

Tạo kháng thể IgG thử kháng alpha-fetoprotein người

Lê Thị Phương Thảo, Nguyễn Hữu Hùng

Khoa Nông nghiệp Công nghệ cao và Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành
nguyenuhung.bio@gmail.com

Tóm tắt

Alpha-fetoprotein (AFP) là một protein huyết tương được sản xuất trong quá trình phát triển của bào thai. Ở người trưởng thành khỏe mạnh, AFP tồn tại trong huyết thanh với hàm lượng rất thấp (<20ng/mL) nhưng có sự tăng trở lại trong một số trường hợp bệnh lí, đặc biệt là các trường hợp liên quan tới gan, như ung thư biểu mô tế bào gan, xơ gan, ... Do đó, AFP đã trở thành dấu ấn sinh học được sử dụng trong sàng lọc dị tật thai và chẩn đoán phát hiện ung thư gan. Kháng thể IgG kháng AFP đã và đang được ứng dụng phổ biến trong các xét nghiệm huyết thanh học chẩn đoán và tiên lượng ung thư gan. Nghiên cứu này vì vậy tập trung vào việc sản xuất kháng thể IgG kháng AFP người bằng cách gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ. Kết quả cho thấy thỏ đã tạo được kháng thể IgG đặc hiệu với AFP được đánh giá bằng kỹ thuật western blot. Kháng thể IgG này sau đó đã được tinh chế bằng sắc ký ái lực với protein G và có thể được ứng dụng vào việc chế tạo các sản phẩm chẩn đoán huyết thanh học..

Nhận 20.12.2017
Được duyệt 17.01.2018
Công bố 01.02.2018

Từ khóa

Alpha-fetoprotein, IgG, máu cuống rốn, ung thư biểu mô tế bào gan, sắc ký ái lực.

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Giới thiệu

AFP là một protein huyết tương thuộc họ protein albumin gồm 4 thành viên: albumin (ALB), protein gắn vitamin D (VDP), alpha-fetoprotein (AFP) và alpha-albumin (α -ALB) (McLeod, Cooke, 1989; Lichenstein et al., 1994). Trong đó, AFP và ALB là hai protein có sự tương đồng cao về cấu trúc phân tử và các đặc tính lý hóa (Gerald J. Mizejewski, 2001; Thomas B. Tomasi, 1977). AFP được biết đến đầu tiên là một glycoprotein được sản xuất bởi gan và túi noãn hoàng trong quá trình phát triển của thai. AFP đạt mức cao nhất ở tuần thứ 12 tới 16 của thai kỳ, tuy nhiên lượng AFP tăng cao bất thường nếu thai nhi bị dị tật ống thần kinh và biểu hiện giảm khi có hội chứng Down. Sau khi sinh, lượng AFP trong huyết tương giảm mạnh xuống còn một lượng rất nhỏ (Gerald J. Mizejewski, 2003). Ở người trưởng thành khỏe mạnh, AFP tồn tại trong huyết tương với hàm lượng rất thấp, <20ng/mL. Tuy nhiên, người ta nhận thấy AFP trong huyết thanh tăng trở lại với hàm lượng rất cao, khoảng 500 – 2000ng/mL ở trường hợp ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) (D. H. Bellet et al., 1984). Xơ gan, ung thư tế bào mầm, ung thư vùng dưới niêm mạc dạ dày – ruột, ... cũng có sự biểu hiện tăng của AFP (Stewart Sell, 2008). Do đó, ngoài việc được ứng dụng trong xét nghiệm sàng lọc dị tật thai, AFP còn được biết đến như một dấu ấn sinh học trong xét nghiệm chẩn đoán sớm ung thư, đặc biệt là UTBMTBG. Các kỹ thuật thường được sử dụng trong

các xét nghiệm trên gồm ELISA, IHC (hóa mô miễn dịch), ICC/IF (hóa tế bào miễn dịch/miễn dịch huỳnh quang), western blot, ... Để thực hiện các kỹ thuật này, đòi hỏi một nguồn kháng thể kháng AFP có độ sạch và độ đặc hiệu cao. Kháng thể IgG kháng AFP người được sử dụng hiện nay có thể là kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng, dạng toàn phần tự nhiên (full length native protein) hoặc dạng đã qua chế biến chỉ gồm phần bắt kháng nguyên Fab. Kháng thể đơn dòng có lợi thế về mặt ổn định nhưng giá thành đắt do chi phí sản xuất tốn kém. Do vậy, dù ít ổn định hơn nhưng kháng thể đa dòng mang lại hiệu quả về kinh tế và giảm giá thành sản phẩm. Nghiên cứu này vì vậy tập trung vào việc tạo được kháng thể đa dòng IgG của thỏ kháng AFP của người. Thành công của nghiên cứu này là tạo ra được IgG đặc hiệu với AFP và là tiền đề để tiếp tục phát triển các sản phẩm chẩn đoán huyết thanh học.

2. Vật liệu và phương pháp

Nguyên vật liệu

Động vật thí nghiệm: thỏ đực, ≥ 2 kg/con, được mua từ viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh và nuôi trong nhà động vật của Khoa Nông nghiệp công nghệ cao và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

Gây đáp ứng miễn dịch thỏ với AFP người

AFP được dùng gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ là AFP được tinh chế từ máu cuống rốn của người (Leebio, Hoa



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

Bảng 1: Phác đồ gây đáp ứng miễn dịch thỏ với AFP

| Mũi tiêm | Liều AFP (µg) | Nước muối sinh lý (µl) | Tá chất (µl) | | Thể tích máu thu nhận (mL) |
|------------------|---------------|------------------------|--------------|-----|----------------------------|
| | | | FCA | FIA | |
| Gây miễn cảm | 100 | 500 | 500 | | 5* |
| Tăng cường lần 1 | 100 | 500 | | 500 | 5** |
| Tăng cường lần 2 | 50 | 500 | | 500 | 5** |
| Tăng cường lần 3 | 25 | 500 | | 500 | 20** |
| Tăng cường lần 4 | 20 | 500 | | 500 | 20** |
| Tăng cường lần 5 | 20 | 500 | | 500 | 90** (lấy máu tai và tim) |

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

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

SDS-PAGE được dùng để phân tích huyết thanh thỏ và IgG thỏ. Gel poly-acrylamide 12.5% được sử dụng. Protein sau điện di được phát hiện bằng phương pháp nhuộm với Coomassie blue. Native-PAGE được dùng để phân tích AFP với gel poly-acrylamide 7.5% và protein trong gel được phát hiện bằng nhuộm với AgNO₃.

Kỹ thuật western blot

Gel chứa AFP sau điện di được chuyển lên màng lai nitrocellulose có kích thước lỗ là 0.45 µm trong 1 giờ 30 phút bằng hệ thống chuyển màng bán khô (Hoefer). Màng được khoá bằng 0.1% casein trong đệm TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) trong 1 giờ và được rửa sau đó 3 lần trong đệm TBST trong 10 phút. Màng được ủ trong 1 giờ với huyết thanh (pha loãng 1000 lần trong đệm TBST) của thỏ sau khi gây đáp ứng miễn dịch với AFP và được rửa lại với đệm TBST. Màng sau đó được ủ với kháng thể IgG thứ cấp của dê (goat anti-rabbit IgG) được cộng hợp HRP (Santa Cruz Biotechnology) trong 1 giờ và sau đó được rửa với đệm TBST. Để phát hiện phức hợp lai kháng nguyên - kháng thể, màng được ủ với dung dịch hoá quang luminol và được quét bằng thiết bị C-Digit Blot Scanner. Hình ảnh kết quả western blot được xử lý bằng phần mềm ImageStudioLite.

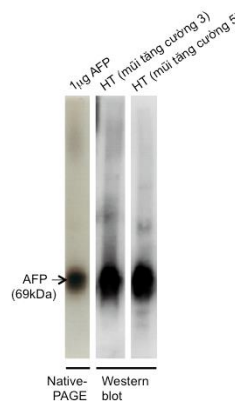
Tinh chế IgG thỏ

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

Để tinh chế IgG, cặn tủa chứa IgG hoà tan bằng thẩm tích trong đệm 20mM sodium phosphate và được nạp qua cột protein G có ái lực mạnh với phần Fc của IgG. Mẫu được nạp vào cột với tốc độ 1mL/min (nạp 30mg protein/mL thể tích cột). Sử dụng dung dịch đệm gắn 20mM sodium phosphate; đệm rửa giải 0.1M Glycine-HCl; đệm trung hòa 1M Tris-HCl. Các phân đoạn bám cột và không bám cột sau sắc ký được dồn mẫu và được đậm đặc bằng phương pháp ly tâm sử dụng AMICON filter unit 10kDa cut-off. Mẫu được trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

3. Kết quả

Đánh giá hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch



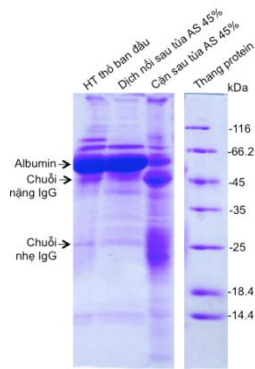
Hình 1. Phát hiện IgG kháng AFP trong huyết thanh thỏ bằng lai phân tử western blot. AFP trong gel native-PAGE được phát hiện bằng nhuộm AgNO₃.

Huyết thanh thỏ trước và sau khi gây đáp ứng miễn dịch (ở mũi tiêm tăng cường lần 3 và 5) được dùng để đánh giá hiệu quả tạo IgG. Kết quả ở Hình 1 cho thấy, có sự xuất hiện của vạch lai western blot chứng tỏ IgG kháng AFP đã được tạo thành ở thỏ sau tiêm. Huyết thanh thỏ trước tiêm không cho kết quả western blot (dữ liệu không trình bày).

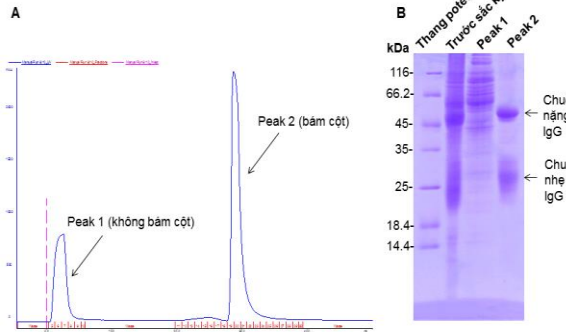
Tinh chế IgG thỏ kháng AFP

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

IgG sau tủa với AS 45% được tiếp tục sử dụng cho sắc ký ái lực với protein G. Kết quả sắc ký cho thấy có 2 phân đoạn được thể hiện trên sắc ký đồ gồm Peak 1 (phần protein không bám cột) và Peak 2 (phần protein IgG bám cột). Mẫu trước và sau sắc ký được phân tích bằng SDS-PAGE. Kết quả ở Hình 3 cho thấy Peak 2 chứa chủ yếu protein chuỗi nặng (~50kDa) và chuỗi nhẹ (~25kDa) của IgG.



Hình 2. Phân tích IgG sau tủa với AS 45% bão hoà bằng SDS-PAGE. Protein trong gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie blue



Hình 3. Phân tích IgG sau tinh chế với cột protein G bằng SDS-PAGE. Protein trong gel được phát hiện bằng nhuộm Coomassie blue.

IgG thô tinh chế có khả năng nhận diện AFP trong máu cuống rốn người

Máu cuống rốn người chứa 150 - 250 µg/ml AFP. Để kiểm

Tài liệu tham khảo

1. D. H. Bellet, J. R. Wands, K. J. Isselbacher, and C. Bohuon (1984) Serum alpha-fetoprotein levels in human disease: perspective from a highly specific monoclonal radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(12): 3869–3873
2. George Klein, Sidney Weinhouse (1979) *Advance in cancer reseach*. Academic Press. Volume 29
3. Gerald J. Mizejewski (2003) Level of alpha-fetoprotein during pregnancy and early infancy in normal and disease states. *Obstetric and Gynecologic survey* 58:12
4. Gerald J. Mizejewski (2001) Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes and conformational variants. *Exp. Biol. Med.* 226: 377
5. Thomas B. Tomasi (1977) Structure and function of alpha-fetoprotein. *Annu. Rev. Med.* 28:453-465
6. Stewart Sell (2008) Alpha-fetoprotein, stem cell and cancer: how study of the production of AFP during chemical hepatocarcinogenesis led to reaffirmation of the stem cell theory of cancer. *Tumour Biol.* 29(3): 161–180

Production of rabbit IgG antibodies against human cord blood alpha-fetoprotein

Thi-Phuong-Thao Le, Huu-Hung Nguyen

Faculty of Hi-tech Agriculture and Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

Abstract Alpha-fetoprotein (AFP) is a plasma protein which is produced during fetal development. In healthy adults, AFP exist in serum with very low concentration (<20ng/mL). However, in some cases of disease, specially in hepatocellular carcinoma (HCC), cirrhosis, ... it was found that levels of AFP become dramatically increase, about 500 – 2000ng/mL. Therefore, AFP has become the biomarker used in serodiagnosis. In this study, we successfully produced anti-AFP IgG antibodies in the rabbits. After purification by protein G affinity chromatography, the antibodies were shown recognise AFP in the cord blood plasma and can be further considered as important reagent for development of serodiagnosis applications.

Keywords alpha-fetoprotein, IgG, cord blood, hepatocellular carcinoma, affinity chromatography.

tra hoạt tính của IgG sau tinh chế, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nhận diện AFP trong huyết tương máu cuống rốn bằng kỹ thuật western blot. Như kỳ vọng, kết quả (Hình 4) cho thấy IgG có khả năng nhận diện được AFP trong huyết tương máu cuống rốn và ít có phản ứng không đặc hiệu với các protein khác.



Hình 4. Đánh giá hoạt tính kháng AFP của IgG sau tinh chế với huyết tương của máu cuống rốn bằng western blot. Protein huyết tương trong gel native-PAGE được phát hiện bằng nhuộm AgNO₃.

4. Thảo luận

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