

người, TBBC giả lập và TBTC giả lập trên từng thiết bị phân tích giữa 10 phòng xét nghiệm là tương đương nhau, cùng một mức nồng độ thì thiết bị Celldyn 3200, Celldyn Ruby sẽ cho kết quả TBBC giả lập và TBHC người tương đương nhau, chỉ có chỉ số TBTC là khác nhau. và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Như vậy, mẫu sinh phẩm đo số lượng tế bào máu đạt tiêu chuẩn để có thể được sử dụng để đánh giá kết quả của các phòng xét nghiệm có sử dụng dòng máy đo quang là Celldyn 3200, Celldyn Ruby.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Whitehead, T.; Woodford, F.** External quality assessment of clinical laboratories in the United Kingdom. *J. Clin. Pathol.* 1981, 34, 947-957.
2. **Sciacovelli, L.; Secchiero, S.; Zardo, L.; Zaninotto, M.; Plebani, M.** External quality assessment: an effective tool for clinical governance in laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006, 44, 740-749.
3. **Sciacovelli, L.; Secchiero, S.; Zardo, L.; Plebani, M.** The role of the external quality assessment. *Biochem. Med.* 2010, 20, 160-164.
4. **Vo, N.N.; Tran, H.T.; Truong, Q.T.; Nguyen, T.H.** Optimization of Storage Medium for Hematological Reference Samples in External Quality Assessment. *Appl. Sci.* 2021, 11, 8777. <https://doi.org/10.3390/app11188777>.
5. **Miller, W.G.**, Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes. *Clinica Chimica Acta*, 2003. 327(1): p. 25-37.
6. **Westgard J.O.** Basic QC practices, 4<sup>th</sup> ed.; Westgard QC Inc., USA, 2016.

## TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN INTERLEUKIN-33 NGƯỜI DUNG HỢP VỚI SUMO TRÊN ESCHERICHIA COLI

Nguyễn Quốc Thái<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Hoài Phong<sup>1</sup>,  
Mai Thành Tấn<sup>1</sup>, Mai Huỳnh Như<sup>1</sup>, Thái Khắc Minh<sup>1</sup>

#### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Các nghiên cứu gần đây cho thấy interleukin (IL)-33 và thụ thể đóng vai trò quan trọng trong các bệnh lý viêm, nhiễm trùng và tự miễn. Tuy nhiên, việc chiết xuất IL-33 trực tiếp từ các mô gặp nhiều khó khăn và lượng protein chiết được rất thấp gây trở ngại cho nghiên cứu phát triển thuốc ức chế cytokin này. **Mục đích:** tạo được IL-33 người tái tổ hợp dạng dung hợp với tag SUMO trên Escherichia coli. **Phương pháp:** gen mã hoá cho IL-33 người được tối ưu hóa codon cho biểu hiện trên E. coli bằng phần mềm OptimumGene™ Optimization Analysis của công ty GeneScript. Plasmid pET-SUMO-il33 được biến nạp vào E. coli BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. **Kết quả:** Plasmid tái tổ hợp chứa gen il33 được thiết kế gắn tag gồm 8×His và SUMO tag ở đầu N tận với gen il33 được tối ưu hoá codon cho biểu hiện trên E. coli. Tế bào E. coli BL21(DE3) mang pET-SUMO-il33 có khả năng biểu hiện IL-33 tái tổ hợp dưới dạng tan trong môi trường LB ở 37 °C. **Kết luận:** Nghiên cứu đã tạo dòng thành công chủng E. coli BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-il33 có khả năng tạo IL-33 tan ở dạng dung hợp với tag SUMO với hiệu suất cao.

**Từ khoá:** interleukin-33 người tái tổ hợp, tối ưu hoá codon, pET-SUMO, E. coli

#### SUMMARY

#### EXPRESSION OF HUMAN INTERLEUKIN-33 FUSED WITH SUMO IN ESCHERICHIA COLI

**Background:** Recent studies showed that interleukin (IL)-33 and its receptor play an important role in inflammation, infection, and autoimmune diseases. Nevertheless, direct extractions of IL-33 from human tissues often resulted in limited amount of this cytokine, which may hinder the drug discovery process. **Objectives:** This study aims to express recombinant human IL-33 fused with SUMO in Escherichia coli. **Methods:** codons from human il33 gene was optimized for the expression in E. coli using OptimumGene™ Optimization Analysis (GeneScript). The recombinant plasmid pET-SUMO-il33 was transformed into chemically competent E. coli BL21 (DE3) by heat-shock method. **Results:** The recombinant plasmid was designed with a 8×His and a SUMO tag at the N-terminal of the codon-optimized il33 gene. The transformed E. coli BL21(DE3) could express soluble recombinant IL-33 in LB medium at 37°C. **Conclusion:** In this study, we have successfully transformed E. coli BL21(DE3) with the recombinant plasmid pET-SUMO-il33. The bacteria could express soluble SUMO-IL-33 with high yield.

**Keywords:** recombinant human interleukin-33, codon optimization, pET-SUMO, E. coli

#### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

IL-33 là một thành viên trong họ IL-1, có liên quan đến các miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thu nhận thông qua tương tác với thụ thể ST2. IL-33 đóng vai trò bệnh lý trong các mô bị viêm

<sup>1</sup>Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Quốc Thái

Email: ngqthai@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 8.2.2024

Ngày phản biện khoa học: 21.3.2024

Ngày duyệt bài: 24.4.2024

trong các rối loạn dị ứng liên quan đến phản ứng miễn dịch quá mức ở da và phổi. IL-33 cũng có chức năng bảo vệ mô trong giai đoạn hồi phục sau chấn thương mô ở hệ thần kinh trung ương và đường tiêu hóa. Do đó, việc nghiên cứu tương tác giữa IL-33 và thụ thể đem đến một chiến lược đầy hứa hẹn để điều trị các rối loạn miễn dịch liên quan đến sự điều hòa tín hiệu của cytokin [1].

Việc chiết xuất IL-33 trực tiếp từ các mô của con người gặp nhiều khó khăn và lượng protein chiết được rất thấp. Cùng với tiến bộ của công nghệ sinh học, nhiều protein người đã được sản xuất với số lượng lớn và độ tinh khiết cao đáp ứng nhu cầu nghiên cứu sản xuất và phát triển thuốc mới. Nghiên cứu này được thực hiện với mong muốn tạo được nguồn IL-33 tái tổ hợp dạng tan trên *Escherichia coli* nhằm đáp ứng nhu cầu nghiên cứu và thử nghiệm thuốc tại Việt Nam. Bước đầu tiên gen mã hoá cho il33 người được tối ưu hoá cho biểu hiện trên *E. coli*. Chúng *E. coli* với plasmid mang gen này được tạo dòng và kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Tối ưu hoá codon cho biểu hiện gen il-33 người và thiết kế plasmid tái tổ hợp.** Khung đọc mở (Open reading frame) mã hóa cho IL-33 người (GeneID: 90865, UniProtKB/Swiss-Prot: O95760 dài 813 bp với các codon được tối ưu hóa cho biểu hiện trên *E. coli* bằng phần mềm OptimumGene™ Optimization Analysis của công ty GeneScript (Piscataway, NJ, Hoa Kỳ). Phần mềm này sử dụng thuật toán để tối ưu hóa các thông số sau: độ lệch sử dụng codon, hàm lượng GC, hàm lượng CpG dinucleotide, cấu trúc mARN, vị trí cắt ẩn, vị trí PolyA sớm, vị trí Chi nội phân tử và vị trí gắn ribosom, đảo CpG tích điện âm, motif RNA không bền, trình tự lặp lại và vị trí cắt giới hạn có thể ảnh hưởng đến giai đoạn cloning.

Gen il33 với các codon sau khi tối ưu hoá được thiết kế với đầu N tận cùng gắn thẻ gồm 8 histidin và SUMO với hai điểm cắt giới hạn cho NdeI và XhoI ở hai đầu. Cấu trúc này được gắn vào plasmid pET24a(+) và được tổng hợp bởi công ty GeneScript (Piscataway, NJ, Hoa Kỳ).

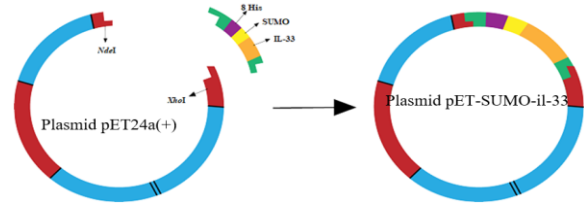
**2.2. Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-il33.** Plasmid pET-SUMO-il33 được tối ưu hoá cho biểu hiện trên *E. coli* được tổng hợp bởi công ty GeneScript (Piscataway, NJ, Hoa Kỳ). Tế bào *E. coli* BL21(DE3) khả nạp được biến nạp với 2  $\mu$ L dung dịch plasmid 10 ng/ $\mu$ L bằng cách sốc nhiệt ở 42°C. Tế bào sau biến nạp được nuôi cấy trong môi trường LB bổ sung kanamycin 50  $\mu$ g/mL,

glucose 1%, lắc ở 37 °C qua đêm.

**2.3. Khảo sát biểu hiện protein tái tổ hợp.** *E. coli* BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp được sau khi cấy hoạt hóa trong LB (mục 2.2) được cấy chuyển sang 10 mL môi trường và điều kiện tương tự. Khi mật độ tế bào đạt  $OD_{600} = 0,6-0,8$ , cảm ứng bằng isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) 0,1 mM. Tiếp tục nuôi cấy qua đêm trong cùng điều kiện. Ly tâm thu sinh khối tế bào ở tốc độ 6000  $\times$  g trong 10 phút. Phân tán sinh khối trong dung dịch đệm A chứa natri phosphat 50 mM pH 7,8; NaCl 400 mM; KCl 100 mM; glycerol 10%. Tán siêu âm phá tế bào, ly tâm ở 13000  $\times$  g, 30 phút ở 10°C. Phân tích sự biểu hiện protein bằng SDS-PAGE.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**3.1. Tối ưu hoá codon cho biểu hiện gen il-33 người và thiết kế plasmid tái tổ hợp.** Plasmid tái tổ hợp chứa gen il33 được thiết kế gắn tag gồm 8 $\times$ His-SUMO ở đầu N tận và hai điểm cắt giới hạn cho NdeI và XhoI ở hai đầu (ảnh 1) với trình tự acid amin của SUMO như sau: MSDSEVNQAEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFK IKKTTPLRRLMEAFARQKGEMDSLRFLYDGIIRIQAD QTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG.

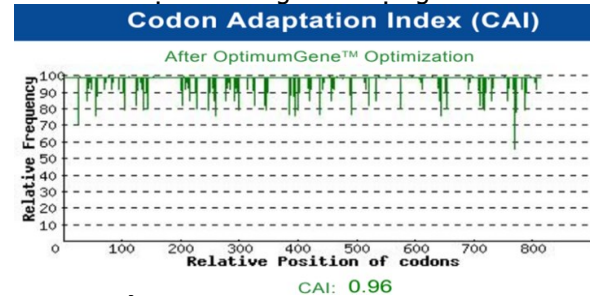


**Ảnh 1: Plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-il-33 mang gen mã hoá cho IL-33 người**

Sau khi tối ưu hóa các codon cho biểu hiện trên *E. coli* bằng phần mềm OptimumGene™ Optimization Analysis cho kết quả như sau:

### Điều chỉnh sai lệch sử dụng codon (Codon usage bias adjustment)

– Chỉ số phù hợp codon (Codon Adaptation Index—CAI) = 0,96. Chỉ số CAI = 1 thể hiện sự biểu hiện hoàn hảo trong vật chủ và CAI > 0,8 là mức biểu hiện tốt trong biểu hiện gen.

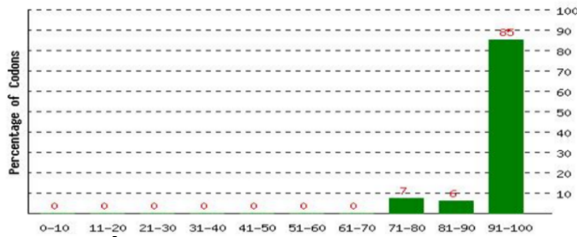


**Ảnh 2: Chỉ số phù hợp codon**

– Tần suất codon tối ưu (Frequency of Optimal Codon—FOP): 71–80%: 07, 81–90%: 06; 91–100%: 85. Lấy acid amin được sử dụng nhiều nhất trong E. coli tương đương 100% để xác định phần trăm các codon đã thiết kế.

**Frequency of Optimal Codons (FOP)**

After OptimumGene™ Optimization

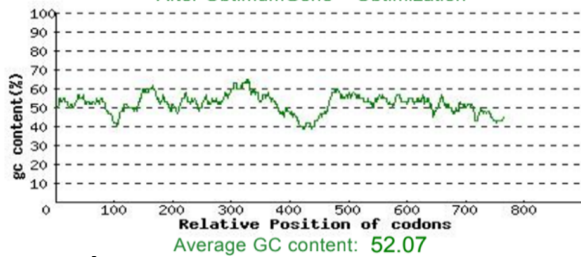


**Ảnh 3: Tần suất codon tối ưu**

**Điều chỉnh hàm lượng GC.** E. coli có hàm lượng GC khoảng 40-60%, do đó kết quả điều chỉnh hàm lượng GC là 52,07% phù hợp cho sự biểu hiện protein trong E. coli.

**GC Content Adjustment**

After OptimumGene™ Optimization



**Ảnh 4: Điều chỉnh hàm lượng GC**

**Enzym cắt giới hạn và yếu tố CIS được tối ưu hóa**

**Bảng 1: Tối ưu hóa enzym cắt giới hạn và yếu tố CIS**

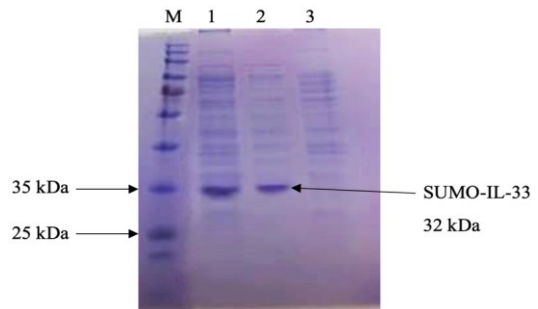
Enzym cắt giới hạn	Tối ưu hóa	Yếu tố CIS	Tối ưu hóa
NdeI (CATATG)	1(1)	E.coli_RBS (AGGAGG)	0
HindIII (AAGCTT)	0	PolyT (TTTTTT)	0
XhoI (CTCGAG)	1(817)	PolyA (AAAAAAA)	0
BamHI (GGATCC)	0	Chi_sites (GCTGGTGG)	0
Polymerase slippage site 1	0	T7Cis (ATCTGTT)	0
Polymerase slippage site 2	0	SD_like (GGRGGT)	0
Frameshift element	0		
Ribosome binding site	0		

Sau khi tối ưu hóa, trình tự lặp lại của gen bao gồm:

- Lặp lại trực tiếp lớn nhất với số lượng là 18 có khoảng cách là 3 và lặp lại 2 lần.
- Lặp lại đảo ngược tối đa: không có.
- Lặp lại Dyad lớn nhất với số lượng là 19, T<sub>m</sub> là 65,7. Vị trí bắt đầu là 7, 10, 9.

**3.2. Tạo dòng E. coli mang plasmid pET-SUMO-il-33 và khảo sát biểu hiện protein tái tổ hợp.**

Vector pET-SUMO-il33 được biến nạp vào tế bào khả nạp E. coli BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Tế bào E. coli mang plasmid pET-SUMO-il33 được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37 °C cảm ứng bằng 0,1 mM IPTG khi OD<sub>600</sub> đạt 0,6 trong khoảng 14-16 giờ. Ly tâm thu tế bào, tán siêu âm và điện di SDS-PAGE. Qua kết quả điện di SDS-PAGE (Ảnh 5) cho thấy protein tổng cộng (giếng 1) có vạch protein to đậm có kích thước khoảng 32 kDa—tương ứng với kích thước protein SUMO-IL-33 và khác biệt so với chứng âm (giếng 3) là mẫu nuôi trong môi trường không chứa chất cảm ứng IPTG, T7 ARN polymerase bị ức chế sẽ không phiên mã gen il33 tái tổ hợp nên vi khuẩn không biểu hiện được SUMO-IL-33. Mặt khác, protein tan (giếng 2) cũng thu được vạch protein có kích thước khoảng 32 kDa. Với kết quả trên, đã tạo dòng thành công chủng vi khuẩn E. coli BL21 (DE3) mang vector plasmid pET-SUMO-il33 có khả năng biểu hiện IL-33 tái tổ hợp với tỷ lệ protein tan khá cao.



**Ảnh 5: Biểu hiện protein ở E. coli BL21(DE3)/pET-SUMO-il33**

M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng khi có mặt IPTG; 2: 1: protein tan khi có mặt IPTG; 3: protein tổng cộng khi chưa cảm ứng bằng IPTG

**IV. BÀN LUẬN**

Hiện nay, hệ thống vector biểu hiện pET được sử dụng rất phổ biến trong việc tạo dòng biểu hiện protein tái tổ hợp ở E. coli [2]. Vector pET chứa T7 promoter là vị trí gắn chuyên biệt

của T7 ARN polymerase và lac operator, có vai trò kiểm soát sự phiên mã, gen kháng kháng sinh, MCS, điểm Ori. T7 ARN polymerase hoạt động có tính chọn lọc, cho phép biểu hiện các gen được chọn ở một mức độ cao nhờ tốc độ phiên mã gấp 5 lần so với tốc độ phiên mã của ARN polymerase của E. coli. Nhóm nghiên cứu thiết kế plasmid pET24 mang gen biểu hiện protein tái tổ hợp theo trình tự sau: 8×His-SUMO tag-gen il33 (Ảnh 1). Trong đó 8×His giúp tinh chế protein tái tổ hợp với sắc ký ái lực cố định ion kim loại (IMAC) như cột Ni-Sepharose và trình tự il33 được tối ưu hoá codon cho biểu hiện trên E. coli từ phần mềm OptimumGene™ Optimization Analysis.

Các đoạn peptid dung hợp được sử dụng để làm tăng khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng protein nhỏ tương tự ubiquitin (SUMO). Ngoài vai trò làm tăng độ ổn định, khả năng hòa tan của protein, việc gắn đuôi dung hợp SUMO ở đầu N còn giúp tăng cường sản xuất protein chức năng trong hệ thống biểu hiện của sinh vật [3]. Một ưu điểm khác nữa đối với tag SUMO là với SUMO protease có khả năng nhận biết dựa vào cấu trúc bậc ba của SUMO dẫn đến sự dung hợp trực tiếp protein tái tổ hợp với đầu C của SUMO, sự cắt chính xác của protease cho phép tạo ra protein tái tổ hợp dạng tự do hoàn chỉnh [4].

## V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tối ưu hoá codon cho biểu

hiện trên E. coli, thiết kế plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-il33 mang gen il33 với codon đã tối ưu hoá dung hợp với SUMO tại đầu N tận. Nghiên cứu cũng đã tạo dòng, biểu hiện thành công chủng E. coli BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp có khả năng tạo SUMO-IL-33 ở dạng tan với tỷ lệ khá cao theo đánh giá bằng kết quả SDS-PAGE. Đây là nền tảng để khảo sát điều kiện nuôi cấy trong quy mô lớn trong các nghiên cứu tiếp theo.

## VI. LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu cảm ơn Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài này thông qua hợp đồng nghiên cứu khoa học số 225/2020/HĐ-ĐHYD ngày 15/10/2020.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chen. W. Y., Tsai. T. H., Yano. J. L., & Li. L. C.** (2018). Therapeutic strategies for targeting IL-33/ST2 signalling for the treatment of inflammatory diseases. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), 349-358.
2. **Mierendorf. R. C., Morris. B. B., Hammer. B., & Novv. R. E.** (2000). Expression and purification of recombinant proteins using the pET system. *The nucleic acid protocols handbook*, 947-977.
3. **Panavas, T., Sanders, C., & Butt, T. R.** (2009). SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *SUMO protocols*, 303-317.
4. **Marblestone J. G., Edavettal S. C., Lim Y. et al.** (2006), "Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO", *Protein Science*. 15(1), pp. 182-189.

# NỘI SOI TÁN SỎI ĐƯỜNG MẬT XUYÊN GAN QUA DA BẰNG LASER HOLMIUM Ở BỆNH NHÂN 101 TUỔI: BÁO CÁO CA LÂM SÀNG

Lương Thành Đạt<sup>1</sup>, Nguyễn Thành Đạt<sup>1</sup>, Trần Quang Lộc<sup>2,3</sup>, Tạ Xuân Trường<sup>1</sup>, Nguyễn Sinh Cung<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Tùng<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Báo cáo trường hợp bệnh nhân 101 tuổi nhiễm trùng đường mật do sỏi trong gan và sỏi ống mật chủ. Trên phim cắt lớp vi tính cho thấy sỏi đường mật đúc khuôn lấp kín đường mật nhánh phân thùy sau, một phần phần thùy trước và sỏi trong ống mật chủ. Bệnh

nhân được nội soi tán sỏi xuyên gan qua da bằng laser holmium. Sau tán sỏi, chụp đường mật không thấy sỏi còn sót lại. Bệnh nhân có biểu hiện cải thiện lâm sàng và được xuất viện sau 7 ngày nằm viện. Qua ca lâm sàng này cho thấy tính hiệu quả và an toàn của phương pháp tán sỏi xuyên gan qua da ở bệnh nhân lớn tuổi. **Từ khóa:** Tán sỏi qua da, Laser Holmium, Sỏi đường mật.

## SUMMARY

### PERCUTANEOUS TRANSHEPATIC CHOLANGIOSCOPIC WITH HOLMIUM LASER LITHOTRIPSY IN A 101-YEAR-OLD PATIENT: CLINICAL CASE REPORT

Case report of a 101 year old patient with biliary tract infection due to intrahepatic stones and common

<sup>1</sup>Bệnh viện Đa khoa Nông Nghiệp

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>3</sup>Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức

Chịu trách nhiệm chính: Lương Thành Đạt

Email: drdatbvnn@gmail.com

Ngày nhận bài: 7.2.2024

Ngày phản biện khoa học: 21.3.2024

Ngày duyệt bài: 24.4.2024