

TAO DÒNG TẾ BÀO K562 ĐỒNG BIỂU HIỆN CÁC THỤ THỂ KHÁNG NGUYÊN NHÂN TẠO CD137L, CD86, CD64, CD19 VÀ IL15

Cần Văn Mão^{1*}, Ngô Thu Hằng¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Tạo dòng tế bào K562 trình diện đồng thời các kháng nguyên bám màng (CD137L, CD86, CD64, CD19 và IL15), góp phần tạo ra nguyên liệu khởi đầu cho liệu pháp tế bào CAR-T hướng đích CD19.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu sử dụng dòng tế bào K562 và chủng *E. coli* DH10B để tách dòng gen. Tiến hành “gapless PCR” tổng hợp hai đoạn gen: EF1 α promoter-CD137L-T2A-CD86-P2A-CD64-bGHterminator, kích thước 2.975 bp; và RPBSApromoter-CD19-T2A-mIL15-P2A-puroR- β globinterminator, kích thước 2.137 bp. Tách dòng gen các cấu trúc bằng bộ sinh phẩm QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) và nối gen mục tiêu vào vector tách dòng pJET1.2 với xúc tác của enzyme T4 DNA ligase. Xây dựng plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD86-CD64-mIL15 từ tế bào *E. coli* DH10b để chuyển nạp các cấu trúc di truyền bằng hệ thống Transposon-transposase.

Kết quả: Xây dựng thành công quy trình tối ưu tạo tế bào K562 biểu hiện các kháng nguyên nhân tạo với các điều kiện: chuyển nạp 2 μ g mRNA SB100 và 20 μ g plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 vào 107 tế bào K562 bằng bộ kit chuyển nạp SF Cell Line của Lonza.

Kết luận: Nghiên cứu đã tạo thành công dòng tế bào K562 đồng biểu hiện các kháng nguyên CD137L, CD86, CD64, CD19 và IL15 bám màng. Tối ưu hóa các điều kiện chuyển nạp vào tế bào K562 trên hệ thống Amaxa 4D-Nucleofector.

Từ khóa: Tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo, CD19, CD64, CD86, CD137.

ABSTRACT

Objectives: The study aimed to engineer K562 cell line co-expressing membrane-bound antigens (CD137L, CD86, CD64, CD19, and IL15), contributing to the creation of initial materials for CAR-T cell therapy targeting CD19.

Subjects and methods: Study use K562 cell line and *E. coli* DH10B strain were used to clone genes. The gapless PCR method was used to synthesize two gene fragments: EF1 α promoter-CD137L-T2A-CD86-P2A-CD64-bGHterminator with size 2,975 bp; and RPBSApromoter-CD19-T2A-mIL15-P2A-puroR- β globinterminator with size 2137bp. QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) was used to purify the gens and the target genes were ligated into the pJET1.2 cloning vector under catalysis of T4 DNA ligase. Then, the pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD86-CD64-mIL15 plasmid was constructed from *E. coli* DH10b cells to transform the genetic constructs using the Transposon-transposase system.

Results: The successfully developed an optimized process to create K562 cells co-expressing antigens with the following conditions: Transfect 2 μ g of SB100 mRNA and 20 μ g of pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 plasmid into 107 K562 cells using Lonza's SF Cell Line transfection kit.

Conclusions: The study successfully engineered the K562 cell line co-expressing membrane-bound CD137L, CD86, CD64, CD19, and IL15. Optimization of transfection conditions into K562 cells on the Amaxa 4D-Nucleofector system.

Keywords: Artificial antigen-presenting cell, K562 cell line and engineering

Chịu trách nhiệm nội dung: Cần Văn Mão, Email: canvanmao2011@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/02/2025; mời phản biện khoa học: 02/2025; chấp nhận đăng: 15/4/2025.

¹Học viện Quân y.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL) là một trong những bệnh ung thư phổ biến nhất ở trẻ em trên thế giới, chiếm khoảng 75% tất cả các bệnh ung thư máu. Gần đây, ứng dụng thành

công liệu pháp tế bào CAR-T điều trị ALL ngay cả ở những ca tái phát. Nguyên tắc của liệu pháp CAR-T là nhằm tạo ra tế bào T mang các thụ thể nhân tạo có khả năng nhận biết những kháng nguyên đặc hiệu trên bề mặt tế bào ung thư, từ đó, kích hoạt

khả năng phân giải tế bào ung thư của tế bào T. Bên cạnh đó, các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp (APC) - như tế bào tua (DC), tế bào lympho - có các phân nhóm đa dạng với các chức năng hiệu ứng cụ thể. Hai dòng chính của DC được công nhận là dòng tủy (gồm các tế bào Langerhans và DC kẽ) và dòng tế bào plasma [1]. DC trải qua quá trình hoạt hóa/trưởng thành từng bước. DC chưa trưởng thành rất cần duy trì khả năng dung nạp đối với các kháng nguyên tự thân và phát triển khả năng miễn dịch chủ động [2]. Trong mô, DC được hoạt hóa để đáp ứng với các tín hiệu vi khuẩn (các phối tử thụ thể giống toll) và các tín hiệu vi mô khác, kích hoạt quá trình di chuyển và biệt hóa thành DC trưởng thành trình diện kháng nguyên. Khả năng tạo ra các DC từ các tế bào đơn nhân trong máu hoặc các tiền chất khác đã cho phép các nghiên cứu thử nghiệm việc truyền thụ động các DC mang kháng nguyên ở người. Do đó, trị liệu miễn dịch bằng DC có ý nghĩa quan trọng đối với liệu pháp miễn dịch ung thư và tự miễn dịch. Tuy nhiên, việc tạo ra DC rất tốn kém và mất nhiều công sức. Quá trình nuôi cấy đòi hỏi nhiều nguồn lực, sử dụng hỗn hợp các cytokine và có sự khác biệt giữa những người hiến tặng. Ngoài ra, đã có báo cáo về các DC rối loạn chức năng ở bệnh nhân ung thư [3].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sử dụng APC nhân tạo (aAPC) thay cho APC tự nhiên sẽ làm tăng tỉ lệ thành công tạo dòng tế bào lympho người [4, 5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn dòng tế bào K562 làm nguồn, vì các tế bào không biểu hiện các phân tử phức hợp hòa hợp và chủ yếu, do đó, ngăn ngừa các phản ứng đồng loài. Mặt khác, các tế bào cũng chứa các phân tử kết dính giúp tăng cường tương tác tế bào T-aAPC. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tạo ra aAPC từ dòng tế bào K562 trình diện đồng thời các kháng nguyên nhân tạo bám màng, gồm CD137L, CD86, CD64, CD19 và IL15; góp phần tạo ra nguyên liệu khởi đầu cho liệu pháp tế bào CAR-T hướng đích CD19.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chuồng vi sinh vật: sử dụng chủng *E. coli* DH10B (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) để tách dòng gen.

- Dòng tế bào K562 (Manassas, VA): được Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y chia sẻ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp tổng hợp gen nhân tạo: sử dụng phương pháp “gapless PCR” tổng hợp hai đoạn gen: mảnh 1 cấu trúc EF1 α promoter-CD137L-

T2A-CD86-P2A-CD64-bGHterminator, kích thước 2.975 bp; mảnh 2 có cấu trúc RPBSApromoter-CD19-T2A-mIL15-P2A-puroR- β globinterminator, kích thước 2.137 bp. Sử dụng các promoter: EF1 α promoter cho các đoạn gen ở mảnh 1 và 2RPBSA promoter cho các đoạn gen ở mảnh 2 (đây là các promoter mạnh có khả năng cho phép biểu hiện được đồng thời nhiều gen cùng lúc). Thiết kế các mảnh gen cần tổng hợp bằng phần mềm DNAWorks (v3.2.3), chia thành các oligo. Các oligo nằm liên tiếp nhau có trình tự nối tiếp nhau, phủ kín toàn bộ chiều dài theo cả hai mạch.

- Tách dòng gen các cấu trúc: đầu tiên, sản phẩm “full length PCR” chứa đoạn gen được tinh sạch trên gel bằng bộ sinh phẩm QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Tiếp theo, nối gen mục tiêu vào vector tách dòng pJET1.2 với xúc tác của enzyme T4 DNA ligase (Thermo Fisher). Tất cả các bước được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Xây dựng plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD86-CD64-mIL15: véc-tơ pSBbi-Pur được sử dụng để chuyển nạp các cấu trúc di truyền bằng hệ thống Transposon-transposase. Gen mục tiêu sau khi tách dòng tiếp tục được khuếch đại bằng PCR với khuôn plasmid có kết quả giải trình tự chính xác với trình tự đích mong muốn và sử dụng cặp mồi được thiết kế có thêm trình tự cắt của enzyme. Sau đó, sản phẩm PCR và vector cùng được cắt bằng enzyme giới hạn. Sau khi tinh sạch, sản phẩm cắt PCR và vector được nối với nhau nhờ xúc tác của enzyme T4 DNA ligase. Sau đó, sản phẩm nối này được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10b. Sàng lọc và giải trình tự sản phẩm biến nạp để chọn dòng tế bào *E. coli* DH10b mang cấu trúc chính xác.

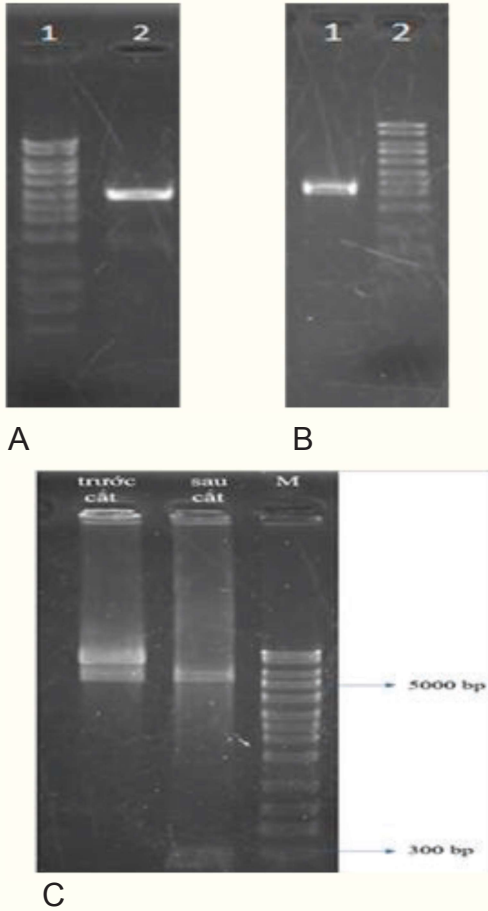
- Phương pháp nuôi cấy tế bào K562: tế bào K562 (1 mL) bảo quản ở âm 80°C trong FBS (10% DMSO) được làm ấm nhanh ở 37°C trong khoảng 1 phút. Sau đó, bổ sung từ 20 mL RPMI 1640 (10% FBS) vào ống tế bào, li tâm ở 200 vòng/phút trong 10 phút. Tiếp theo, loại bỏ toàn bộ dịch nổi, hòa tan cặn tế bào bằng môi trường RPMI 1640 (10% FBS, 37°C), chuẩn nồng độ tế bào 10⁵ tế bào/mL. Tế bào được nuôi trong chai T25 ở 37°C, 5% CO₂, độ ẩm > 90%, không lắc, đến khi mật độ đạt 10⁶ tế bào/mL thì tiến hành cấy chuyển về 5×10⁵ tế bào/mL.

- Phương pháp chuyển nạp gen vào tế bào K562: sử dụng hệ véc-tơ Transposon-transposase kết hợp với xung điện được sử dụng là FF-120 (hệ thống chuyển nạp Amaxa™ 4D-Nucleofector™ của Lonza) để chuyển nạp gen vào tế bào K562. Các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tạo cấu trúc “Sleeping Beauty” biểu hiện đồng thời CD137L, CD86, CD64, CD19 và IL15 bám màng

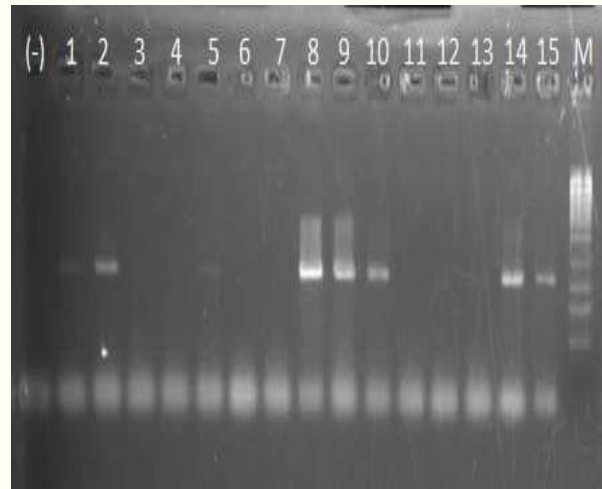
- Sản phẩm PCR full length và kết quả điện di plasmid pSBbi-Pur sau khi cắt bằng hai enzyme NcoI và XbaI:



Hình 1. Sản phẩm PCR full length và kết quả điện di plasmid pSBbi-Pur sau khi cắt bằng hai enzyme NcoI và XbaI. (A): 1: HighRanger 1 kb DNA Ladder (Norgen); 2: Sản phẩm PCR full length mảnh 1. (B): 1: Sản phẩm PCR tổng hợp mảnh 2; 2: HighRanger 1 kb DNA Ladder (Norgen). (C): Kết quả điện di plasmid pSBbi-Pur sau khi cắt bằng hai enzyme NcoI và XbaI.

Kết quả nghiên cứu cho thấy 2 đoạn gen mục tiêu được tổng hợp đặc hiệu với sản phẩm, chứa 1 vạch sáng rõ nét với kích thước phù hợp (2.975 bp) của PCR full length cấu trúc 1 (Hình 1A) và 2.137 bp của PCR full length cấu trúc 2 (Hình 1B). Tiến hành cắt plasmid pSBbi-Pur bằng 2 enzyme NcoI, XbaI và điện di trên gel agarose thấy kích thước hai mảnh phù hợp với tính toán lí thuyết (khoảng 5.600 bp và khoảng 220 bp) (Hình 1C).

- Kết quả PCR sàng lọc cấu trúc 2 bằng cặp mồi mL15-F và mL15-R:

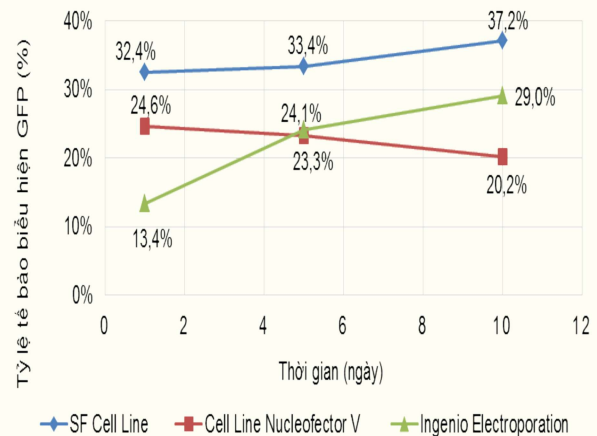


Hình 2. Kết quả PCR sàng lọc cấu trúc 2 bằng cặp mồi mL15-F và mL15-R.

Sản phẩm biến nạp được cấy trải trên môi trường LB đặc có kháng sinh Ampicillin nồng độ 100 µg/ml, sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp PCR khuẩn lạc. Kết quả sàng lọc (Hình 2) cho thấy 6 trên 15 dòng khuẩn lạc cho kết quả dương tính. Tiến hành chọn 3 dòng khuẩn lạc đi nuôi cấy, sau đó tách và tinh sạch plasmid. Plasmid được gửi đi giải trình tự Sanger.

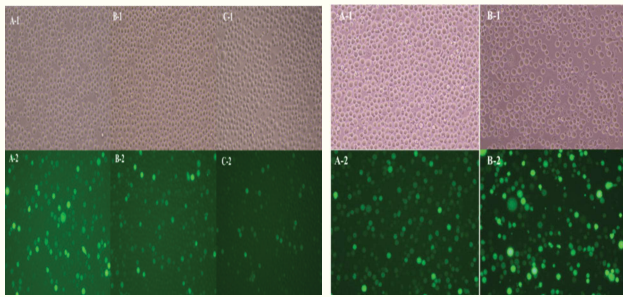
3.2. Tối ưu điều kiện chuyển nạp vào tế bào K562 trên hệ thống Amaxa 4D-Nucleofector

- Tỷ lệ tế bào K562 sống biểu hiện GFP khi chuyển nạp:



Hình 3. Tỷ lệ tế bào K562 sống biểu hiện GFP khi chuyển nạp bằng 3 bộ kit SF Cell Line, Cell Line Nucleofector V, Ingenio Electroporation.

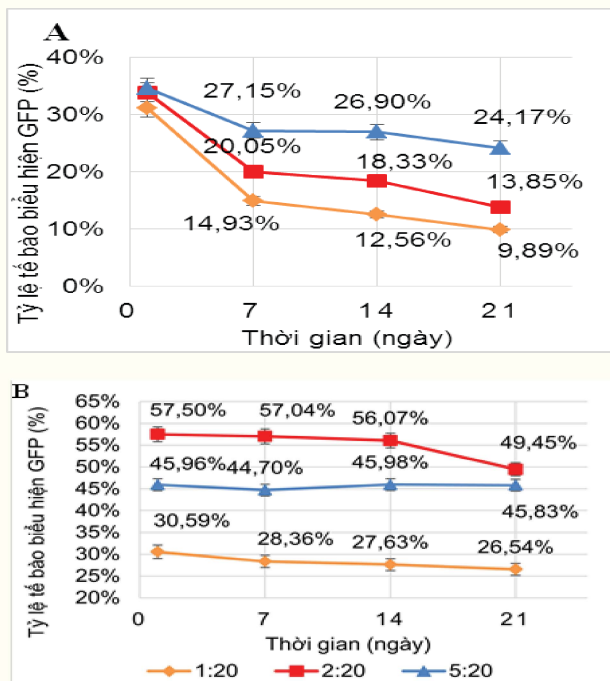
Phân tích kết quả sau 1 ngày, 5 ngày, 10 ngày chuyển nạp cho thấy, hiệu suất chuyển nạp của bộ kit SF Cell Line luôn cao hơn (lần lượt là 32,4%; 33,4% và 37,2 %) so với bộ kit Cell Line Nucleofector V (lần lượt là 24,6%; 23,3% và 20,2%) và so với Ingenio Electroporation (lần lượt là 13,4%; 24,1% và 29,0%).



Hình 4. Hình ảnh đại diện tế bào K562 sau 24 giờ chuyển nạp dưới kính hiển vi lọc thường và kính lọc huỳnh quang (độ phóng đại 20X). (A): A-1, A-2 là sử dụng kit SF Cell Line; B-1, B-2 là sử dụng kit Cell Line Nucleofector V; C-1, C-2 là sử dụng kit Ingenio Electroporation. (B): A-1, A-2 là sử dụng 10^6 tế bào; B-1, B-2 là sử dụng 10^7 tế bào.

Chúng tôi sử dụng bộ kit SF Cell Line của Lonza, bộ kit Cell Line Nucleofector V của Lonza và bộ kit Ingenio Electroporation của Mirus Bio. Ban đầu tế bào sau chuyển nạp 24 giờ được kiểm tra định tính bằng kính hiển vi, sử dụng kính lọc huỳnh quang để quan sát biểu hiện GFP (Hình 4A). Lượng mRNA SB: pSBtet-GP (μ g) được khảo sát là: 1:20, 2:20, 5:20, lượng tế bào K562 sử dụng là 10^6 hoặc 10^7 tế bào. Ban đầu tế bào sau chuyển nạp 24 giờ được kiểm tra định tính bằng kính hiển vi soi ngược và sử dụng kính lọc huỳnh quang để quan sát biểu hiện GFP (Hình 4B).

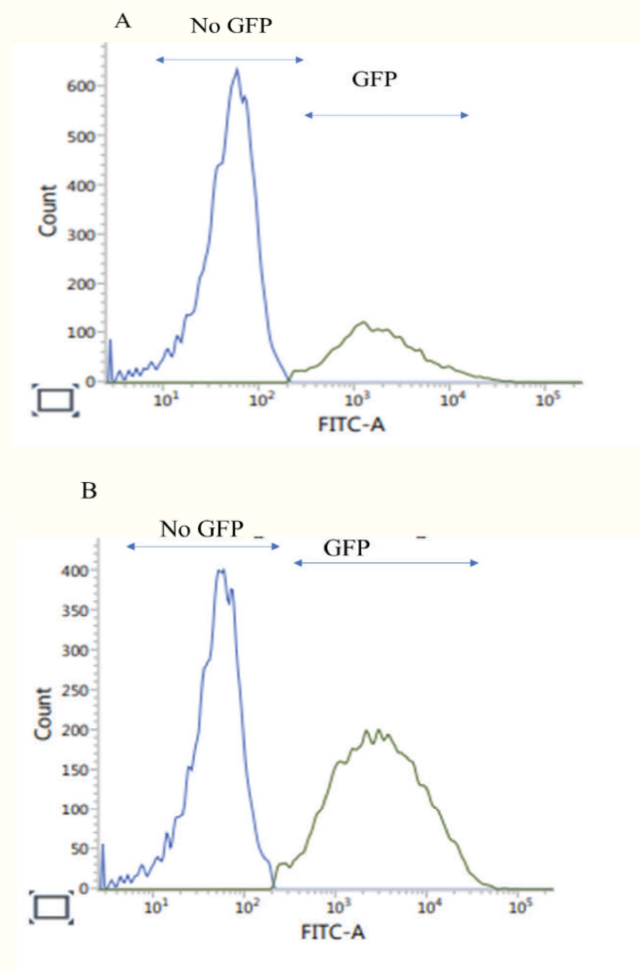
- Ảnh hưởng của số tế bào và lượng cấu trúc đến hiệu suất chuyển nạp:



Hình 5. Ảnh hưởng của số tế bào và lượng cấu trúc đến hiệu suất chuyển nạp. (A): phản ứng sử dụng 10^6 tế bào; (B): phản ứng sử dụng 10^7 tế bào.

Khi sử dụng nồng độ 10^6 tế bào, 3 tỉ lệ plasmid gồm 5:20, 2:20 và 1:20 cho hiệu suất chuyển nạp xấp xỉ 35% sau 24 giờ. Tuy nhiên, tỉ lệ tế bào K562 biểu hiện GFP ở ngày 7 giảm xuống (lần lượt các tỉ lệ là 27,15%, 20,05% và 14,93%). Từ ngày thứ 7 đến ngày 21, tỉ lệ tế bào K562 biểu hiện GFP không thay đổi đáng kể (lần lượt là 24,17%, 13,85%, 9,89% ở ngày thứ 21 - hình 5A). Khi sử dụng nồng độ 10^7 tế bào, hiệu suất chuyển nạp cao hơn, sau 24 giờ với tỉ lệ 5:20, 2:20 và 1:20 lần lượt là 57,50%, 45,96% và 30,59%. Từ ngày thứ 7 đến ngày 21, tỉ lệ tế bào biểu hiện GFP được giữ tương đối ổn định (đạt 49,45%, 45,83%, 26,54% vào ngày thứ 21 - hình 5B). Sau đó, hiệu suất chuyển nạp qua các ngày nuôi cấy được đánh giá trong 21 ngày bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) cho kết quả thể hiện ở hình 6.

- Kết quả phân tích flow cytometry sau 21 ngày chuyển nạp:



Hình 6. Kết quả phân tích flow cytometry sau 21 ngày chuyển nạp. (A): chuyển nạp 10^6 tế bào với tỉ lệ mRNA SB và plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 là 5:20; (B): chuyển nạp 10^7 tế bào với tỉ lệ mRNA SB và plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 là 2:20.

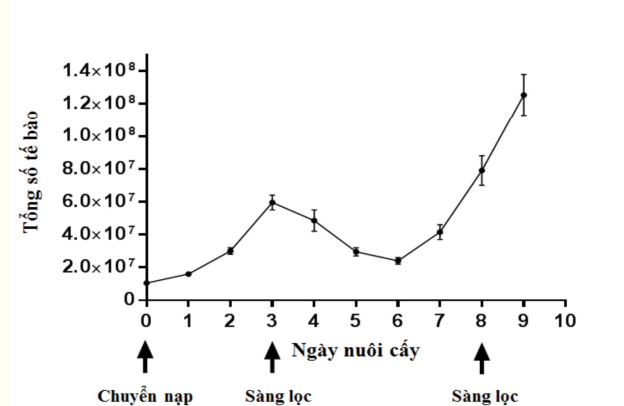
3.3. Tạo dòng tế bào aAPC K562 mang cấu trúc di truyền biểu hiện đồng thời CD137L, CD86, CD64, CD19, IL15 bám màng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ puromycin đến tỉ lệ tế bào sống sau 3 ngày sàng nuôi cấy

Nồng độ puromycin	Tế bào K562 mẹ	Tế bào K562 aAPC
0 ng/ml	95%	95%
1 ng/ml	83%	95%
2 ng/ml	47%	93%
4 ng/ml	14%	88%
6 ng/ml	0%	84%
8 ng/ml	0%	79%

Ảnh hưởng của kháng sinh sàng lọc (puromycin) quan sát rõ ràng ở ngày thứ 3. Đối với K562 đã chuyển nạp, nồng độ puromycin 1 và 2 ng/ml không gây ảnh hưởng đáng kể, tỉ lệ sống đạt lần lượt 95% và 93%. Tuy nhiên, từ nồng độ 4 ng/ml bắt đầu quan sát thấy nhiều tế bào chết và nhăn, tỉ lệ tế bào sống đếm được lần lượt là 88%, 84% và 79% đối với nồng độ 4, 6 và 8 ng/ml.

Tổng số tế bào K562 trong quá trình nuôi cấy và sàng lọc



Hình 7. Tổng số tế bào K562 trong quá trình nuôi cấy và sàng lọc.

Áp dụng quy trình chuyển nạp tối ưu đã xây dựng ở trên, chúng tôi tiến hành chuyển nạp 2 μ g mRNA SB100 và 20 μ g plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 vào 10^7 tế bào K562 bằng bộ kit chuyển nạp SF Cell Line của Lonza. Trong 3 ngày nuôi cấy đầu tiên số lượng tế bào liên tục tăng dần đạt 6.10^7 . Sau bổ sung puromycin với nồng độ 6 ng/ml vào môi trường nuôi cấy để sàng lọc tế bào. Số lượng tế bào bắt đầu giảm dần còn 3.10^7 tế bào ở ngày thứ 6, nhưng tăng dần đến ngày thứ 9.

4. BÀN LUẬN

4.1. Tạo cấu trúc “Sleeping Beauty” biểu hiện đồng thời CD137L, CD86, CD64, CD19 và IL15 bám màng

Kết quả quá trình tổng hợp gen mã hóa mảnh 1 và mảnh 2 theo phương pháp tổng hợp gen hai bước “gapless PCR” cho thấy đoạn gen mục tiêu được tổng hợp đặc hiệu với sản phẩm chính chứa 1 vạch sáng rõ nét, phù hợp với kích thước mong muốn 2.975 bp (cấu trúc 1) và 2.137 bp (cấu trúc 2). Tuy nhiên, sản phẩm full length vẫn có sản phẩm không đặc hiệu. Do vậy, đem tinh sạch sản phẩm full length trên gel để thu được sản phẩm đặc hiệu mong muốn.

Kết quả tách dòng gen sản phẩm PCR full length: hai cấu trúc được tinh sạch trên gel trước khi nối với vector tách dòng pJET1.2 và biến nạp vào tế bào khả biến DH10B. Tiến hành sàng lọc sơ bộ bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc (colony PCR). Kết quả sàng lọc mảnh 1: 5/7 dòng khuẩn lạc dương tính có kích thước phù hợp với tính toán lí thuyết (khoảng 1.000 bp). Nuôi cấy các dòng khuẩn lạc dương tính, sau đó, tiến hành tách và tinh sạch plasmid, gửi giải trình tự Sanger. Kết quả có 1/5 dòng cho kết quả hoàn toàn chính xác với trình tự đã thiết kế. Kết quả sàng lọc cấu trúc 2: 7/7 dòng khuẩn lạc dương tính có kích thước phù hợp với tính toán lí thuyết (khoảng 800 bp). Nuôi cấy các dòng khuẩn lạc dương tính, sau đó, tiến hành tách và tinh sạch plasmid, gửi giải trình tự Sanger. Kết quả giải trình tự hoàn toàn chính xác với trình tự đã thiết kế. Cắt sản phẩm PCR khuếch đại mảnh 1 bằng enzyme NcoI, XbaI và mảnh 2 bằng enzyme PmlI, BsiwI. Sau đó, đem tinh sạch trực tiếp sản phẩm. Kết quả tạo cấu trúc pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 Plasmid và sử dụng để chuyển nạp các cấu trúc di truyền bằng hệ thống Transposon-transposase là pSBbi-Pur. Tiến hành cắt plasmid pSBbi-Pur bằng enzyme NcoI và XbaI, điện di Sản phẩm cắt trên gel agarose. Kết quả cắt vector pSBbi-pur bằng NcoI và XbaI cho thấy sản phẩm cắt có kích thước hai mảnh phù hợp với tính toán lí thuyết (khoảng 5.600 bp và 220 bp).

Tiến hành nối mảnh 1 (cắt bằng enzyme NcoI và XbaI) vào plasmid pSBbi-Pur (đã cắt ở trên) và biến nạp vào tế bào khả biến DH10B bằng phương pháp sốc nhiệt. Sàng lọc các khuẩn lạc sau biến nạp bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc. Kết quả thấy có 7/24 dòng khuẩn lạc dương tính. Lựa chọn 3 dòng khuẩn lạc dương tính nuôi cấy, sau đó, thực hiện tách, tinh sạch plasmid và gửi giải trình tự Sanger. Kết quả: plasmid thu được có trình tự đúng với trình tự đã thiết kế. Tiếp tục cắt Plasmid pSBbi-Pur-M1 tinh sạch bằng enzyme PmlI và BsiwI. Sản phẩm sau cắt là plasmid mở vòng có kích thước khoảng 8.500 bp. Từ plasmid đã cắt mở vòng, tiến hành chèn mảnh 2 (cắt bằng enzyme PmlI và BsiwI) vào vị trí cắt. Sau đó, biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH10B bằng phương pháp sốc nhiệt. Cấy trải sản

phẩm biến nạp trên môi trường LB đặc có kháng sinh Ampicillin nồng độ 100 µg/ml, sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp PCR khuẩn lạc. Kết quả sàng lọc thấy 6/15 dòng khuẩn lạc dương tính. Chọn 3 dòng khuẩn lạc dương tính nuôi cấy, sau đó, tách và tinh sạch plasmid, gửi giải trình tự Sanger. Kết quả: plasmid thu được có trình tự hoàn toàn chính xác.

4.2. Tối ưu điều kiện chuyển nạp vào tế bào K562 trên hệ thống Amaxa 4D-Nucleofector

Mục đích của thí nghiệm này là khảo sát các loại kit khác nhau để tìm ra loại kit cho hiệu suất chuyển nạp cấu trúc tốt nhất vào hệ gen của tế bào K562. Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng 3 bộ kit là SF Cell Line của Lonza, Cell Line Nucleofector V của Lonza và Ingenio Electroporation của Mirus Bio. Ban đầu, tế bào sau chuyển nạp 24 giờ được kiểm tra định tính bằng kính hiển vi soi ngược, quan sát biểu hiện GFP bằng kính lọc huỳnh quang (Hình 4). Đánh giá hiệu suất chuyển nạp qua các ngày nuôi cấy bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry). Sau khi phân tích kết quả sau 1, 5, 10 ngày nuôi cấy, chúng tôi đã lựa chọn bộ kit SF Cell Line dùng cho các thí nghiệm chuyển nạp tiếp theo.

Sau khi lựa chọn loại đệm thích hợp cho chuyển nạp, tiến hành tối ưu hóa lượng plasmid và số tế bào K562 sử dụng cho mỗi lần chuyển nạp. Đánh giá hiệu suất chuyển nạp qua các ngày nuôi cấy trong 21 ngày bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy. Từ các kết quả thu được, các nghiên cứu tiếp theo sẽ sử dụng nồng độ 10^7 tế bào K562 cùng với 2 µg mRNA SB và 20 µg plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 cho mỗi lần chuyển nạp.

4.3. Tạo dòng tế bào aAPC K562 mang cấu trúc di truyền biểu hiện đồng thời CD137L, CD86, CD64, CD19 và IL15 bám màng

Sau khi lựa chọn loại đệm, lượng plasmid, lượng tế bào tối ưu để chuyển nạp cho hiệu suất cao nhất, chúng tôi tiến hành tối ưu nồng độ kháng sinh dùng cho quá trình sàng lọc tế bào K562 trình diện các kháng nguyên mong muốn. Bổ sung Puromycin (một kháng sinh có khả năng gây độc tế bào động vật) vào các giếng tế bào K562 chưa được chuyển nạp và những tế bào K562 đã chuyển nạp mRNA SB100 và plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 (sau 3 ngày nuôi cấy) theo nồng độ tăng dần từ 1-8 ng/ml. Do plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 mang gen pac mã hóa cho protein Puromycin N-acetyltransferase (Hình 2), tế bào được chuyển nạp thành công sẽ có khả năng kháng kháng sinh puromycin. Trong khi đó, những tế bào không chuyển nạp không có khả năng chuyển hóa puromycin, dẫn đến tích tụ độc tố và chết tế bào.

Từ các kết quả đánh giá tỉ lệ sống chết tế bào, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình tạo tế bào K562 trình diện các kháng nguyên nhân tạo mong muốn với các điều kiện đã tối ưu như sau: chuyển nạp 2 µg mRNA SB100 và 20 µg plasmid pSBbi-Pur-CD19-CD137-CD64-CD86-mIL15 vào 10^7 tế bào K562 bằng bộ kit chuyển nạp SF Cell Line của Lonza. Kết quả này cho thấy tế bào K562 đã chuyển nạp có khả năng kháng puromycin. Do đó, bước đầu có thể khẳng định đã chuyển nạp thành công cấu trúc mong muốn vào thể gen của tế bào K562 [6]. Tế bào sau chuyển nạp sẽ được cấy chuyển và tiến hành tách dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn hoặc sử dụng môi trường chọn lọc bán đặc.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tổng hợp thành công cấu trúc "Sleeping Beauty" biểu hiện đồng thời CD137L, CD86, CD64, CD19 và IL15 bám màng. Tối ưu hóa các điều kiện chuyển nạp vào tế bào K562 trên hệ thống Amaxa 4D-Nucleofector: sử dụng 2 µg mRNA SB (mã hóa SB transposase); 20 µg plasmid vào tế bào K562 trên hệ thống Amaxa 4D-Nucleofector; 10^7 tế bào K562/lần chuyển nạp và bộ kit sử dụng là SF Cell Line (Lonza). Tạo thành công tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo K562 mang cấu trúc di truyền đã hòa nhập vào thể gen của tế bào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Banchereau J, Palucka A.K (2005), "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer", *Nature Reviews Immunology*, 5 (4): 296-306.
2. Steinman R.M, Hawiger D, Nussenzweig M.C (2003), "Tolerogenic dendritic cells", *Annual review of immunology*, 21 (1): 685-711.
3. Almand B, Resser J.R, Lindman B, et al. (2000), "Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer", *Clinical Cancer Research*, 6 (5): 1755-66.
4. Oelke M, Maus M.V, Didiano D, et al (2003), "Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells", *Nature Publishing Group US New York*.
5. Hirano N, Butler M.O, Xia Z, et al (2006), "Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity", *Blood*, 107 (4): 1528-36.
6. Suhoski M.M, Golovina T.N, Aqui N.A, et al (2007), "Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules", *Molecular Therapy*, 15 (5): 981-8. □