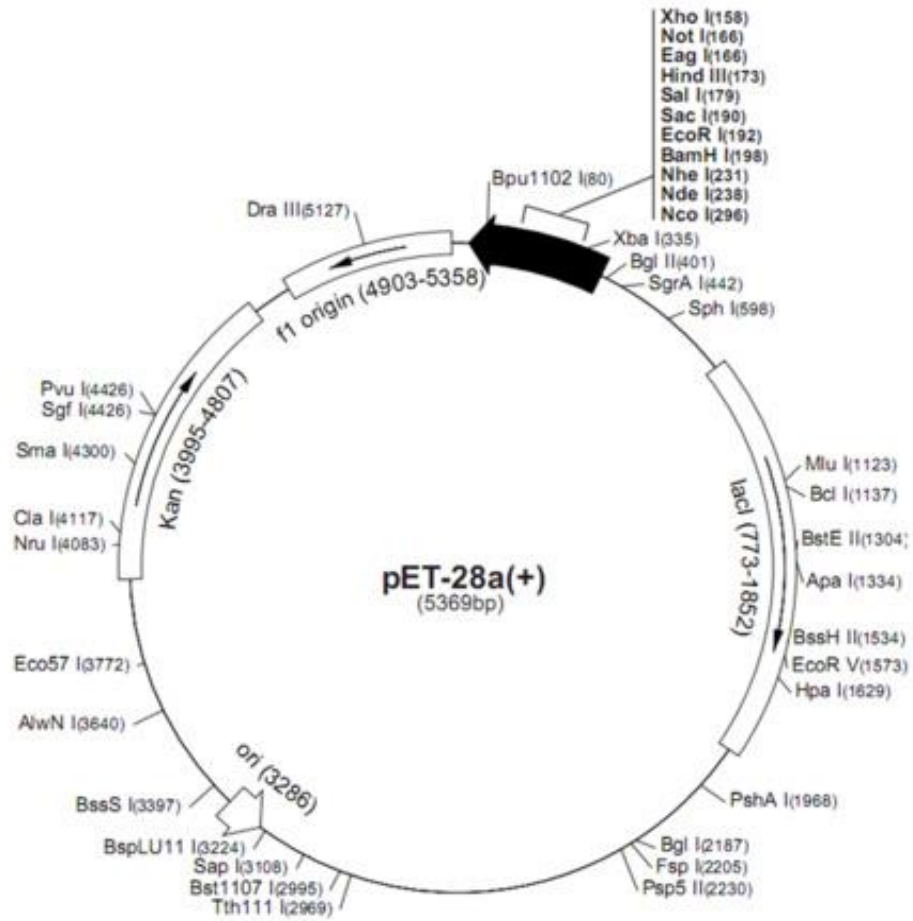
**XÁC NHẬN CỦA THẦY HƯỚNG DẪN**

**XÁC NHẬN CỦA PHÒNG KHTH BV  
HỮU NGHỊ**

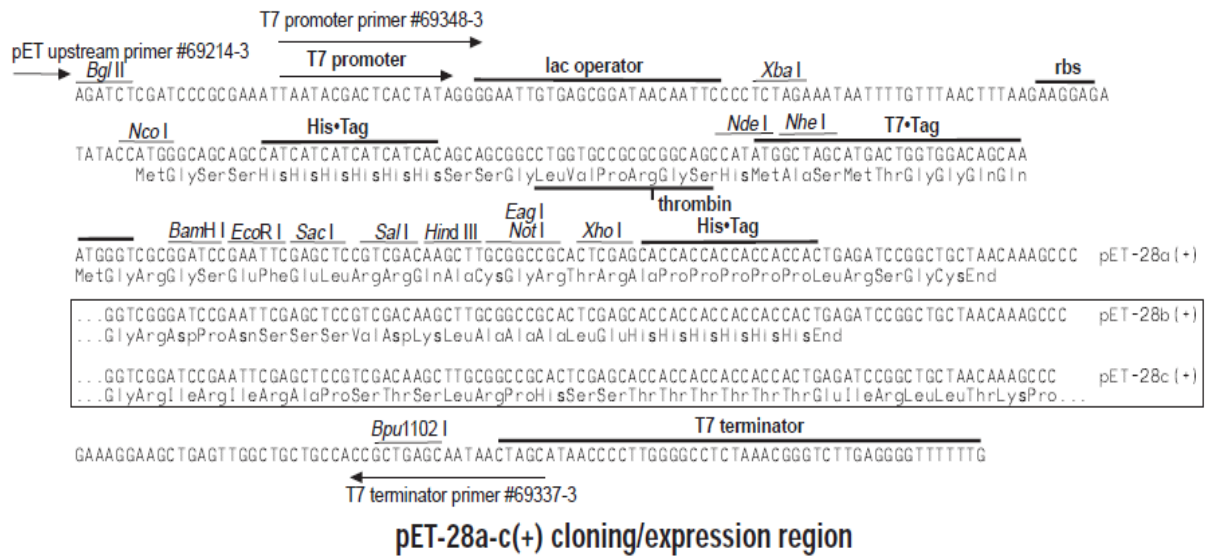
**PGS.TS Phạm Thiện Ngọc**

**Trưởng phòng KHTH  
ThS.Bs Nguyễn Thị Hải Yến**

## PHỤ LỤC 2



*Sơ đồ cấu trúc vector pET-28a(+)*



**Vùng cắt gán đa vị (MCS) trong vector pET-28a(+)**

**Môi trường LB (Luria- Bertani) lỏng (1L):**

- Cao nấm men: 5 g
- Tryptone: 10 g
- NaCl: 5 g

Chỉnh về pH 7,2-7,4 bằng NaOH.

**Môi trường LB đặc (1L):**

- Cao nấm men: 5 g
- Tryptone: 10 g
- NaCl: 5 g

Chỉnh về pH 7,2-7,4 bằng NaOH.

Agar bacto: 15 g

**TAE 50X (250mL):**

Tris base: 60,5 g

Acid acetic: 14,3 mL

EDTA 0,5M pH8: 25 mL

Thêm nước khử ion đến đủ 250 mL

**Sol I (Solution I) (50mL):**

Glucose 50mM: 0,45 g

Tris HCl 25mM: 1,25 mL

EDTA 10mM pH8: 1 mL

Thêm nước khử ion đến đủ 50 mL.

**Sol II (Solution II) (10mL):**

SDS 20%: 0,5 mL

NaOH 10N: 0,2 mL

Thêm nước khử ion đến đủ 10 mL.

**Sol III (Solution III) (50mL):**

Kali acetat 5M: 14,72 g

Glacial acetic acid: 5,57 mL

Thêm nước khử ion đến đủ 50 mL.

**Lysis buffer**

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

500mM NaCl

**PHỤ LỤC 3**  
**MẪU BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU**

**Bệnh viện:** .....

**Mã số hồ sơ:** .....**Mã nghiên cứu:** .....

**Hành chính**

A1. Họ tên bệnh nhân: .....

A2. Tuổi: ..... A3. Nghề nghiệp: .....

A4. Dân tộc: .....

A5. Địa chỉ:.....ĐT Thoại:.....

A6. Người thân:.....ĐT Thoại:.....

A7. Lý do vào viện.....

A8. Ngày vào viện...../...../.....

A9. Ngày ra viện ...../...../.....

**Tiền sử**

B1. Tiền sử bệnh nội khoa:       Không có                       Không mô tả

Có:(ghi cụ thể).....

B2. Tiền sử ngoại khoa:               Không có                       Không mô tả

Có:(ghi cụ thể).....

B3. Tiền sử gia đình:                       Không có ai bị UTTLT       Không mô tả

Có:(ghi cụ thể).....

**Triệu chứng lâm sàng:**

C1. Cân nặng.....kg

C2. Mạch.....lần/phút

C3. Huyết áp.....mmHg

*Triệu chứng cơ năng trước mổ:*

C4.Đái khó-bí đái:	ÍKhông	ÍCó	ÍKhông mô tả
C5.Đái rất-đái đêm:	ÍKhông	ÍCó	ÍKhông mô tả
C6.Đái buốt-đái đục:	ÍKhông	ÍCó	ÍKhông mô tả
C7.Đái máu:	ÍKhông	ÍCó	ÍKhông mô tả
C8.Khác:	ÍKhông		

ÍCó(ghi cụ thể) .....

*Triệu chứng thực thể trước mổ:*

C10.Hạch bẹn-ngoại vi:	ÍKhông	ÍCó	ÍKhông mô tả
C11.Cầu bàng quang:	ÍKhông	ÍCó	ÍKhông mô tả

C12.Sờ thấy TTL qua khám trực tràng:

Mật độ:	ÍMềm	ÍRắn	ÍKhông mô tả
Nhân rắn:	ÍKhông	ÍCó(số nhân)....	ÍKhông mô tả
Án đau:	ÍKhông	ÍCó	ÍKhông mô tả
Xâm lấn tạng xung quanh:	ÍKhông	ÍCó	

C13.Các triệu chứng khác(ghi cụ thể).....

**Cận lâm sàng:**

D1.Xét nghiệm PSA (ng/ml)

Í PSA <4	Í PSA 4-10	Í PSA >10-20
Í PSA >20-50	Í PSA >50-100	Í PSA >100

D2.XQ phổi thẳng: Í Bình thường      Í Tràn dịch màng phổi      Í Nốt mờ

Í Khác (ghi cụ thể).....

D3.KQ siêu âm ổ bụng:            1 Không            1 Có

1 Thận-niệu quản (P): 1 Bình thường            1 Giãn 1 Không mô tả

1 Thận-niệu quản (T): 1 Bình thường            1 Giãn 1 Không mô tả

1 Bàng quang:            1 Bình thường            1 Viêm            1 Không mô tả

1 Hạch ổ bụng:            1 Không            1 Có            1 Không mô tả

**Tuyến tiền liệt:**

Khối lượng: .....g

Mật độ: 1 Giảm âm 1 Tăng âm            1 Không mô tả

1 Các bất thường khác (ghi cụ thể).....

D4.KQ Siêu âm qua trực tràng lúc STTTL: 1 Không            1 Có

Bàng quang: 1 Bình thường            1 Viêm            1 Không mô tả

Hạch chậu: 1 Không            1 Có            1 Không mô tả

Xâm lấn túi tinh: 1 Không            1 Có

Tổn thương, xâm lấn thành trực tràng: 1 Không            1 Có

**Tuyến tiền liệt:**

Khối lượng: .....g

Mật độ: 1 Giảm âm 1 Tăng âm            1 Không mô tả

Vị trí nhân: 1 Thùy (P)            1 Thùy (T)

Các bất thường khác(ghi cụ thể).....

D5.KQ chụp cắt lớp vi tính (nếu có).....

D6.Có di căn khác:            1 Không

1 Có (ghi cụ thể).....



D7.Các xét nghiệm khác (ghi cụ thể).....

**Kết quả giải phẫu bệnh:**

- Kết quả:.....
- Nơi thực hiện:
- Họ tên người đọc kết quả:.....

Trình độ(học hàm, học vị).....

- Mẫu gửi làm giải phẫu bệnh là mẫu mô từ:  
Sinh thiết TTL  
Mô TTL sau mổ

*Ngày...tháng...năm 20...*

**Xác nhận của cơ quan có chủ quyền**

**Người làm hồ sơ**

**PHỤ LỤC 4**  
**KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH EPCA-2**

Protocol	
Date/Time	01/06/2014 12:29:46
Technician	
Plate ID	
Unit	
Reader Setup	Endpoint Single 450.0nm Mix off Temp **.*
Reader Model #	iMark
Reader Serial #	11484
Reader Version #	1.02.01 Build 01
Comment	

Using Standard Data Set from Current Experiment.

Linear Fit:  $Y = \text{slope} * X + \text{intercept}$

20/50/80%:  $X = 80.600 / 196.482 / 312.365$   $Y = 0.496 / 1.003 / 1.511$

intercept: 0.143 (+/-0.061), slope: 0.004 (+/-0.000)

chi2=0.027, RMS=0.095,  $r^2=0.986$

Standards Report:

Std #	Conc	Well	Replicates	Mean	SD	%CV
1	12.5	B1	0.069	0.069	(*)	(*)
2	25	C1	0.077	0.077	(*)	(*)
3	100	D1	0.184	0.184	(*)	(*)
4	200	E1	0.288	0.288	(*)	(*)
5	400	F1	0.591	0.591	(*)	(*)

KT tho

Data Analysis Report:

Sample ID	Well	Replicates	Mean	Conc
10B	B7	0.202	0.202	22.108
10C	C2	0.016	0.016	(-)
10K		4.035	4.035	484.053
11B	G10	0.156	0.156	17.074
11K	B11	3.058	3.058	390.444
11C	D2	0.029	0.029	0.834

12K	H10	0.221	0.221	25.8191
12C	E2	0.011	0.011	(-)
13K	C7	4.022	4.022	513.441
13C	F2	0.013	0.013	(-)
14K	D7	0.215	0.215	25.1492
14C	G2	0.013	0.013	(-)
15K	E7	0.216	0.216	25.3915
15B	H2	0.060	0.060	4.823
16B	F7	0.004	0.004	(-)
16K	C11	3.127	3.127	399.247
16C	A3	0.009	0.009	(-)
17B	G7	0.069	0.069	5.963
17C	D11	0.018	0.018	(-)
17K	B3	0.221	0.221	26.6326
18K	H7	0.27	0.27	32.7703
18B	E11	0.024	0.024	0.265
18C	C3	0.049	0.049	3.398
19B	A8	0.089	0.089	8.527
19K	D3	1.128	1.128	131.812
1K	C1	1.288	1.288	150.555

20C	F11	0.004	0.004	(-)
20K	E3	1.367	1.367	159.726
21B	B8	0.062	0.062	5.108
21C	G11	0.018	0.018	(-)
21K	F3	1.228	1.228	143.498
22C	H11	0.011	0.011	(-)
22K	G3	0.942	0.942	110.124
23C	A12	0.002	0.002	(-)
23K	H3	0.997	0.997	116.483
24K	A4	1.091	1.091	127.484
25C	B12	0.022	0.022	(-)
25K	B4	0.869	0.869	101.557
26C	C12	0.024	0.024	0.265
26K	C4	1.161	1.161	135.672
27B	C8	0.104	0.104	10.521
27C	D12	0.013	0.013	(-)
27K	D4	0.893	0.893	104.343
28B	D8	0.047	0.047	3.114
28C	E12	0.016	0.016	(-)
28K	E4	3.11	3.11	397.096

29C	F12	0.022	0.022	(-)
29K	F4	0.703	0.703	87.7984
2B	B6	0.058	0.058	4.538
2C	H9	0.011	0.011	(-)
2K	D1	1.407	1.407	164.479
30B	E8	0.038	0.038	1.974
30C	G12	0.012	0.012	(-)
30K	G4	2.968	2.968	378.949
31K	H4	2.983	2.983	380.907
32B	F8	0.104	0.104	10.521
32K	A5	3.101	3.101	395.951
33B	G8	0.060	0.060	4.823
33K	B5	1.255	1.255	146.646
34B	H8	0.071	0.071	6.247
34K	C5	0.843	0.843	98.5266
35B	A9	0.087	0.087	8.242
35K	D5	0.67	0.67	83.5523
36K	E5	1.563	1.563	199.535
37K	F5	1.599	1.599	199.102
38K	G5	1.561	1.561	199.353

39B	B9	0.107	0.107	10.806
39K	H5	2.596	2.596	331.497
3B	C6	0.102	0.102	10.236
3C	A10	0.016	0.016	(-)
3K	E1	2.811	2.811	358.884
40K	A6	2.725	2.725	347.875
42B	C9	0.058	0.058	4.538
43B	D9	0.067	0.067	5.678
44B	E9	0.053	0.053	3.968
46B	F9	0.087	0.087	8.242
49B	G9	0.071	0.071	6.247
4B	D6	0.049	0.049	3.398
4C	B10	0.002	0.002	(-)
4K	F1	2.396	2.396	305.987
5B	E6	0.053	0.053	3.968
5C	C10	0.004	0.004	(-)
5K	G1	1.505	1.505	192.186
6B	F6	0.073	0.073	6.532
6C	D10	0.008	0.008	(-)
6K	H1	1.516	1.516	193.539

7B	G6	0.049	0.049	3.398
7C	E10	0.018	0.018	(-)
7K	A2	2.451	2.451	312.927
8B	H6	0.067	0.067	5.678
8C	F10	0.006	0.006	(-)
8K	B2	1.511	1.511	192.948
9B	A7	0.078	0.078	7.102
9K		1.492	1.492	174.385
POL EPCA	B1 H12	0.216 0.413	0.325	37.3106

EPCA KIT

**Data Analysis Report:**

Sample ID	Well	Replicates	Mean	Conc
10B	B7	0.222	0.222	25.621
10C	C2	0.016	0.016	(-)
10K		5.185	5.185	662,011
11B	G10	0.264	0.264	31.034



11K	B11	3.736	3.736	477.011
11C	D2	0.029	0.029	0.834
12K	H10	0.264	0.264	31.034
12C	E2	0.011	0.011	(-)
13K	C7	5.202	5.202	664.078
13C	F2	0.013	0.013	(-)
14K	D7	0.371	0.371	44.709
14C	G2	0.013	0.013	(-)
15K	E7	0.420	0.420	50.976
15B	H2	0.060	0.060	4.823
16B	F7	0.016	0.016	(-)
16K	C11	4.614	4.614	589.103
16C	A3	0.009	0.009	(-)
17B	G7	0.069	0.069	5.963
17C	D11	0.018	0.018	(-)
17K	B3	1.278	1.278	149.350
18K	H7	1.064	1.064	124.321
18B	E11	0.024	0.024	0.265
18C	C3	0.049	0.049	3.398
19B	A8	0.089	0.089	8.527
19K	D3	2.105	2.105	286.720

1K	C1	1.378	1.378	161.026
20C	F11	0.004	0.004	(-)
20K	E3	2.007	2.007	256.201
21B	B8	0.062	0.062	5.108
21C	G11	0.018	0.018	(-)
21K	F3	1.378	1.378	161.026
22C	H11	0.011	0.011	(-)
22K	G3	1.092	1.092	127.660
23C	A12	0.002	0.002	(-)
23K	H3	1.147	1.147	134.008
24K	A4	1.241	1.241	145.012
25C	B12	0.022	0.022	(-)
25K	B4	1.019	1.019	119.087
26C	C12	0.024	0.024	0.265
26K	C4	2.367	2.367	302.201
27B	C8	0.104	0.104	10.521
27C	D12	0.013	0.013	(-)
27K	D4	1.043	1.043	121.87
28B	D8	0.047	0.047	3.114
28C	E12	0.016	0.016	(-)
28K	E4	4.278	4.278	546,230

29C	F12	0.022	0.022	(-)
29K	F4	0.853	0.853	106.532
2B	B6	0.058	0.058	4.538
2C	H9	0.011	0.011	(-)
2K	D1	3.092	3.092	394.719
30B	E8	0.038	0.038	1.974
30C	G12	0.012	0.012	(-)
30K	G4	3.659	3.659	467.175
31K	H4	4.013	4.013	512.431
32B	F8	0.104	0.104	10.521
32K	A5	4.172	4.172	532.701
33B	G8	0.060	0.060	4.823
33K	B5	1.405	1.405	164.173
34B	H8	0.071	0.071	6.247
34K	C5	0.993	0.993	116.058
35B	A9	0.087	0.087	8.242
35K	D5	0.820	0.820	102.258
36K	E5	2.377	2.377	303.451
37K	F5	2.348	2.348	299.867
38K	G5	2.436	2.436	311.098
39B	B9	0.107	0.107	10.806

39K	H5	2.746	2.746	350.651
3B	C6	0.102	0.102	10.236
3C	A10	0.016	0.016	(-)
3K	E1	3.177	3.177	405.673
40K	A6	2.875	2.875	367.024
42B	C9	0.022	0.022	2.308
43B	D9	0.067	0.067	5.678
44B	E9	0.053	0.053	3.968
46B	F9	0.087	0.087	8.242
49B	G9	0.071	0.071	6.247
4B	D6	0.049	0.049	3.398
4C	B10	0.002	0.002	(-)
4K	F1	2.546	2.546	325.143
5B	E6	0.053	0.053	3.968
5C	C10	0.004	0.004	(-)
5K	G1	2.335	2.335	298,175
6B	F6	0.073	0.073	6.532
6C	D10	0.008	0.008	(-)
6K	H1	2.009	2.009	256,478
7B	G6	0.049	0.049	3.398
7C	E10	0.018	0.018	(-)

7K	A2	2.601	2.601	332,078
8B	H6	0.067	0.067	5.678
8C	F10	0.006	0.006	( - )
8K	B2	1.661	1.661	212,102
9B	A7	0.078	0.078	7.102
9K		1.969	1.969	230.114
POL EPCA	B1 H12	0.241 0.483	0.368	42.338