

**ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ GEN PSI BETA AND DELTA GLOBIN
LOÀI THẬN KHỈ XANH CHÂU PHI (*Cercopithecus aethiops*) NHẬN DẠNG ĐẶC
HIỆU DÒNG TẾ BÀO VERO 76 QUA CÁC ĐÒI CÂY CHUYỀN**

Phạm Văn Hùng¹, Trương Quốc Phong²

¹ Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

² Viện công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại Học Bách khoa Hà Nội

Tóm tắt

Ngân hàng tế bào Vero 76 gốc giống (Master Cell Bank) và ngân hàng tế bào Vero 76 làm việc (Working Cell Bank) được nhận dạng đặc hiệu qua các đời cấy chuyển bằng phương pháp giải trình tự gen đích psi beta and delta globin của dòng tế bào vero 76 thận khỉ xanh Châu phi (*Cercopithecus aethiops*) để nhận dạng và đánh giá sự ổn định về di truyền của ngân hàng tế bào Vero 76 gốc giống (MCB) và ngân hàng tế bào làm việc (WCB) được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường nuôi cấy. Kết quả giải trình tự và so sánh để xác định các điểm sai khác giữa các mẫu tế bào ở các thế hệ cấy chuyển so với dòng tế bào gốc ban đầu trên ngân hàng dữ liệu Gen bank (NCBI). Kết quả đánh giá cho thấy các dòng tế bào ở các thế hệ cấy chuyển không có sự khác biệt nhau và so với dòng tế bào gốc, điều này khẳng định có sự ổn định về mặt di truyền của các dòng tế bào trong quá trình cấy chuyển thiết lập ngân hàng.

Từ khóa: Gen psi beta and delta globin, Nhận dạng tế bào, Giải trình tự gen, Vero76.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dòng tế bào thận Khỉ xanh châu Phi *Cercopithecus aethiops* (dòng tế bào Vero76) được chứng minh phù hợp trong nghiên cứu sinh học như khuếch đại virus, phát triển vắc-xin và các xét nghiệm gây độc tế bào. Tuy nhiên, việc nuôi cấy dòng tế bào qua nhiều thế hệ có thể dẫn đến sự biến đổi của các dòng tế bào sau nhiều lần cấy chuyển so với tế bào gốc ban đầu. Việc này sẽ dẫn đến những sai lệch trong kết quả nghiên cứu có sử dụng các dòng tế bào đã biến đổi. Vì vậy, cần định kỳ nhận dạng và đánh giá sự ổn định về mặt di truyền của các dòng tế bào nuôi cấy sau những lần cấy chuyển để đảm bảo vật liệu tế bào sử dụng là ổn định về di truyền. Trong các nghiên cứu gần đây, việc nhận dạng các dòng tế bào sử dụng phương pháp khuếch đại và giải trình tự các vùng gen đặc hiệu (Sequencing) đang trở thành một phương pháp đơn giản, nhanh, đặc hiệu và hiệu quả được dùng phổ biến [4],[5].

Một số khảo sát gần đây về chất lượng dòng tế bào cho thấy dòng tế bào bị thoái hóa, đột biến và dẫn đến sai khác là phổ biến và rất đáng quan tâm trong quá trình cấy chuyển qua các thế hệ [5], [6], [7], [9], [11]. Các nguyên nhân phổ biến nhất của việc tế bào bị sai khác bao gồm dán nhãn sai, nhiễm bẩn các dòng tế bào trong quá trình nuôi và cấy chuyển. Nguy cơ gặp một dòng tế bào sai khác với nguồn gốc ban đầu được ước tính là 1:6 [1],[2]. Để phát hiện sự biến đổi và sai khác của dòng tế bào được phát hiện thông qua phương pháp nuôi cấy và quan sát hình thái, hay nhận dạng bằng các phương pháp khác nhau. Nhận dạng tế bào được định nghĩa ở đây là các thử nghiệm được thực hiện để xác nhận danh tính của một dòng tế bào, chứng minh rằng nó có nguồn gốc chính xác từ dòng tế bào gốc ban đầu [17]. Các công cụ để nhận dạng các dòng tế bào rất quan trọng để kiểm soát chất lượng trong các

nghiên cứu sử dụng thiết lập ngân hàng tế bào, cấy chuyển để lưu trữ, sử dụng tế bào trong nghiên cứu y sinh học [3],[4],[8]. Hiện tại phương pháp để nhận dạng đặc hiệu các dòng tế bào bằng phương pháp giải trình tự các đoạn gen (nucleotide) hoặc protein, amino acide... đã được sử dụng thành công [10].

Các tế bào Vero phân lập từ thận của Khỉ xanh châu Phi (*Cercopithecus aethiops*) năm 1962 thường được sử dụng cho nuôi cấy vi rút để nghiên cứu và phát triển thuốc/vắc xin/sinh phẩm và xét nghiệm gây độc tế bào [12],[15]. Kết quả nghiên cứu cho thấy con người và Khỉ xanh châu Phi có sự tương đồng cao tại các vùng gen điều này cho phép sử dụng các chỉ thị ở con người để nhận dạng đối với Khỉ xanh châu Phi [16],[17]. Gần đây, việc sử dụng các vùng gen đặc hiệu như psi beta and delta globin để nhận dạng dòng tế bào người [10].

Thông qua việc đánh giá sự tương đồng về trình tự nucleotide của vùng gen psi beta and delta globin để chứng minh sự ổn định di truyền và không có sự đột biến/thay đổi trình tự nucleotide giữa các lần cấy chuyển trong việc bảo quản, thiết lập ra các ngân hàng tế bào Vero 76 gốc giống (MCB) và ngân hàng tế bào Vero 76 làm việc (WCB).

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Ngân hàng tế bào Vero 76 gốc giống (MCB) và ngân hàng tế bào Vero 76 làm việc (WCB) được thiết lập từ chuẩn tế bào Vero 76 ATCC CRL-1587TM được nuôi cấy và sản xuất tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

2.2. Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại Viện kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế (NICVB), Bộ Y tế.

Thời gian: từ tháng 3 đến tháng 8 năm 2021

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Ngân hàng tế bào Vero 76 (MCB, WCB) được thu nhận, tách chiết và tinh sạch DNA tổng số bằng bộ kit GeneJET gel extraction kit - Thermo Fisher Scientific, Mỹ. Sản phẩm DNA tổng số được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%.

Trình tự primer sử dụng cho PCR được thiết kế gen đích psi beta and delta globin của loài khỉ xanh châu phi (*Cercopithecus aethiops*) được công bố trên ngân hàng dữ liệu Genbank (NCBI) mã số: AF 057392.1 [1] cho phép khuếch đại đoạn DNA kích thước 307 bp với trình tự môi (F: 5'-CAGCACTTTAGGAGGCCAAG-3' và R: 5'-GGCTTGCATTGAGAGTGTTG-3') với thành phần phản ứng PCR và chu trình nhiệt như sau:

Thành phần phản ứng:

1.	Đệm phản ứng, 10X	: 2,5 µl
2.	dNTP, 5mM	: 2,0 µl
3.	MgCl ₂ , 25 mM	: 1,6 µl
4.	Môi xuôi/ngược, 5 µM	: 2,0 µl
5.	DNA khuôn	: 1 µl
6.	DNA Taq polymerase	: 0,3 µl
7.	H ₂ O	: 15,6 µl
	Tổng	: 25 µl

Chu trình nhiệt:

1. 95°C – 5 phút
2. 95°C – 45 giây
3. 61°C – 45 giây
4. 72°C – 60 giây
5. Lặp lại bước 2-4, 30 chu kỳ
6. 72°C – 5 phút

Sản phẩm PCR khuếch đại của các mẫu Vero 76 MCB và WCB được giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp trên máy giải trình tự tự động ABI 3500 Bio System (Mỹ) theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả (1977).

Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR khuếch đại gen psi beta and delta globin từ các mẫu Vero 76 MCB và WCB được so sánh với trình tự nucleotide của mẫu chuẩn trên ngân hàng dữ liệu Genbank bằng công cụ MultAlin sau đó kiểm tra tính tương đồng về trình tự nucleotide (Blast) với trình tự gen của dòng tế bào Vero 76 MCB và WCB trên ngân hàng dữ liệu genbank (NCBI) để xác định các biến đổi gen qua các mẫu tế bào vero 76 MCB và WCB khác nhau.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số**

Kết quả tách chiết DNA tổng số và kiểm tra độ tinh sạch của DNA chứa hai mẫu tế bào vero 76 MCB và WCB được nồng độ lần lượt là 450,7 ng/μl và 400,9 ng/μl. Độ tinh sạch DNA tổng số của hai mẫu tế bào vero 76 MCB và WCB được kiểm tra thông qua tỷ lệ OD260/OD280 và OD260/OD230 thu được kết quả là khoảng 1,87-1,98 (bảng 1) và hình 1.

Bảng 1. Nồng độ và độ sạch của DNA tổng số mẫu tế bào Vero 76 MCB và WCB

TT	Mẫu	Nồng độ (ng/μl)	OD260/OD280	OD260/OD230
1	Vero 76 MCB	450,7	1,96	1,87
2	Vero 76 WCB	400,9	1,90	1,98

Vero 76 MCB Vero 76 WCB

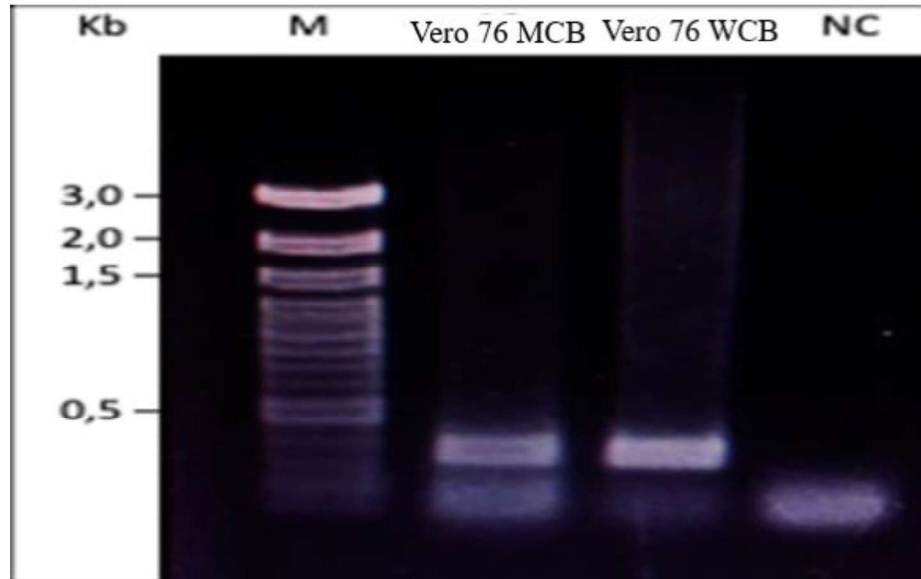


Hình 1. Phổ điện di DNA tổng số của hai mẫu Vero 76 MCB và WCB

Kết quả bảng 1 và hình 1 cho thấy kết quả nồng độ DNA tổng số thu được của hai mẫu Vero 76 MCB và WCB đảm bảo chất lượng để đưa vào chạy PCR khuếch đại gen đích psi beta and delta globin và giải trình tự để so sánh tính tương đồng trình tự nucleotide của Vero 76 MCB và WCB với mẫu chuẩn đã công bố trên ngân hàng dữ liệu Genbank.

3.2. Kết quả khuếch đại gen đích psi beta and delta globin bằng phương pháp PCR

Kết quả khuếch đại vùng gen đích psi beta and delta globin với cặp mồi đã thiết kế với kích thước 307bp cho kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy xuất hiện 1 băng DNA đặc hiệu khoảng 300bp đối với hai mẫu Vero 76 MCB và WCB, không thấy có sự xuất hiện băng DNA đối với mẫu chứng âm (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR mẫu tế bào Vero 76

M: Marker 100bp

Vero 76 MCB: Mẫu vero 76 ngân hàng tế bào gốc giống

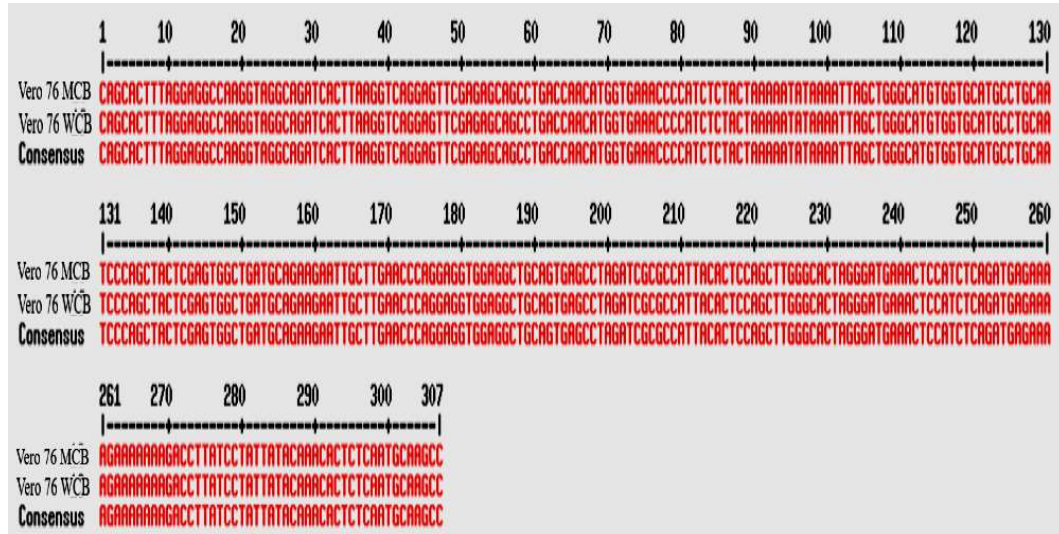
Vero 76 WCB: mẫu ngân hàng tế bào làm việc

NC: Mẫu chứng âm H₂O

Với kết quả hình 2 cho thấy kích thước băng DNA của hai mẫu Vero 76 MCB và WCB thu được là phù hợp với thiết kế lý thuyết của cặp mồi đã thiết kế để khuếch vùng gen psi beta and delta globin. Kết quả này đã chứng minh khuếch đại thành công đoạn gen đích và thu được sản phẩm DNA của hai mẫu tế bào Vero 76 MCB và WCB để phục vụ cho việc tinh sạch dung cho giải trình tự gen.

3.3. Kết quả giải trình tự gen đích

Giải trình tự gen đích psi beta and delta globin trực tiếp trên máy giải trình tự tự động ABI 3500 theo phương pháp Sanger của Hãng Firrstbase, Malaysia. Kết quả giải trình tự của các đoạn gen được so sánh bằng công cụ MultAlin (Hình 3).



Hình 3. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen psi beta and delta globin của hai mẫu tế bào Vero76 MCB và Vero 76 WCM.

Từ kết quả hình 3 cho thấy trình tự nucleotide thu được sau khi giải trình tự được so sánh với đoạn gen chuẩn trên ngân hàng dữ liệu Genbank mã số AF: 057392.1 (NCBI) có sự tương đồng. Sau đó tiếp tục được nhận diện tính đồng nhất trình tự nucleotide được Blast lên ngân hàng dữ liệu Genbank, NCBI cho thấy trình tự nucleotide gen đích psi beta và delta globin của hai mẫu ngân hàng tế bào Vero76 MCB và Vero 76 WCM chính xác là loài thận khỉ xanh châu phi (*Cercopithecus aethiops*) phù hợp với thiết kế lý thuyết nghiên cứu cần đặt ra (hình 4).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cercopithecus aethiops intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	562	562	100%	3e-156	99.67%	AF057392.1
<input checked="" type="checkbox"/> Allenoithicus nigroviridis intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	545	545	100%	3e-151	98.70%	AF057394.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lophocebus atermimus isolate G138 intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	523	523	100%	2e-144	97.39%	AF057404.1
<input checked="" type="checkbox"/> Theropithecus gelada intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	523	523	100%	2e-144	97.39%	AF057403.1
<input checked="" type="checkbox"/> Papio sp. intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	523	523	100%	2e-144	97.39%	AF057402.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mandrillus sphinx intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	523	523	100%	2e-144	97.39%	AF057400.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhesus monkey beta- and delta-globin gene intergenic region with 2 Alu repeats	523	523	100%	2e-144	97.39%	M18797.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhesus monkey psi-eta-globin gene intergenic region, with Alu repeats	523	523	100%	2e-144	97.39%	J03818.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lophocebus albigena albigena isolate Saki intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	520	520	100%	2e-143	97.07%	AF057407.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lophocebus albigena albigena isolate Sylvain intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	520	520	100%	2e-143	97.07%	AF057406.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cercopithecus mitis intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	520	520	98%	2e-143	97.67%	AF057393.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cercocobus torquatus atys isolate M926 intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	518	518	100%	7e-143	97.07%	AF057398.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cercocobus galeritus chrysoqaster isolate Heine intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	512	512	100%	3e-141	96.74%	AF057396.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cercocobus galeritus chrysoqaster isolate Dutch intergenic region between psi beta and delta globin genes, partial sequence	508	508	100%	4e-140	96.42%	AF057397.1

Hình 4. Kết quả Blast trình tự gen psi beta và delta globin hai mẫu ngân hàng tế bào Vero76 MCB và Vero 76 WCM trên dữ liệu ngân hàng Genbank, NCBI.

Từ kết quả thể hiện ở hình 4 đã chứng minh tính ổn định và đồng nhất của ngân hàng tế bào Vero76 MCB và Vero 76 WCM ổn định và tương đồng qua các thế hệ cấy chuyển nhiều lần trong quá trình nuôi cấy và sản xuất ngân hàng tế bào Vero76 MCB và Vero 76 WCM và chất lượng của các dòng tế bào là hoàn toàn ổn định. Các kết quả thu được cũng tương đồng với các kết quả của các nghiên cứu trước [11], [16] cũng gợi ý rằng có thể sử dụng phương

pháp khuếch đại và giải trình tự vùng gen psi beta và delta globin trong việc đánh giá nhận dạng đặc hiệu các dòng nuôi cấy và cấy chuyển dòng tế bào Vero 76 nói chung và các dòng tế bào Vero khác phục vụ nghiên cứu và sản xuất thuốc sinh phẩm [15].

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế mỗi đặc hiệu (Primer) để khuếch đại và giải trình tự vùng gen psi beta và delta globin của loài trên các dòng tế bào Vero76 được cấy chuyển nhiều lần. Kết quả phân tích trình tự cho thấy trình tự của các dòng tế bào ở các thế hệ không có sự thay đổi chứng tỏ các dòng tế bào là hoàn toàn ổn định về di truyền sau nhiều lần cấy truyền. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có thể sử dụng phương pháp giải trình tự vùng gen psi beta và delta globin đặc hiệu của loài thận khỉ xanh châu phi (*Cercopithecus aethiops*) trong việc nhận dạng đặc hiệu các dòng tế bào Vero76.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ của Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Almeida JL, Hill CR, Cole KD (2011) Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. *BMC Biotechnol* 11: 102.
2. Broberg, E.K.; Nygårdas, M.; Salmi, A.A.; Hukkanen, V. Low copy number detection of herpes simplex virus type 1 mRNA and mouse Th1type cytokine mRNAs by Light Cycler quantitative real-time PCR. *J. Virol. Methods*, 2003, 112(1-2), 53-65.
[[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00191-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00191-5)] [PMID: 12951213]
3. Barallon R, Bauer S, Buter J, Capes-Davis A, Dirks W, Elmore E, Furtado M, Kline M, Kohara A, Los G, et al: (2010) Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol* 46: 727–732. [<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0>]
4. Barrett P, Berezuk G, Fritsch S, Aichinger G, Hart M, El-Amin W, Kistner O, Ehrlich H (2011) Efficacy, safety, and immunogenicity of a vero-cell-culture derived trivalent influenza vaccine: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 377(9767): 751–759.
5. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler H, Kohara A, MacLeod R, Masters J, Nakamura Y, Reid Y, Reddel R, et al: (2010) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* 127: 1–8.
6. Chatterjee R (2007) Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science* 315: 928–931.
7. Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RA, et al., (2017) False and mycoplasma-contaminated leukemia-lymphoma cell lines: time for a reappraisal. *Int J Cancer* 140(5): 1209–1214.
8. Frazatti-Gallina, N.M.; Mourão-Fuches, R.M.; Paoli, R.L.; Silva, M.L.; Miyaki, C.; Valentini, E.J.; Raw, I.; Higashi, H.G. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*, 2004, 23(4), 511-517. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.06.014>] [PMID: 15530700]

9. Halter M, Almeida J, Tona A, Elliott J, Plant A, Cole K (2009) A mechanistically relevant cytotoxicity assay based on the detection of cellular green fluorescent protein. *ASSAY and Drug Development Technologies* 7(4): 356–365.

10. Janeth del Carmen Arias Palacios, Carlos Alberto Barrero Barreto, José Salvador Montaña Lara and Ángela María Londoño Navas¹ (2017) Standardization of DNA Residual Quantification Method of Vero Cell Rabies Vaccine for Human Use. *Open Medicinal Chemistry Journal*, 2017, 11, 66-80

11. Lovatt, A. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *J. Biotechnol.*, 2002,82(3), 279-300.[PMID: 11999695]

12. Lokteff, M.; Klinguer-Hamour, C.; Julien, E.; Picot, D.; Lannes, L.; Nguyen, T.; Bonnefoy, J.Y.; Beck, A. Residual DNA quantification in clinical batches of BBG2Na, a recombinant subunit vaccine against human respiratory syncytial virus. *Biologicals*, 2001, 29(2), 123-132. [<http://dx.doi.org/10.1006/biol.2001.0283>] [PMID: 11580216]

13. Lorenzi P, Reinhold W, Varma S, Hutchinson A, Pommier Y, Chanock S, Weinstein J (2009) DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther* 8(4): 713–724.

14. Lucey B, Nelson-Rees W, Hutchins G (2009) Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med* 133: 1463–1467.

15. Muniappan, B.; Thilly, W. PCR assay to detect Vero cell DNA in vaccines; Center for Environmental Health Sciences and Division of Toxicology.: MIT. Cambridge, MA, USA, 1996.

16. Meuer, S.; Wittwer, C.; Nakagawara, K.; Wittwer, K.; Hahn, M.; Kaul, K. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications; Springer Press: Heidelberg, 2001, pp. 21-34.2. [<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0>]

17. Nims RW, Reid Y (2017) Best practices for authenticating cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 53(10): 880–887.

Abstract

APPLYING SEQUENCING METHOD OF PSI BETA AND DELTA GLOBIN GENES OF SPECIES AFRICAN GREEN MONKEY KIDNEY (CERCOPITHECUS AETHIOPS) FOR SPECIFIC IDENTIFICATION VERO 76 CELL LINE ACROSS GENERATIONS CULTURES

Pham Van Hung¹, Truong Quoc Phong²

¹National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

² Institute of Biotechnology and Food Technology, Bach Khoa University Hanoi

Vero 76 Master Cell Bank and Vero 76 Working Cell bank were specifically identified by used the psi beta and delta globin target gene sequencing method of the vero 76 African green monkey kidney (Cercopithecus aethiops) cell line to identify and evaluate the genetic stability of the Vero 76 Master Cell Bank (MCB) and Working cell bank (WCB) were cultured several times on culture medium. The results of sequencing and comparison to determine the difference between the cell samples in the transfected generations compared with the original Vero cell line reference on the Genbank database (NCBI). The evaluation results showed that the cell lines in the transfected generations did not differ from each other and compared with the vero cell line reference on the Genbank database (NCBI), this confirmed the genetic stability of the cell lines during the process establish and transfer the Vero 76 bank of MCB and WCB.

Keywords: Gene psi beta and delta globin, Identification, Sequencing, Vero76 MCB&WCB.

Cán bộ phản biện

PGS.TS. Cao Bá Lợi

Ngày nhận bài: 18/04/2022

Ngày gửi phản biện: 21/04/2022

Ngày đăng bài: 05/05/2022