

BIỂU HIỆN KHÁNG THỂ SCFV KHÁNG CD20

PHẠM THU THÙY, TRẦN MINH ĐẠO - Bệnh viện 19.8,
LÊ QUANG HUẤN - Viện Công Nghệ Sinh Học, VAST

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu tạo ra lượng lớn kháng thể scFv kháng CD20 tinh sạch, có hoạt tính và có thể sử dụng cho các nghiên cứu sâu hơn như chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư máu có xuất hiện chỉ thị phân tử CD20. **Phương pháp nghiên cứu:** Gen mã hóa kháng thể kháng CD20 được biểu hiện trong tế bào *E.coli* (BL21). Protein tái tổ hợp đã biểu hiện được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA (Invitrogen) theo hướng dẫn của hãng sản xuất và được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide theo phương pháp của Laemmli (1970). Hoạt tính của kháng thể scFv kháng CD20 được xác định bằng kỹ thuật Western blot. **Kết quả:** Kháng thể scFv kháng CD20 biểu hiện thành công ở *E. coli* BL21 và tinh sạch được trên cột sắc ký ái lực Ni-NTA. Xác định được hoạt tính liên kết của kháng thể scFv kháng CD20 với kháng thể cộng hợp đầu 6xHis chuẩn.

Từ khóa: CD20, kháng thể kháng CD20, western blot, imidazol.

SUMMARY

EXPRESSION OF ANTI-CD20 scFv ANTIBODY

Objective: To produce a large number of pure and active scFv antibodies specific to CD20 which can be used for further studies such as diagnosis and treatment of blood cancer based on CD20 marker.

Methods: The gene coding for anti-CD20 antibody

was expressed in *E.coli* (BL21). Expressed recombinant protein was purified by affinity chromatography using Ni-NTA column (Invitrogen) following the manufacturer's instruction and checked by polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli 1970) [4]. The activation of scFv antibody was determined by Western blot. **Results:** anti-CD20 scFv antibody was successfully expressed and purified by affinity chromatography. Determine the active alignment of the anti-CD20 scFv antibody with antibody conjugate 6 His tag standard.

Keywords: CD20, anti-CD20 antibody, western blot.

ĐẶT VẤN ĐỀ

U lympho không Hodgkin (NHL) là ung thư phổ biến thứ 7 ở nước Mỹ và các nước khác trên thế giới [1]. CD20 là chỉ thị phân tử biểu hiện chủ yếu trên tế bào B và xuất hiện khoảng 85 – 90% ở bệnh nhân NHL [5], [2], [6]. CD20 là phân tử đích tiềm năng trong liệu pháp điều trị ung thư bằng kháng thể đơn dòng. Trên thế giới đã có một số kháng thể đơn dòng kháng CD20 được cục quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê chuẩn dùng trong điều trị ung thư máu có xuất hiện chỉ thị CD20 và các bệnh tự miễn [6]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về chỉ thị phân tử CD20 vẫn còn rất ít ở Việt Nam.

Do đó, việc biểu hiện, tinh sạch kháng thể scFv

kháng CD20 và xác định hoạt tính đặc hiệu của kháng thể này với kháng thể cộng hợp Ni-NTA có gắn đuôi 6xHis bằng kỹ thuật Western blot đã được đặt ra làm nhiệm vụ của nghiên cứu này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Plasmid tái tổ hợp pET-22b(+) gắn gen mã hóa kháng thể scFv kháng CD20 (plasmid tái tổ hợp pET-22b(+)/*antiCD20*) đã được biến nạp vào chủng biểu hiện *E.coli* BL21(DE3) do chúng tôi thiết kế.

Các hóa chất: LB lỏng, LB đặc, IPTG, Polyacrylamide; Glycerol; Comassie Blue; APS; SDS,...(hãng sigma). Các hạt Ni²⁺, các đệm sodium phosphate.

Phương pháp

Biểu hiện gen mã hóa kháng thể scFv kháng CD20

Một khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng chứa kháng sinh Ampicillin, nuôi lactic 200 v/p, 37°C, qua đêm. Cây chuyển sang môi trường LB lỏng chứa kháng sinh với tỷ lệ chủng là 2%. Nuôi lactic 200 v/p, 37°C đến khi OD₆₀₀ đạt nồng độ thích hợp. Thu mẫu trước cảm ứng, sau đó bổ sung vào dịch nuôi cấy chất cảm ứng IPTG với nồng độ thích hợp và tiếp tục nuôi lactic. Thu mẫu sau cảm ứng và điện di kiểm tra kết quả biểu hiện.

Điện di protein trên gel polyacrylamide: Protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide theo phương pháp của Laemmli (1970) [4].

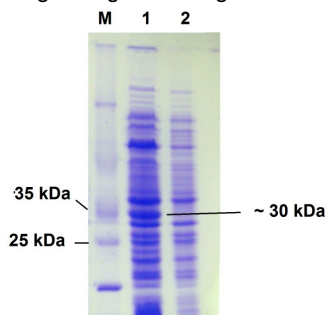
Tinh sạch protein tái tổ hợp: Cột sắc kí ái lực Ni-NTA (Invitrogen) được dùng để tinh sạch protein tái tổ hợp có chứa đuôi 6-histidine. Quy trình tinh sạch được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kỹ thuật Western blot: Kháng thể scFv kháng CD20 có chứa đuôi 6xHis đã tinh sạch được xác định hoạt tính dựa trên liên kết đặc hiệu của chúng với kháng thể cộng hợp.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Biểu hiện kháng thể scFv kháng CD20

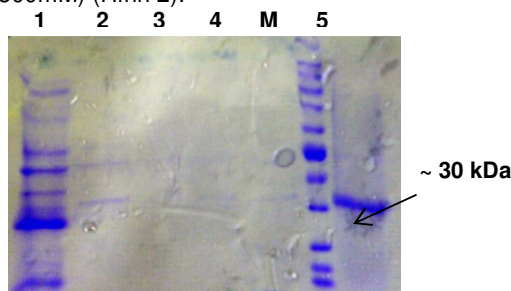
Gen mã hóa kháng thể scFv kháng CD20 được biểu hiện ở *E.coli* BL21 (DE3) theo phương pháp như mô tả ở trên. Kháng thể scFv (protein tái tổ hợp) được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide. Khi so sánh các mẫu trước và sau cảm ứng với IPTG, chúng tôi nhận thấy ở mẫu sau cảm ứng xuất hiện 1 băng protein mới, khác biệt, có trọng lượng phân tử ~30 kDa (Hình 1). Protein này có kích thước tương ứng với kháng thể scFv kháng CD20 theo tính toán lý thuyết. Như vậy, chúng tôi có thể khẳng định sơ bộ đã biểu hiện thành công kháng thể kháng CD20.



Hình 1: Biểu hiện gen mã hóa kháng thể scFv kháng CD20 M: thang protein chuẩn, 2: protein trước cảm ứng IPTG; 1: protein sau cảm ứng IPTG

Tinh sạch kháng thể tái tổ hợp kháng CD20

Đuôi 6xHistag là một trong các đuôi phổ biến nhất, tạo điều kiện thuận lợi cho việc thăm dò và tinh sạch protein tái tổ hợp. Trong quá trình tinh sạch trên cột Ni²⁺ các protein không có đuôi His vẫn có thể được gắn lên cột, do đó khi thu protein có thể lẫn protein đích với các protein không cần thiết. Thông thường, các protein tạp có ái lực liên kết yếu hơn protein tái tổ hợp đích. Có một số cách để loại trừ protein tạp, thứ nhất có thể tính toán lượng hạt Ni²⁺ vừa đủ để gắn với lượng protein đích, thứ hai imidazole có thể sử dụng như một tác nhân cạnh tranh [3]. Ở nghiên cứu này, để loại bỏ những protein không quan tâm và thu được lượng protein tinh sạch cao nhất chúng tôi đã sử dụng các nồng độ imidazole khác nhau (50mM, 100mM, 250mM, 350mM, 500mM) (Hình 2).



Hình 2. Kết quả tinh sạch kháng thể scFv kháng CD20 ở các nồng độ imidazol khác nhau

M: Maker protein

1-5: 50 mM, 100 mM, 250 mM, 350 mM và 500 mM imidazole theo thứ tự

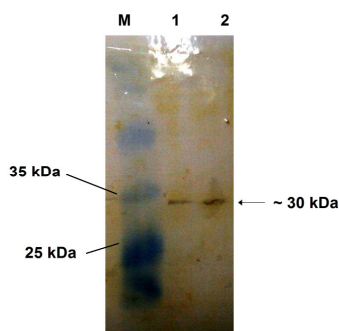
Kết quả điện di trên hình 2 cho thấy, kháng thể tái tổ hợp không thu được khi tinh sạch ở các nồng độ imidazol thấp hơn 500 mM. Tất cả các protein không đặc hiệu được rửa trôi khỏi cột với các nồng độ imidazol tăng dần từ 50 mM đến 300 mM. Vì vậy, nồng độ imidazol 500 mM đã được lựa chọn để thu kháng thể scFv kháng CD20.

Xác định hoạt tính của kháng thể scFv kháng CD20

Western blot là kỹ thuật miễn dịch được sử dụng rộng rãi để thăm dò các protein đặc hiệu. Kỹ thuật này sử dụng điện di để tách các protein bởi chiều dài chuỗi polypeptit hay bởi cấu trúc 3-D của protein. Các protein này thường được chuyển lên màng (nitrocellulose hoặc PVDF), tại đó chúng được phát hiện bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu với protein đích [7].

Trong y học, Western blot được ứng dụng để thăm dò kháng thể kháng HIV, HBV.... Ở nghiên cứu này, Western blot được sử dụng để kiểm tra tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp sản xuất được với kháng thể cộng hợp gắn đặc hiệu với đuôi 6xHistag

của protein đích. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Hình ảnh Western blot của kháng thể scFv kháng CD20

M: thang protein chuẩn;

1-2: kháng thể scFv kháng CD20

Kết quả trên hình 3 xuất hiện băng kích thước xấp xỉ 30 kDa, điều này chứng tỏ protein tái tổ hợp sản xuất được phản ứng đặc hiệu với kháng thể cộng hợp đuôi Histag (Ni-NTA conjugate).

KẾT LUẬN

Kháng thể scFv kháng CD20 biểu hiện thành công ở *E. coli* BL21. Kháng thể scFv tinh sạch được trên cột sắc kí ái lực với Ni^{2+} ở nồng độ imidazol 500 mM. Kháng thể scFv kháng CD20 có hoạt tính và hoạt tính của các protein này đã được xác định bằng

kĩ thuật Western blot với kháng thể cộng hợp kháng đuôi 6-His.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fang H., Miao Q.F., Zhang S.H., Cheng X., Xiong D.S., and Zhen Y.S. (2011), "Antitumor effects of an engineered and energized fusion protein consisting of an anti-CD20 scFv fragment and lidamycin", *Science China, Life Sciences*, 54(3), pp. 255–262.

2. Fisher R.I. (2003), "Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment", *Seminars in Oncology*, 30(2-4), pp. 3-9.

3. Hölscher K., Richter-Roth M. and Felden de Neumann B., (2006), "Addition of imidazole during binding improves purity of histidine-tagged proteins". *GE Healthcare*, 28-4067-41 AA.

4. Laemmli U. K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 227, pp. 680-685.

5. Li B., Shi S., Qian W., Zhao L., Zhang D., Hou S., Zheng L., Dai J., Zhao J., Wang H., Guo Y. (2008), "Development of novel tetravalent anti-CD20 antibodies with potent antitumor activity", *Cancer research*, 68(7), pp. 2400-2408.

6. Lim S.H., Beers S.A., French R.R., Johnson P.W., Glennie M.J., Cragg M.S. (2010), "Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives", *Haematologica*, 95(1), pp. 135-143.

7. Western Blot
<http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/>