

đến 75,56%.

- Mức độ khéo léo bàn tay liệt gia tăng sau thời gian điều trị 3 tháng, với mức độ khéo léo 4,5,6 là mức độ khéo léo nhất chiếm 56,66% (trước điều trị 2,22%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Phạm Ngọc Anh (2005)**, "Bước đầu đánh giá hiệu quả hoạt động trị liệu trong PHCN chi trên ở bệnh nhân liệt nửa người do nhồi máu não". Luận văn chuyên khoa cấp II, Trường Đại học Y Hà Nội, tr 57.
2. **Nguyễn Thị Kim Liên (2011)**, Nghiên cứu phục hồi chức năng bàn tay trên bệnh nhân liệt nửa người do tai biến mạch máu não. Luận văn tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội, tr. 90 – 95.
3. **Nguyễn Thị Kim Liên, Trần Việt Hà (2015)**, "Hiệu quả phục hồi chức năng chi trên ở bệnh nhân liệt nửa người do nhồi máu não bằng chương trình GRASP", tạp chí Y dược học quân sự số 1, tr 85 – 90.
4. **Vũ Thị Kim Thanh (2012)**, "Đánh giá hiệu quả phục hồi chức năng vận động chi trên ở bệnh nhân tai biến nhồi máu vùng trên lều", Luận văn thạc sĩ y học, Đại học Y Hà Nội, tr 55.
5. **Cao Thành Vân, Trinh Trung Phong (2011)**, "Nghiên cứu đặc điểm của một số yếu tố nguy cơ thường gặp ở bệnh nhân tai biến mạch máu não tại bệnh viện Đa khoa Quảng Nam năm 2011", tạp chí y học Việt Nam số 23 tr 112 – 115.
6. **Broeks J. G, Rumping K, et al. (2004)**, "The long-term outcome of arm function after stroke: results of a follow-up study", Disability and Rehabilitation, (21), pp 357-364.
7. **Harris J.E (2009)**, "A self - administered graded repetitive arm supplementary program improves arm function during inpatient stroke rehabilitation: a multi - site randomized controlled trial", Stroke, 40, pp. 2123 - 2128.
8. **Whyte J (1993)**, "Neurologic disorders of attention and arousal: assessment and treatment", Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, Vol 73, 1094-1103.

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH NHÂN TỐ PHIÊN MÃ NF- κB P65 CỦA NGƯỜI SỬ DỤNG TẾ BÀO VẬT CHỦ E. coli ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG SÀNG LỌC CHẤT ỨC CHẾ UNG THƯ

Đỗ Thị Thanh Huyền^{1,2}, Phạm Thị Quyên³,
Nguyễn Thị Hồng Vân², Nguyễn Quang Huy²

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Nhân tố NF-κB p65 tham gia điều hòa biểu hiện hàng loạt gen miễn dịch của tế bào của người. Sự biểu hiện quá mức của NF-κB p65 có liên quan đến nhiều bệnh ung thư. Việc tìm các chất ức chế đặc hiệu NF-κB p65 là hướng đi có nhiều hứa hẹn trong điều trị các loại ung thư liên quan đến con đường tín hiệu NF-κB. Để sàng lọc in vitro các chất ức chế đặc hiệu NF-κB p65 thì việc biểu hiện lượng lớn nhân tố phiên mã này là hết sức cần thiết. **Mục tiêu:** tối ưu domain liên kết DNA của gen mã hóa NF-κB p65 của người, nhân dòng và biểu hiện trong E. coli định hướng ứng dụng sàng lọc chất ức chế ung thư. **Phương pháp:** đoạn gen mã hóa domain liên kết với ADN đích của nhân tố phiên mã NF-κB p65 của người được tối ưu mã bộ ba, nhân dòng và biểu hiện trong vi khuẩn E. coli BL21(DE3) sau đó tinh sạch bằng sắc ký ái lực sử dụng hạt niken. **Kết quả:** gen mã hóa

domain liên kết ADN của nhân tố phiên mã NF-κB p65 ở người được tối ưu mã bộ ba thành công. Kết quả biểu hiện ở E. coli cho thấy NF-κB p65 được biểu hiện thành công ở nhiệt độ 20°C và 37°C với nồng độ chất cảm ứng IPTG là 100 μM. Mức độ biểu hiện cao với 50 mg protein tái tổ hợp thu được từ một lít dung dịch LB nuôi cấy. NF-κB p65 tái tổ hợp được tinh sạch với độ tinh sạch cao sử dụng phương pháp sắc ký ái lực với cột niken. Có thể sản xuất lượng lớn NF-κB p65 tái tổ hợp để sử dụng cho sàng lọc và thử nghiệm các chất ức chế ung thư nhằm mục đích điều trị các bệnh ung thư liên quan đến rối loạn biểu hiện NF-κB p65. **Kết luận:** Gen mã hóa nhân tố phiên mã NF-κB p65 được nhân dòng và biểu hiện thành công trong vi khuẩn E. coli BL21(DE3). Mức độ biểu hiện NF-κB p65 tái tổ hợp khá cao có thể ứng dụng trong nghiên cứu và sàng lọc các loại chất ức chế các bệnh ung thư liên quan.

Từ khóa: nhân tố phiên mã, NF-κB, p65, biểu hiện gen, protein tái tổ hợp, sắc ký ái lực với niken.

SUMMARY

OVEREXPRESSION AND PURIFICATION OF HUMAN NF-κB P65 TRANSCRIPTION FACTOR USING E. coli HOST CELL FOR CANCER INHIBITOR SCREENING PURPOSES

Background: NF-κB p65 transcription factor is present in almost all human cell types and plays important role in regulating human immune system. Up-regulation of NF-κB p65 is associated with a number of human cancer types. In order to screen

¹Trường THPT Chuyên Khoa học Tự nhiên, HUS-VNU,

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội.

³Trung tâm Khoa học Sự Sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội.

Chịu trách nhiệm chính: Đỗ Thị Thanh Huyền

Email: huyencsinh@gmail.com

Ngày nhận bài: 19.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 23.11.2020

Ngày duyệt bài: 7.12.2020

inhibitors of NF- κ B p65 using in vitro approach, it is required to produce large amount of recombinant NF- κ B p65 with high purity. **Objectives:** 1. To design expression construct that can express human NF- κ B p65 in E.coli host cells, 2. To purify recombinant NF- κ B p65 with high purity. **Materials and methods:** Codon optimization and DNA cloning methods were used to design expression vector containing gene encoding NF- κ B p65 transcription factor. The recombinant protein was expressed in E. coli BL21(DE3) and then purified using nickel affinity chromatography. **Results:** The DNA fragment encoding human DNA binding domain (Rel homology domain) of NF- κ B p65 transcription factor was successfully codon-optimized and inserted in to pET-28a expression vector to generate pET-28a/ NF- κ B p65 construct. The pET-28a/ NF- κ B p65 was then transformed in to BL21(DE3) E. coli competent cells using heat-shock method. The expression of recombinant NF- κ B p65 protein in E. coli BL21(DE3) strain was successfully induced at both 20°C and 37°C with 100 μ M IPTG. The expression level of recombinant NF- κ B p65 was very high as 50 mg the recombinant protein was obtained per liter of LB culture. Recombinant NF- κ B p65 was purified using nickel bead column with high purity. **Conclusion:** We have successfully expressed and purified recombinant NF- κ B p65 with high yield of 50 mg/L. The obtained NF- κ B p65 with high purity can be used for screening of potential drug for NF- κ B p65-related cancer diseases.

Key words: transcription factor, NF- κ B, p65, gene expression, recombinant protein, NF- κ B, affinity chromatography.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhân tố phiên mã NF- κ B có tên gọi đầy đủ là Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells và được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1986 bởi hai nhà khoa học là Sen và Baltimore[1]. NF- κ B có mặt trong hầu hết các tế bào và đóng vai trò quan trọng trong điều khiển hệ thống miễn dịch của cơ thể người[2]. NF- κ B tham gia điều khiển hàng loạt gen khác nhau liên quan tới đáp ứng với nhiều yếu tố kích thích đa dạng của môi trường như stress, cytokines, các gốc tự do, các phóng xạ, các kháng nguyên của vi khuẩn hoặc virus. Sự biểu hiện quá mức của nhân tố phiên mã NF- κ B có liên quan tới hàng loạt các bệnh ở người đặc biệt là các loại ung thư khác nhau chẳng hạn như ung thư vú[3], ung thư buồng trứng[4], ung thư tụy[5], ung thư tuyến tiền liệt[6]. Ở người có 5 loại nhân tố phiên mã thuộc nhóm NF- κ B là NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (NF- κ B p65), RelB và c-Rel. Trong 5 nhân tố phiên mã này, NF- κ B p65 là nhân tố quan trọng nhất và có mặt ở hầu hết các các tế bào[7]. Để sàng lọc được các hợp chất, đặc biệt là các hợp chất thiên nhiên từ nguồn dược liệu phong phú ở Việt Nam, có khả

năng ức chế NF- κ B p65 thì cần phải biểu hiện và tinh sạch được lượng lớn nhân tố phiên mã NF- κ B p65. Với thực tế trên, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu.

Mục tiêu: *tối ưu domain liên kết DNA của gen mã hóa NF- κ B p65 của người, nhân dòng và biểu hiện trong E. coli định hướng ứng dụng sàng lọc chất ức chế ung thư.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Trong nghiên cứu này, đoạn gen mã hóa domain liên kết với ADN đích của nhân tố phiên mã NF- κ B p65 (sau đây gọi tắt là NF- κ B p65) của người được tối ưu mã bộ ba, nhân dòng và biểu hiện trong tế bào vi khuẩn E. coli BL21(DE3), sau đó tinh sạch bằng sắc ký ái lực sử dụng hạt niken.

2.1. Đối tượng. Các trình tự gen mã hóa NF- κ B p65 của người được lấy từ ngân hàng dữ liệu hệ gen (Genbank mã số truy cập: AAI10831.1; AAA36408.1; AAH33522.1; AAA20946) của Mỹ và được so sánh và chọn trình tự protein NF- κ B p65 có tính đại diện cao nhất cho protein NF- κ B p65 của người. NF- κ B p65 có chứa domain liên kết DNA đóng vai trò quan trọng nhất cho hoạt hóa các gen đích. Trình tự axit amin mã hóa cho domain liên kết DNA (từ axit amin thứ 17 đến axit amin thứ 291) của NF- κ B p65 từ ngân hàng gen (Genbank, Mỹ) sau đó được tối ưu mã bộ ba bằng phần mềm tối ưu và sau đó được tổng hợp hóa học bởi Genscript (Mỹ). Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi các hãng hóa chất uy tín như Sigma (IPTG, LB), Fermentas (enzyme giới hạn BamHI và EcoRI), Qiagen (kit tinh sạch plasmid/ADN), Merck-Millipore (hệ thống màng lọc protein), Thermo Fisher (cột sắc ký ái lực niken).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Nhân bội đoạn gen mã hóa nhân tố phiên mã NF- κ B p65. Dựa trên trình tự tối ưu mã bộ ba, chúng tôi thiết kế cặp mồi đặc hiệu nhằm nhân dòng gen mã hóa NF- κ B p65 được tổng hợp hóa học bởi Genscript. Cặp mồi thiết kế được thể hiện ở bảng 2.1. Mồi xuôi NF- κ B p65-F có gắn vị trí cắt của enzyme giới hạn BamHI (bảng 2.1 phần in đậm và gạch chân) và mồi ngược NF- κ B p65-R có chứa vị trí cắt của enzyme giới hạn EcoRI (bảng 2.1 phần in đậm và gạch chân).

Bảng 2.1. Kết quả thiết kế cặp mồi nhân gen NF- κ B p65 tối ưu mã bộ ba

| Tên mồi | Trình tự |
|----------------------|--|
| NF- κ B p65-F | 5' CGGGATCC GGTCCGTACGTT GAAATCATCGAACAGCCG 3' |

| | |
|-------------|--|
| NF-κB p65-R | 5'CGGAATTCGTCGGCAGGTA CTGGAATTCATCGG 3' |
|-------------|--|

Phản ứng PCR nhân dòng gen NF-κB p65 sử dụng 100 μl hỗn hợp phản ứng PCR chứa 10 μl dung dịch 10 x KOD Hot Start buffer, 6 μl MgSO₄ (25mM), 10μl dNTP (2 mM mỗi loại), 0,2 μl DNA khuôn (10nM), 6μl mỗi xuôi và ngược (10μM), 1μl KOD Hot Start polymerase (Merck-Millipore) và 56 μl ddH₂O. Chu trình nhiệt PCR được thực hiện với 1 phút biến tính ở 95°C, 20 giây gắn mồi ở 52°C và 2 phút kéo dài chuỗi ở 68°C. Kết quả PCR được điện di trên gel agarose 0,8%. Đoạn ADN mã hóa cho NF-κB p65 có kích thước khoảng 840 bp sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit Gel Extraction Kit của QIAGEN (Đức).

2.2.2. Chèn đoạn gen NF-κB p65 vào vectơ biểu hiện pET-28a. Khoảng 2 μl plasmid của pET-28a (150 ng/μl) được cho vào một ống eppendorf 1,5 ml. Sau đó plasmid được cắt bằng enzyme giới hạn với thể tích, nồng độ và thành phần tương ứng là 1 μl (10U) BamHI FastDigest™, 1 μl(15U) EcoRI FastDigest™, 2 μl 10x đệm FastDigest™ và H₂O được thêm vào để đạt tổng thể tích là 20 μl. Khoảng 6 μl ADN tinh sạch được từ sản phẩm PCR với nồng độ khoảng 100 ng/μl được cho vào một ống ependorf 1,5 ml và cắt bằng hai loại enzyme giới hạn BamHI và EcoRI với các thành phần, thể tích và nồng độ là 1 μl (10 U) BamHI FastDigest™, 1,5μl (10U) EcoRI FastDigest™ (Fermentas), 4 μl đệm 10x đệm Fast Digest™ và H₂O được thêm vào để đạt tổng thể tích là 40 μl. Các phản ứng cắt enzyme giới hạn đều được tiến hành ở 37°C trong 1 giờ và được trộn với nhau trước khi được tinh sạch bằng Gel Extraction Kit của QIAGEN. Hỗn hợp gen NF-κB p65 và plasmid được nối với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase và được biến nạp vào tế bào E. coli DH5a trước khi được cấy trên đĩa môi trường LB (Luria-Bertani) đặc.

2.2.3. Xác định trình tự gen NF-κB p65 trong vector pET-28a. Mỗi khuẩn lạc của tế bào DH5a thu nhận sau biến nạp được cấy riêng vào từng ống nghiệm chứa 5ml LB lỏng ở 37°C trong 16 giờ. Các mẫu tế bào DH5a từ mỗi ống nghiệm được thu lại và được sử dụng để tách plasmid bằng bộ kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher). Sản phẩm plasmid được dùng làm khuôn để giải trình tự gen NF-κB p65 theo phương pháp Sanger nhằm xác định trình tự đoạn gen được chèn vào vị trí đích trên plasmid pET-28a.

2.2.4. Biểu hiện NF-κB p65 tái tổ hợp trong tế bào E. coli BL21(DE3). Plasmid pET-28a chứa gen mã hóa NF-κB p65 được biến nạp

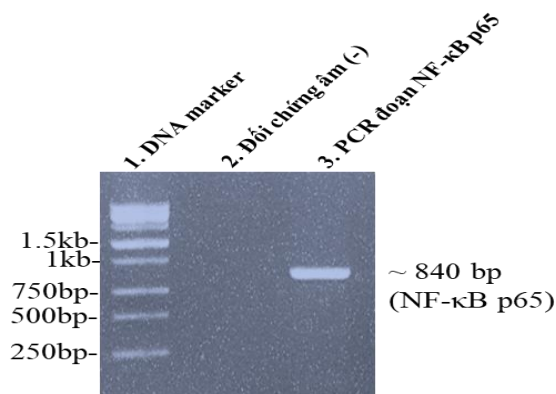
vào tế bào khả biến E. coli BL21(DE3) bằng sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây. Một khuẩn lạc từ đĩa thạch được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 37°C cho đến khi mật độ tế bào ở OD₆₀₀ đạt 0.6 thì thêm IPTG với nồng độ cuối cùng đạt 100 μM vào môi trường để cảm ứng biểu hiện protein tái tổ hợp NF-κB p65. Để xác định nhiệt độ biểu hiện tối ưu, sau khi thêm IPTG vào môi trường nuôi cấy, các bình nuôi cấy được nuôi ở một trong hai điều kiện nhiệt độ là 20°C và 37°C. Kết quả biểu hiện được đánh giá bằng phương pháp điện di protein biến tính SDS-PAGE.

2.2.5. Tinh sạch NF-κB p65 tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực với cột niken. Sau 16 tiếng cảm ứng biểu hiện NF-κB p65 ở nhiệt độ cảm ứng 20°C hoặc 37°C, các tế bào từ hai dịch nuôi được thu lại bằng ly tâm lạnh ở tốc độ 10 000 x g. Phần dịch nổi được loại bỏ và phần cặn tế bào được hòa vào đệm Binding có chứa các thành phần 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 500 mM NaCl, và 5 mM imidazole. Tế bào sau đó được phá vỡ bằng siêu âm ở nhiệt độ 4°C để giải phóng các protein NF-κB p65 tái tổ hợp. Dịch phá vỡ tế bào sau đó được ly tâm để loại cặn và xác tế bào ở tốc độ 12 000 x g trong 60 phút. Dịch nổi được thu vào một ống falcon 50 ml và sau đó được lọc qua màng lọc với kích thước lỗ 0,22 μm (Minisart®, Sartorius) trước khi chuyển lên cột sắc ký ái lực niken đã được ủ sẵn với dung dịch đệm Binding. Cột niken được rửa 3 lần với dung dịch Binding và 15 lần với dung dịch Washing (20 mM Tris-Cl pH 8,0, 500 mM NaCl, và 30 mM imidazole). Mỗi lần rửa sử dụng 30 ml dung dịch đệm. Nhân tố phiên mã NF-κB p65 tái tổ hợp gắn với cột niken sau đó sẽ được tách khỏi cột bằng dung dịch Elution (20 mM Tris-Cl pH 8,0, 500 mM NaCl, và 250 mM imidazole) và được thẩm tách sử dụng màng thẩm tách của Spectrum có kích thước lỗ giới hạn 6-8 kDa. Độ tinh sạch của protein NF-κB p65 được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE. Hàm lượng protein tinh sạch được đánh giá bằng phương pháp định lượng Bradford.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nhân bội đoạn DNA mã hóa NF-κB p65. Đoạn ADN mã hóa nhân tố phiên mã NF-κB p65 được tối ưu mã bộ ba và được tổng hợp hóa học bởi Genscript (USA). Đoạn gen sau đó được nhân bội bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi NF-κB p65-F, NF-κB p65-R có chứa vị trí cắt của enzyme giới hạn BamHI và EcoRI. Kết quả PCR được thể hiện ở Hình 3.1. Ở đường chạy 3

(PCR đoạn NF-κB p65) xuất hiện một băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 840 bp. Kích thước này tương ứng với kích thước của đoạn gen mã hóa NF-κB p65 cần nhân dòng. Kết quả PCR đối chứng âm (phản ứng PCR nhưng cho DNA khuôn) ở đường chạy số 2 cho kết quả âm tính thể hiện phản ứng PCR rất đặc hiệu. Kết quả này chỉ ra rằng, gen mã hóa cho NF-κB p65 đã được nhân dòng thành công bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu NF-κB p65-F, NF-κB p65-R.



Hình 3.1. Kết quả PCR đoạn gen mã hóa nhân tổ phiên mã NF-κB p65

1. DNA marker là thang ADN chuẩn; 2. Mẫu đối chứng âm không có ADN khuôn thể hiện phản ứng PCR đặc hiệu. 3. PCR đoạn NF-κB p65 cho kết quả sản phẩm nhân đặc hiệu đoạn gen NF-κB p65 (~840 bp).

3.2 Chèn đoạn gen NF-κB p65 vào vectơ pET-28a. Quá trình nhân dòng và chuyển gen NF-κB p65 vào vectơ pET-28a có thể xảy ra đột biến không mong muốn. Để kiểm tra việc chèn chính xác gen NF-κB p65 trong vectơ pET-28a mà không có đột biến điểm hay đột biến dịch khung xảy ra, gen NF-κB p65 từ vectơ pET-28a được giải trình tự bởi công ty 1st Base (Singapore). Trình tự ADN của NF-κB p65 tái tổ hợp sau đó được dịch mã thành trình tự axit amin sử dụng công cụ SnapGene và được dùng để so sánh với trình tự axit amin của gen NF-κB p65 của người trên ngân hàng gen của Mỹ. Kết quả so sánh trình tự axit amin của NF-κB p65 sử dụng công cụ tin sinh CLUSTALW[8] được trình bày ở hình 3.2. Kết quả so sánh trình tự cho thấy trình tự axit amin của gen NF-κB p65 tái tổ hợp được chèn vào vectơ biểu hiện pET-28a giống hệt trình tự axit amin của gen mã hóa nhân tổ phiên mã NF-κB p65 trên ngân hàng gen của Mỹ (hình 3.2). Kết quả này khẳng định rằng gen mã hóa NF-κB p65 của người đã được chèn thành công vào vectơ biểu hiện pET-28a.

| | |
|------------------|---|
| NF-κB_p65-pET28a | HHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRSGFYVEIIEQPKQGMRFYKCEGRSAGSIP |
| NF-κB_p65-Human | -----GPIVVEIIEQPKQGMRFYKCEGRSAGSIP ***** |
| NF-κB_p65-pET28a | GERSTDTTKTHTPTIKINGYTGPGTVRIISLVTKDPPHRPHPELVGKDCRDGFYEALCPD |
| NF-κB_p65-Human | GERSTDTTKTHTPTIKINGYTGPGTVRIISLVTKDPPHRPHPELVGKDCRDGFYEALCPD ***** |
| NF-κB_p65-pET28a | RCIHSFQNLGIQCVKKRDLEQAISQRIQTNNPFQVPIEEQRGDYDLNAVRLCFQVTVRD |
| NF-κB_p65-Human | RCIHSFQNLGIQCVKKRDLEQAISQRIQTNNPFQVPIEEQRGDYDLNAVRLCFQVTVRD ***** |
| NF-κB_p65-pET28a | PSGRFLRLPVLSPHPIFDNRAPTAELKICRVNRNSGSLGGDEIFLLCDKVKQKEDIYV |
| NF-κB_p65-Human | PSGRFLRLPVLSPHPIFDNRAPTAELKICRVNRNSGSLGGDEIFLLCDKVKQKEDIYV ***** |
| NF-κB_p65-pET28a | FTGPGWEARGSFQADVHRQVAIVFRTPPYADPSLQAPVVRSMQLRPSDRELSEPMFQ |
| NF-κB_p65-Human | FTGPGWEARGSFQADVHRQVAIVFRTPPYADPSLQAPVVRSMQLRPSDRELSEPMFQ ***** |
| NF-κB_p65-pET28a | YLFD |
| NF-κB_p65-Human | YLFD **** |

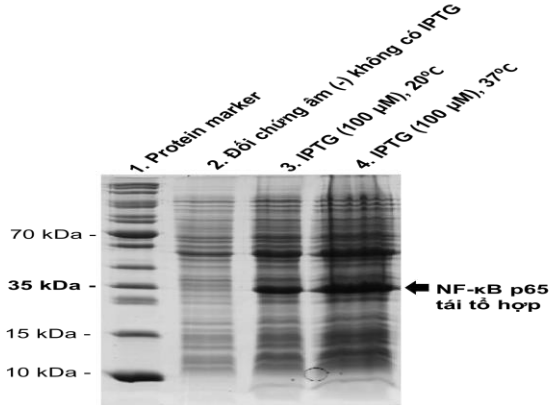
Hình 3.2. So sánh trình tự axit amin của NF-κB p65 tái tổ hợp với trình tự axit amin gốc của người.

Dấu * thể hiện sự giống nhau ở vị trí axit amin so sánh; dấu – thể hiện không có axit amin tương ứng ở trình tự so sánh. Trình tự axit amin của gen NF-κB p65 tái tổ hợp hoàn toàn giống với trình tự axit amin của nhân tổ phiên mã NF-κB p65 gốc ban đầu. Trình tự 30 axit amin phần đầu N của NF-κB p65 trên vectơ pET28a là trình tự đuôi His được thiết kế để giúp tinh sách protein tái tổ hợp.

3.3. Biểu hiện NF-κB p65 tái tổ hợp ở vi khuẩn E. coli BL21(DE3)

Vectơ biểu hiện pET-28a chứa gen mã hóa NF-κB p65 được biến nạp tế bào E.coli BL21(DE3) sử dụng phương pháp sốc nhiệt và được biểu hiện ở hai điều kiện nhiệt độ 20°C và 37°C sử dụng chất cảm ứng IPTG (100 μM). Mức độ biểu hiện NF-κB p65 được đánh giá thông qua kết quả điện di SDS-PAGE ở hình 3.3. Đường chạy số 3 (mẫu biểu hiện ở nhiệt độ 20°C) và 4 (mẫu biểu hiện ở nhiệt độ 37°C) xuất hiện băng rất đậm có kích thước khoảng 35 kDa tương ứng với kích thước của NF-κB p65 tái tổ hợp. Băng này không xuất hiện ở mẫu đối chứng (đường chạy 2) không có chất cảm ứng IPTG. Kết quả này chứng tỏ 35 kDa là băng protein NF-κB p65 tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện bởi IPTG ở cả hai điều kiện biểu hiện là 20°C và 37°C. Băng có kích thước 35 kDa là băng đậm hơn rất nhiều so với các băng protein khác trong mẫu điện di protein tổng số của tế bào chứng tỏ NF-κB p65 tái tổ hợp được tăng cường biểu hiện ở mức cao. Việc biểu hiện các protein có nguồn gốc từ người và động vật bậc cao có thể gặp khó khăn khi biểu hiện ở trong tế bào vi khuẩn E. coli. Kết quả này khẳng định rằng, nhân tổ phiên mã NF-κB p65 tái tổ hợp của người với mã bộ ba được tối

ưu đã cho kết quả biểu hiện rất tốt trong tế bào BL21(DE3). Mức độ biểu hiện thu được sau khi tinh sạch cho thấy hàm lượng protein đạt 50 mg trên một lít môi trường nuôi cấy LB ở nhiệt độ 37°C. Đây là hàm lượng protein thu được ở mức rất cao đối với một protein của người biểu hiện trong tế bào E. coli.

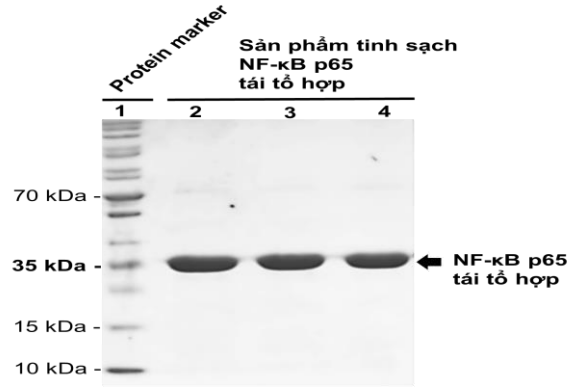


Hình 3.3. Kết quả biểu hiện NF-κB p65 ở tế bào E. coli BL21(DE3).

(1) Protein marker; (2) Mẫu đối chứng âm là tế bào nuôi cấy không bổ sung IPTG; Mẫu ở đường chạy 2 và 3 với nhiệt độ cảm ứng biểu hiện tương ứng là 20°C và 37°C đều cho bằng đặc trưng của nhân tố NF-κB p65 với kích thước 35 kDa.

3.4. Tinh sạch NF-κB p65 tái tổ hợp bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột niken. Nhân tố phiên mã NF-κB p65 tái tổ hợp được thiết kế có mang đuôi 6xHis ở đầu N của chuỗi polipeptit. Do vậy, protein này có thể được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột niken. Kết quả tinh sạch được phân tích trên gel SDS-PAGE 15% và được thể hiện trên hình 3.4. Ở đường chạy thứ 2, thứ 3 và thứ 4 là các phân đoạn thu protein tinh sạch NF-κB p65 ở nồng độ imidazole 250 mM. Kết quả cho thấy cả ba phân đoạn 2, 3 và 4 đều có xuất hiện một băng protein đậm duy nhất có kích thước ứng với kích thước 35 kDa của protein NF-κB p65 tái tổ hợp. Kết quả này chỉ ra rằng protein được tinh sạch chính là protein NF-κB p65. Ngoài băng protein NF-κB p65 (35 kDa), chỉ có một băng rất mờ với kích thước 70 kDa. Ngoài ra không có bất cứ băng phụ đáng kể nào khác xuất hiện trên đường chạy 2, 3 và 4. Điều này chứng tỏ protein NF-κB p65 được tinh sạch với độ tinh khiết rất cao. Sau khi thu được protein tinh sạch, chúng tôi tiến hành đo lượng protein thu được bằng phương pháp Bradford và xác định được hàm lượng protein NF-κB p65 trong một lít môi trường nuôi cấy là khoảng 50 mg. Kết quả này cho thấy có thể

tinh sạch được lượng lớn protein NF-κB p65 cho mục đích sàng lọc các chất ức chế, đặc biệt là các chất ức chế có nguồn gốc thiên nhiên thu được từ nguồn thực vật đa dạng của Việt Nam.



Hình 3.4. Phân tích kết quả tinh sạch protein NF-κB p65 bằng điện di SDS-PAGE.

1. Protein marker là thang protein chuẩn; 2, 3 và 4 là NF-κB p65 tinh sạch thể hiện một băng duy nhất có kích thước khoảng 35 kDa, tương đương với kích thước đoạn protein NF-κB p65 tái tổ hợp.

IV. KẾT LUẬN

Gen mã hóa nhân tố phiên mã NF-κB p65 đã được nhân dòng và biểu hiện thành công trong tế bào vi khuẩn E. coli BL21(DE3). Mức độ biểu hiện NF-κB p65 tái tổ hợp là khá cao do được tối ưu mã bộ ba cho phù hợp với vật chủ là E. coli. Kết quả tinh sạch protein NF-κB p65 bằng sắc ký ái lực với cột niken chỉ ra rằng NF-κB p65 có thể được tinh sạch với độ tinh sạch cao. Sản phẩm NF-κB p65 tái tổ hợp với độ tinh sạch cao có thể được ứng dụng trong nghiên cứu và sàng lọc các loại chất ức chế tiềm năng cho các bệnh ung thư liên quan đến rối loạn NF-κB p65 của người.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi đề án 911 Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sen, R. and D. Baltimore, Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell, 1986. **47**(6): p. 921-8.
2. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, NF-kappa B and the immune response. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6758-80.
3. Sovak, M.A., et al., Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2952-60.
4. Hagemann, T., et al., Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1197-205.
5. Wang, W., et al., Overexpression of urokinase-type

plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma is regulated by constitutively activated RelA. *Oncogene*, 1999. **18**(32): p. 4554-63.

6. **Shukla, S., et al.**, Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia*, 2004. **6**(4): p. 390-400.
7. **Xia, Y., S. Shen, and I.M. Verma, NF-kappaB,**

an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(9): p. 823-30.

8. **Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, CLUSTAL W:** improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(22): p. 4673-80.

NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA CHỤP CỘNG HƯỞNG TỪ TRONG CHẨN ĐOÁN RÒ HẬU MÔN HÌNH MÓNG NGỰA TẠI BỆNH VIỆN VIỆT ĐỨC

Bùi Sỹ Tuấn Anh¹, Nguyễn Xuân Hùng², Trịnh Hồng Sơn²

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu: Xác định mức độ phù hợp giữa chụp cộng hưởng từ (CHT) hậu môn trực tràng và phẫu thuật trong đánh giá lỗ trong và đường rò hậu môn hình móng ngựa. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Những bệnh nhân được chẩn đoán rò hậu môn hình móng ngựa bằng chụp cộng hưởng từ và phẫu thuật tại bệnh viện Việt Đức giai đoạn 2016-2019. Nghiên cứu mô tả có đối chứng. **Kết quả:** Qua nghiên cứu 56 bệnh nhân có 50 nam và 06 nữ. Chụp cộng hưởng từ phát hiện lỗ trong là 62.5% với độ nhạy là 100% và độ đặc hiệu là 100%. Tỷ lệ phù hợp với phẫu thuật trong phân loại đường rò chính là 93.3%. Tỷ lệ phù hợp chụp cộng hưởng từ trực tràng xác định vị trí lỗ trong so với phẫu thuật là 100%. **Kết luận:** Chụp cộng hưởng từ hậu môn trực tràng đã trở thành tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán rò hậu môn, đặc biệt là rò hậu môn hình móng ngựa trước phẫu thuật (phân loại đường rò chính, xác định vị trí lỗ trong và các tổn thương lan rộng) với độ chính xác cao.

Từ khóa: rò hậu môn hình móng ngựa, chụp cộng hưởng từ hậu môn trực tràng, phân loại đường rò.

SUMMARY

RESEARCH ON THE ROLE OF MAGNETIC RESONANCE IN DIAGNOSIS AND SURGERY OF HORSESHOE SHAPED ANAL FISTULA AT VIET DUC HOSPITAL

Objectives. Determine the relevance between magnetic resonance images and surgery in evaluating the inner hole and the horseshoe – shaped anal fistula. **Subjects and Methods.** Patients who are diagnosed with horseshoe – shaped anal fistula by taking magnetic resonance and surgery at Viet Duc Hospital from 2016 to 2019. This was a description study with control operation. **Results.** Among 56

patients including 50 males and 06 females, 62.5 percent of them are detected inner hole by taking anal magnetic resonance with the sensitivity of 100% and the specificity of 100%. The matching rate with surgery on classifying fistula way is 93.3%. There is a high precision in taking anal magnetic resonance image to locate the inner hole, with the matching rate of 100%. **Conclusions.** Taking anal magnetic resonance has become the gold standard in anal fistula diagnosis, especially in horseshoe – shaped anal fistula before the surgery (classifying the main fistula tracts, locating the inner hole and defining the widespread injuries).

Keywords. Horseshoe – shaped anal fistula, Anorectal magnetic resonance image, classification of anal fistula.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rò hậu môn hình móng ngựa là ổ áp xe lan tỏa từ một bên hố ngồi trực tràng sang hố ngồi trực tràng bên đối diện theo rễ nhánh của dải cơ dọc dài phức hợp ôm quanh thành hậu môn trực tràng tạo thành hình móng ngựa. phương pháp điều trị được áp dụng và đạt kết quả cao nhất là phẫu thuật.

Chẩn đoán rò hậu môn hình móng ngựa dựa vào: lâm sàng, các phương pháp chẩn đoán hình ảnh Xquang có bơm thuốc, siêu âm nội soi, chụp cộng hưởng từ...

Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về chẩn đoán rò hậu môn hình móng ngựa, tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu về vai trò của chụp cộng hưởng từ trong chẩn đoán rò hậu môn hình móng ngựa. Chính vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu vai trò của chụp cộng hưởng từ trong chẩn đoán và phẫu thuật rò hậu môn hình móng ngựa.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu: Những bệnh nhân được chẩn đoán rò hậu môn hình móng ngựa bằng cộng hưởng từ và phẫu thuật tại bệnh viện Việt Đức giai đoạn 2016 – 2019:

¹Bệnh viện Giao thông Vận tải TW,

²Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức

Chịu trách nhiệm chính: Bùi Sỹ Tuấn Anh

Email: DrTuanAnhbvgt@gmail.com

Ngày nhận bài: 20.10.2020

Ngày phản biện khoa học: 23.11.2020

Ngày duyệt bài: 8.12.2020