

Nhân dòng, biểu hiện và nghiên cứu một số tính chất của protease từ HIV-1 tại Việt Nam

Nguyễn Thị Hồng Loan

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Luận án Tiến sĩ ngành: Hóa sinh học; Mã số: 62.42.30.15

Người hướng dẫn: PGS.TS Phan Tuấn Nghĩa, TS. Nguyễn Thị Vân Anh

Năm bảo vệ: 2011

Abstract: Tinh sạch RNA của HIV-1 và tổng hợp cDNA của một số mẫu HIV-1 từ các bệnh nhân nhiễm HIV-1 tại Việt Nam. Nhân bản, nhân dòng và đọc trình tự gen mã hóa protease HIV-1 của các mẫu virus phân lập được, đánh giá sự sai khác về trình tự gen mã hóa protease HIV-1 giữa các đối tượng bệnh nhân nhiễm HIV-1 so với trình tự gen tương ứng trên thế giới. Thiết kế hệ thống vector và xác định điều kiện biểu hiện gen mã hóa cho protease HIV-1 ở E. coli. Xây dựng quy trình tinh sạch protease HIV-1 tái tổ hợp. Nghiên cứu một số đặc trưng xúc tác của protease HIV-1 tái tổ hợp thu được. Tìm hiểu tác dụng ức chế của một số hợp chất tổng hợp và tự nhiên lên protease HIV-1 tái tổ hợp.

Keywords: Hóa sinh học; Sinh học thực nghiệm; HIV; Gen mã hóa protease; Việt Nam

Content

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Protease của virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV-1) cần thiết cho chu trình sống của virus và được xem như một trong các đích quan trọng nhất trong liệu pháp điều trị chống HIV/AIDS. Các đột biến trong trình tự gen mã hóa protease của HIV-1 (gọi tắt là protease HIV-1) có thể hình thành các chủng virus không có khả năng lây nhiễm bệnh. Chính vì vậy, protease HIV-1 được xem là một trong các đích chính cho việc nghiên cứu phát triển thuốc điều trị HIV/AIDS. Tuy nhiên, HIV sao chép nhanh, nhiều đột biến xuất hiện tạo ra các nhóm HIV mới trong đó cả các dạng kháng thuốc điều trị HIV-1. Do đó, tạo ra và tinh sạch lượng lớn protease là cần thiết cho lựa chọn các chất ức chế protease mới để nâng cao hiệu quả điều trị HIV-1/AIDS.

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu sản xuất protease HIV-1 (Darke và tập thể, 1989; Danley và tập thể, 1989; Dergousova và tập thể, 1996; Rozzelle và tập thể, 2000; Ohtaka và tập thể, 2003; Yanchunas và tập thể, 2005; Bandaranayake và tập thể, 2008) nhưng thực tế cho thấy việc biểu hiện và thu nhận protease HIV-1 không dễ dàng do đặc tính gây độc tế bào, khó tan của nó. Mặt khác, các nghiên cứu đều sản xuất protease HIV-1 phân lập từ phân nhóm B là phân nhóm HIV phổ biến gây bệnh ở Mỹ, Australia và các nước Tây

Âu. Chính vì vậy, thiết lập hệ thống biểu hiện và tinh sạch protease HIV-1 tái tổ hợp hiệu quả và đại diện cho phân nhóm HIV-1 gây bệnh chủ yếu ở Việt Nam là cơ sở để phát triển các thuốc ức chế protease phù hợp cho bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS thuộc phân nhóm này.

Ở Việt Nam, hầu hết các nghiên cứu về protease HIV-1 tập trung vào xác định nhóm virus gây bệnh chủ yếu ở người Việt Nam và tìm ra một số đột biến liên quan kháng thuốc. Tuy vậy, chưa có nghiên cứu nào về biểu hiện và xác định tính chất của protease HIV-1 phân lập từ các bệnh nhân người Việt Nam.

Đề tài luận án của chúng tôi được đặt ra nhằm giải quyết một số tồn tại vừa nêu.

2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

- Phát hiện một số đột biến trong gen mã hóa protease HIV-1 ở người Việt Nam.
- Thiết lập quy trình hiệu quả cho việc biểu hiện gen mã hóa protease HIV-1 ở vi khuẩn *E. coli* và tinh sạch protease HIV-1 tái tổ hợp ở dạng có hoạt tính.
- Nghiên cứu một số tính chất protease HIV-1 và tìm hiểu tác dụng của một số chất ức chế làm cơ sở để tìm kiếm và phát triển các PI mới có thể ứng dụng trong điều trị bệnh nhân HIV/AIDS.

3. Nội dung nghiên cứu của đề tài

- Tinh sạch RNA và tổng hợp cDNA của một số mẫu HIV-1 từ các bệnh nhân nhiễm HIV-1 tại Việt Nam.
- Nhân bản, nhân dòng và đọc trình tự gen mã hóa protease HIV-1 của các mẫu virus phân lập được, đánh giá sự sai khác về trình tự gen mã hóa protease HIV-1 giữa các đối tượng bệnh nhân nhiễm HIV-1 so với trình tự gen tương ứng trên thế giới.
- Thiết kế hệ thống vector và xác định điều kiện biểu hiện gen mã hóa cho protease HIV-1 ở *E. coli*.
- Xây dựng quy trình tinh sạch protease HIV-1 tái tổ hợp.
- Nghiên cứu một số đặc trưng xúc tác của protease tái tổ hợp thu được.
- Tìm hiểu tác dụng ức chế của một số hợp chất tổng hợp và tự nhiên lên protease HIV-1 tái tổ hợp.

4. Đóng góp mới của đề tài

- Công trình nghiên cứu có tính hệ thống từ việc nhân bản, nhân dòng và biểu hiện ở *E. coli* gen mã hóa protease HIV-1 tái tổ hợp thuộc chủng CRF01_AE của Việt Nam; thiết lập được phương pháp đơn giản để tinh sạch protease HIV-1 với hiệu suất thu nhận enzyme cao hơn so với các nghiên cứu trên thế giới.
- Là công trình đầu tiên phát hiện thấy tác dụng ức chế protease HIV-1 bởi axit asiatic, 8-hydroxyquinoline và menadione.

5. Ứng dụng thực tiễn của đề tài

- Cách thức biểu hiện gen mã hóa protease HIV-1 và tinh sạch protease tái tổ hợp tạo ra trong công trình nghiên cứu này có thể dễ dàng được áp dụng để sản xuất một số protease tái tổ hợp khó tan và chỉ đặc hiệu với một số cơ chất nhất định.

- Chế phẩm protease HIV-1 tạo ra là cơ sở cho việc tìm kiếm và phát triển các PI mới để có thể ứng dụng trong điều trị bệnh nhân HIV/AIDS.

6. Bố cục của luận án

Luận án gồm 124 trang bao gồm: Phần mở đầu 4 trang; chương 1 - tổng quan tài liệu 39 trang; chương 2 - đối tượng và phương pháp nghiên cứu 16 trang; chương 3 - kết quả và thảo luận 50 trang, kết luận và kiến nghị 1 trang. Các công trình khoa học của tác giả liên quan đến luận án 1 trang. Tài liệu tham khảo 13 trang gồm 107 tài liệu bao gồm 2 thứ tiếng (4 tài liệu tiếng Việt và 103 tài liệu tiếng Anh). Trong luận án có 7 bảng, 41 hình và đồ thị.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. HIV-1 nguyên nhân của AIDS

Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS) gây ra bởi virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV). Đây là virus thuộc họ Retroviridae và có hai type chính là HIV-1 và HIV-2, trong đó type 1 xuất hiện phổ biến và là nguyên nhân chính gây ra AIDS ở người. Cho đến nay, dù đã có những chương trình hành động toàn cầu cùng với sự phát triển của các phương pháp điều trị, AIDS vẫn là đại dịch của toàn nhân loại. Chính vì vậy, các biện pháp phòng ngừa, điều trị hiệu quả bệnh AIDS vẫn mang tính cấp thiết cao.

1.2. Các nghiên cứu về protease HIV-1

Protease HIV-1 được mã hóa bởi gen *pol* trong hệ gen của HIV-1; là một homodimer mỗi monomer có khối lượng 11 kDa gồm 99 axit amin. Đây là một protease aspartyl, họ retropepsin A2, được tạo ra trong quá trình HIV nhiễm vào tế bào chủ, có chức năng thủy phân các polypeptide gag, gag-pol và env của virus thành các protein cấu trúc và chức năng cần thiết cho chu trình sống của HIV. Nếu protease bị mất hoạt tính, HIV-1 sẽ không được đóng gói để tạo thành virus hoàn chỉnh (Darke và tập thể, 1989; Tie, 2006). Vì vậy, chất ức chế protease HIV-1 có vai trò quan trọng trong điều trị bệnh nhân HIV/AIDS. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc trong thời gian dài với nồng độ cao cùng với tốc độ đột biến lớn của HIV-1 dẫn đến sự xuất hiện các chủng virus kháng thuốc là một trong những nguyên nhân chính gây thất bại điều trị. Chính vì vậy, thiết lập hệ thống biểu hiện và tinh sạch protease HIV-1 tái tổ hợp là rất cần thiết để điều tra và phát triển các thuốc ức chế protease (PI) mới hiệu quả.

Hiện nay, thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu để sản xuất protease HIV-1 bằng cách biểu hiện trên vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) hoặc *Saccharomyces cerevisiae* hoặc bằng cách tổng hợp hóa học monomer 99 axit amin. Tuy nhiên, việc sản xuất protease HIV-1 thường gặp nhiều khó khăn trong việc biểu hiện và tinh sạch (Darke và tập thể, 1989; Danley và tập thể, 1989; Taylor và tập thể, 1992; Dergousova và tập thể, 1996; Komai và tập thể, 1997; Bandaranayake và tập thể, 2008). Nguyên nhân là do protease gây độc với tế bào chủ, khó tan, hàm lượng thu được chưa cao, một số nghiên cứu chỉ có thể phát hiện bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch. Protease HIV-1 thường được biểu hiện ở dạng tự cắt khỏi trình tự cắt đặc hiệu Phe/Tyr – Pro để giải phóng protease mở đầu bằng axit amin Pro và chỉ có hoạt

tính khi ở dạng dimer (Debouck và tập thể, 1987; Graves và tập thể, 1988; Danley và tập thể, 1989; Taylor và tập thể, 1992; Mildner và tập thể, 1994).

Gần đây, do nhiều dẫn liệu kháng thuốc PI có được đều từ HIV-1 thuộc phân nhóm B (có chủ yếu ở Mỹ, Australia, Tây Âu và đã từng được nghiên cứu nhiều nhất) nên các nhà nghiên cứu đã mở rộng quan tâm phát hiện các đột biến liên quan đến mức độ kháng thuốc PI ở các phân nhóm khác (có chủ yếu trên thế giới) nhằm nâng cao hiệu quả điều trị kháng thuốc ở các bệnh nhân nhiễm HIV-1 thuộc các phân nhóm này (Ariyoshi và tập thể, 2003; Abecasis và tập thể, 2005; Kantor và tập thể, 2005; Bandaranayake và tập thể, 2008). Số liệu từ các nghiên cứu đã cho thấy kiểu gen kháng thuốc ở phân nhóm B không phải luôn luôn có thể áp dụng cho các phân nhóm khác.

Ở Việt Nam, protease HIV-1 còn ít được nghiên cứu. Các nghiên cứu về protease HIV-1 chỉ tập trung vào xác định nhóm virus gây bệnh chủ yếu ở người Việt Nam và tìm ra một số đột biến liên quan kháng thuốc (Nguyen và tập thể, 2003; Ishizaki và tập thể, 2009; Liao và tập thể, 2009; Phan và tập thể, 2010). Đặc biệt, chưa có công bố nào về biểu hiện, tinh sạch và nghiên cứu tính chất của protease HIV-1 phân lập từ các bệnh nhân nhiễm HIV-1 ở Việt Nam.

Bên cạnh đó, các đột biến kháng PI tương đối đặc hiệu cho từng loại thuốc riêng biệt, do đó thay thế một loại thuốc khác trước khi có sự tích lũy đột biến thì các phác đồ sau vẫn thành công (Hoffmann và tập thể, 2007). Vì vậy, xét nghiệm kháng thuốc thường theo hướng phát hiện đột biến gen mã hóa protease HIV-1 bằng cách xác định trình tự của gen có vai trò rất quan trọng trong việc xây dựng phác đồ điều trị HIV/AIDS.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và nguyên liệu

2.1.1. Đối tượng

Gen mã hóa protease HIV-1 từ huyết thanh các bệnh nhân nhiễm HIV-1 tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương.

2.1.2. Nguyên liệu

Các môi hay oligonucleotide của Invitrogen (Mỹ), enzyme giới hạn và Taq DNA polymerase của New England Biolabs (NEB) (Mỹ) hoặc Enzymomics (Hàn Quốc), các vector nhân dòng và biểu hiện gen của Promega, Invitrogen và Novagene (Mỹ), kit phân tích hoạt độ protease HIV-1 và protease HIV-1 tái tổ hợp của Anaspec (Mỹ), kháng thể đơn dòng kháng protease HIV-1 của Gentex (Mỹ). Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết cho nghiên cứu sinh học phân tử.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết RNA của virus theo kit của Qiagen

2.2.2. Tách chiết và định lượng DNA plasmid theo Sambrook và Russel (2001)

2.2.3. Định lượng protein theo phương pháp của Bradford (1976) và đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 280 nm

2.2.4. Nhân bản gen mã hóa protease HIV-1 bằng kỹ thuật RT-PCR

2.2.5. Kiểm tra kích thước DNA, sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose

2.2.6. Nhân dòng trực tiếp sản phẩm PCR vào vector đầu T sử dụng kit nhân dòng T/A hoặc pGEM-T

2.2.7. Giải trình tự các đoạn gen mã hóa protease HIV-1 trên máy tự động CEQ 8000 theo nguyên lý của Sanger và tập thể (1975)

2.2.8. Thiết kế hệ thống vector biểu hiện bằng cắt gen nhân dòng bằng enzyme giới hạn, nối gen vào vector biểu hiện bằng T4 DNA ligase và kiểm tra biểu hiện gen trong *E. coli*.

2.2.9. Tinh sạch protease HIV-1 bằng hệ thống cột sắc ký ái lực His-bind kết nối với cột mono Q-sepharose

2.2.10. Đánh giá độ tinh sạch của protein bằng điện di protein trên gel polyacrylamide có SDS (SDS-PAGE)

2.2.11. Nhận biết protease HIV-1 tái tổ hợp bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch (Western blotting) sử dụng kháng thể đơn dòng kháng protease HIV-1 và phân tích khối phổ

2.2.12. Xác định hoạt độ protease HIV-1 sử dụng cơ chất huỳnh quang hoặc cơ chất tổng hợp theo phương pháp của Richards và tập thể (1990)

Một đơn vị hoạt độ của protease HIV-1 (1 U) được định nghĩa là lượng protease HIV-1 phân giải 1 pmol cơ chất trong thời gian 1 phút ở điều kiện phân tích.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

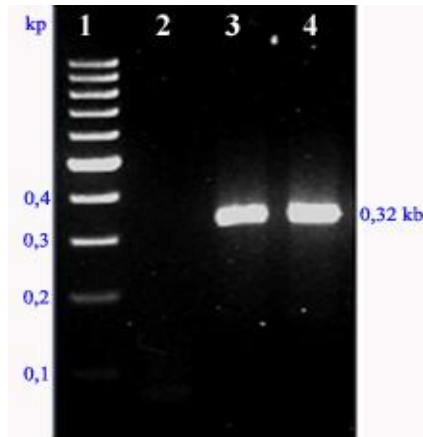
3.1. Phát hiện các đột biến trong gen mã hóa protease HIV-1

3.1.1. Nhân bản đoạn gen mã hóa protease HIV-1 bằng RT-PCR lồng

Để nhân bản đoạn gen mã hóa protease HIV-1, các mẫu máu nhiễm HIV đã được sử dụng để tách RNA và chuyển thành cDNA qua phản ứng sao chép ngược (RT).

Gen mã hóa protease HIV-1 có tính chất bảo thủ thấp và mang nhiều đột biến tại các vị trí khác nhau nên chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR lồng với cặp mồi ngoài là HIV-F1/HIV-R1 và cặp mồi trong là HIV-F2/HIV-R2 và 2 vòng PCR liên tiếp nhau để vừa làm giàu DNA khuôn vừa tăng độ đặc hiệu của phản ứng nhân bản đoạn gen mã hóa protease HIV-1. Trong đó, cặp mồi HIV-F1/HIV-R1 nhân bản đoạn gen 800 bp (Lech và tập thể, 1996); cặp mồi đặc hiệu HIV-F2/HIV-R2 phía trong cặp mồi HIV-F1/HIV-R1 nhân bản chính xác đoạn gen 297 bp mã hóa cho protease HIV-1 (Leuthardt và Roesel, 1993). PCR được thực hiện với 35 chu kỳ gồm 3 bước phản ứng: i) biến tính DNA ở 94°C trong 40 giây; ii) gắn mồi ở 45°C trong 60 giây; iii) kéo dài ở 72°C trong 30 giây. 1,5 µl sản phẩm PCR vòng 1 sau đó được dùng làm khuôn cho PCR vòng 2. Thành phần PCR vòng 2 tương tự PCR vòng 1 chỉ khác ở chỗ cặp mồi ngoài được thay bằng cặp mồi trong và gắn mồi ở 53°C.

Kết quả thu được ở hình 3.1 cho thấy sự có mặt của băng DNA nhân bản khoảng 0,32 kb từ huyết thanh bệnh nhân nhiễm HIV-1. Kích thước của đoạn gen nhân bản đúng như tính toán lý thuyết (gồm 297 bp của gen mã hóa protease HIV-1 và 24 nucleotide thiết kế thêm cho mục đích biểu hiện gen sau này), chứng tỏ chúng tôi đã nhân bản thành công gen mã hóa cho protease HIV-1.



Hình 3.1. Điện di sản phẩm RT-PCR lồng để nhân bản gen mã hóa protease HIV-1 từ các mẫu máu

- 1: thang chuẩn DNA 100 bp
 2: sản phẩm RT-PCR lồng đối chứng (-) không nhiễm HIV
 3, 4: sản phẩm RT-PCR lồng các mẫu máu nhiễm HIV-1

3.1.2. Phát hiện các đột biến trong gen mã hóa protease HIV-1

Chúng tôi đã sử dụng các điều kiện RT-PCR thiết lập được để nhân bản đoạn gen mã hóa protease HIV-1 từ mẫu máu của 50 bệnh nhân nhiễm HIV-1 (trong đó, 20 bệnh nhân chưa điều trị ART, 30 bệnh nhân đang điều trị bằng PI), tuy vậy, chỉ có 8 mẫu cho băng DNA nhân bản 0,32 kb. Kết quả phân tích các trình tự nucleotide của gen mã hóa protease từ các mẫu dương tính và so sánh với ngân hàng dữ liệu HIV quốc tế (<http://hiv.lanl.gov>) cho thấy chúng đều thuộc chủng CRF01_AE đã phân lập được ở miền Bắc Việt Nam (mã số AB519612) và ở Trung Quốc (mã số EU518273), trong số 8 trình tự gen được phân tích có tới 19 vị trí đột biến thay thế nucleotide so với các trình tự đã công bố, các trình tự gen này đã được đăng ký vào ngân hàng gen thế giới (GenBank) với các mã số là: HQ317454, JF276387, JF276388, JF276389, JF276390, JF276391, HQ890881 và JF276392. Kết quả so sánh trình tự axit amin suy diễn của protease HIV-1 từ 8 mẫu nghiên cứu thu được với cơ sở dữ liệu HIV-1 Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>) cho thấy 8 mẫu HIV-1 của chúng tôi có 10 loại đột biến thay thế gốc axit amin khác nhau: G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M, I13V, I15V và N83T. Trong số này, không có đột biến nào thuộc nhóm đột biến chính (đột biến tại trung tâm hoạt động của protease HIV-1 làm kháng thuốc PI). Hai đột biến M36I và H69K kháng nhẹ với thuốc PI mới tiparNAVIR và xuất hiện trên 100% mẫu nghiên cứu; chúng cũng thường có trong hầu hết các trình tự gen mã hóa protease HIV-1 thuộc phân nhóm CRF01_AE nên được xem như sự đa hình tự nhiên (Ishizaki và tập thể, 2009). Các đột biến: G16E, E35D, R41K, V82I, L89M, I13V, I15V cũng hay gặp trong protease của các HIV-1 phân nhóm CRF01_AE và không liên quan đến kháng PI nào (Liu và tập thể, 2007). Đột biến N83T xuất hiện ở 1

bệnh nhân đang điều trị PI (HQ890881) là thuộc loại đột biến hay xuất hiện trong protease HIV-1, tuy vậy đây là nghiên cứu đầu tiên tìm thấy đột biến N83T trong protease HIV-1 phân nhóm CRF01_AE. Hơn thế nữa, ở vị trí axit amin 83 thì chỉ có một vài đột biến như N83D của protease HIV-1 phân nhóm B ở các bệnh nhân đang điều trị bằng thuốc PI là làm giảm hiệu quả điều trị với thuốc ức chế protease tipranavir/r®. Liệu đột biến N83T ở protease HIV-1 phân nhóm CRF01_AE có ảnh hưởng đến hiệu quả xúc tác, mức độ nhạy cảm của protease HIV-1 với các PI như thế nào là vấn đề rất cần được tiếp tục nghiên cứu.

3.2. Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa protease HIV-1 trong *E. coli*

Gen mã hóa protease HIV-1 mã số đăng ký HQ317454 trên ngân hàng gen thế giới được chúng tôi lựa chọn để biểu hiện ở *E. coli*. Trình tự gen này chỉ mang các đột biến thường gặp ở gen mã hóa protease HIV-1 của phân nhóm CRF01_AE.

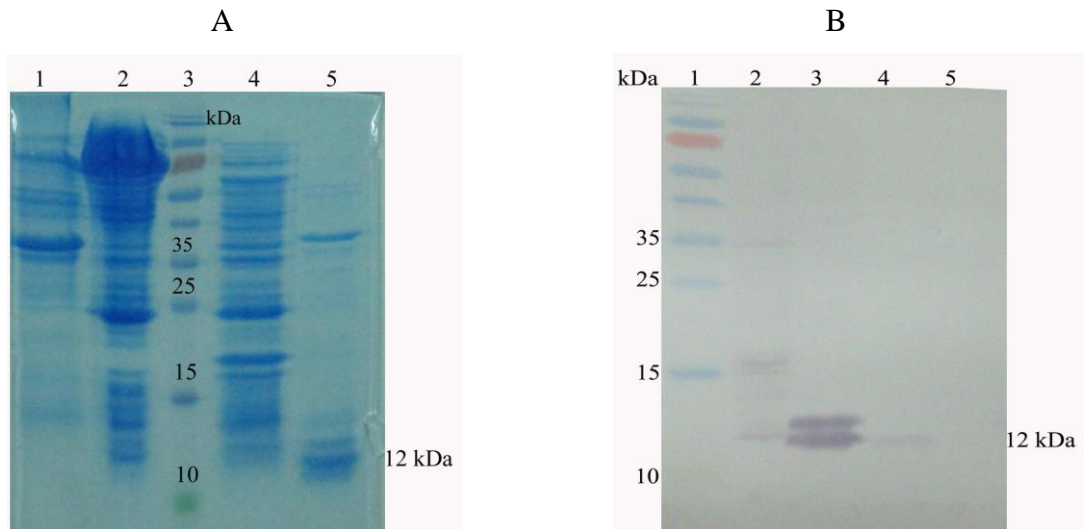
3.2.1. Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa protease HIV-1 bằng vector pET28a

Phần lớn các nghiên cứu đều biểu hiện protease HIV-1 ở vi khuẩn *E. coli* dưới dạng tự cắt khỏi vị trí đặc hiệu Phe/Tyr-Pro để giải phóng protease HIV-1 mở đầu bằng Pro (Debouck và tập thể, 1987; Graves và tập thể, 1988; Danley và tập thể, 1989; Taylor và tập thể, 1992; Mildner và tập thể, 1994). Tuy nhiên, Leuthardt và Roesel (1993) đã biểu hiện thành công protease HIV-1 mở đầu bằng Met và có hoạt tính trong hệ thống vector pDS56/3H-3H; protease dung hợp với 3 gốc histidine (3xHis) ở đầu N và 3xHis đầu C thuận tiện cho tinh sạch và không cần thiết kể thêm trình tự tự cắt. Chính vì vậy, bước đầu chúng tôi đã thiết kế biểu hiện protease HIV-1 với dạng tương tự bằng vector pET28a ở vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Gen mã hóa protease HIV-1 được đưa vào vector pET28a (tại vị trí cắt của *NdeI* và *EcoRI*), biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, vector tái tổ hợp được tách ra, xác định trình tự để khẳng định đúng trình tự cũng như khung đọc mở và được ký hiệu là pET28a-Prot. Tế bào vi khuẩn mang vector pET28a-Prot được nuôi cấy và cảm ứng biểu hiện gen bằng IPTG 0,1-0,25 mM ở 37°C; dịch chiết tế bào trong đệm Tris HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM, imidazol 5 mM (đệm A) được thu nhận và cho sắc ký qua cột ái lực Ni-agarose, protein gắn trên cột được rửa chiết ra bằng imidazol 250 mM pha trong đệm A.

Kết quả điện di SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng kháng protease HIV-1 (hình 3.8) cho thấy có sự xuất hiện băng protein có khối lượng phân tử (KLPT) khoảng 13 kDa (đúng như KLPT của protease HIV-1 được thiết kế có gắn đuôi 6xHis) trong cả dịch chiết tế bào và dịch rửa chiết cột Ni-agarose. Băng protein 13 kDa này được nhận ra bởi kháng thể đơn dòng kháng protease HIV-1, chứng tỏ chúng tôi đã biểu hiện được protease HIV-1. Tuy nhiên, lượng protease HIV-1 biểu hiện còn rất thấp và chế phẩm protease HIV-1 qua cột Ni-agarose vẫn còn nhiều băng protein tạp nhiễm khác.

Trong môi ngược HIV-R3 có trình tự cắt giới hạn của *Xho*I; khi đưa gen mã hóa protease HIV-1 vào pET32a và pET43a tại vị trí này, đầu C của protease sẽ được dung hợp với 6xHis ngay trước bộ ba kết thúc dịch mã. Theo thiết kế này, nếu protease dung hợp không có hoạt tính tự cắt tại liên kết Phe-Pro; protease tái tổ hợp tạo ra sẽ có dạng TRX-GTVSFNF-protease-6xHis trên vector pET32a với KLPT là 31 kDa và NusA-GTVSFNF-protease-6xHis trên vector pET43a với KLPT là 67 kDa. Nếu protease tái tổ hợp tự cắt (tại vị trí Phe-Pro), thì enzyme đều được giải phóng ra dạng gắn với đuôi 6xHis và có KLPT khoảng 12 kDa. Việc giải phóng ra protease cũng đồng thời khẳng định enzyme có hoạt tính.

Sau khi gen mã hóa protease HIV-1 được gắn vào cả hai vector pET32a (thành dạng pET32a-Prot) và pET43a (pET43a-Prot) đúng trình tự và khung đọc mở, các vector tái tổ hợp được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) plysS, tế bào được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng và được cảm ứng biểu hiện gen bằng IPTG 0,25 mM. Protein nội bào được thu ở cả phần dịch chiết bằng đệm A và phần tủa (sau ly tâm) được hòa trong đệm Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 100 mM, urea 8M, imidazol 5 mM (đệm C).

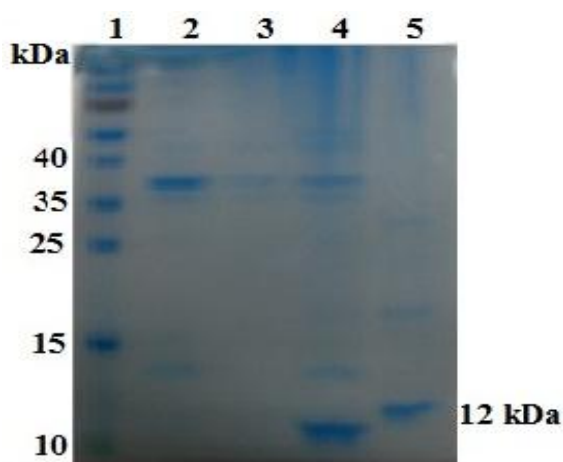


Hình 3.14. SDS-PAGE (A) và thẩm tách miễn dịch (B) dịch chiết và tủa tế bào BL21 (DE3) plysS mang pET32a-Prot và BL21 (DE3) plysS mang pET43a-Prot

1A và 5B: dịch hòa tủa tế bào BL21 (DE3) pLysS mang pET43a-Prot; 2A và 4B: dịch chiết tế bào BL21 (DE3) pLysS mang pET43a-Prot; 3 A và 1B: thang chuẩn protein nhuộm sẵn; 4A và 2B: dịch chiết tế bào BL21 (DE3) pLysS mang pET32a-Prot; 5A, 3B: dịch hòa tủa tế bào BL21 (DE3) pLysS mang pET32a-Prot

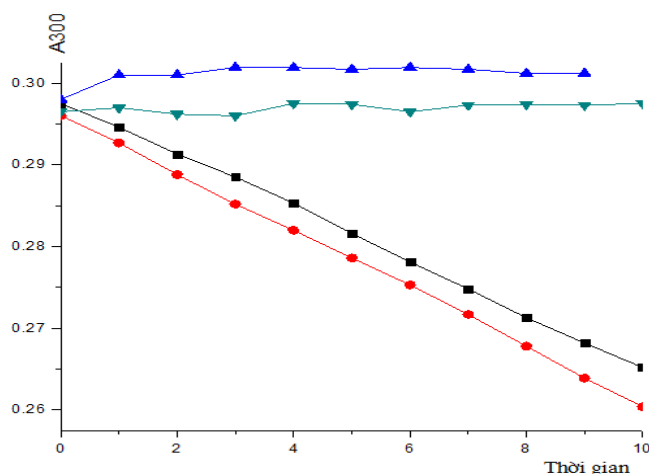
Kết quả SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch (hình 3.14) cho thấy có sự xuất hiện băng protein với KLPT khoảng 12 kDa trong phân đoạn tủa tế bào *E. coli* BL21 (DE3) plysS mang pET32a-Prot và hầu như không có băng này trong các phân đoạn của tế bào mang pET43a-Prot. Băng protein 12 kDa được nhận ra bởi kháng thể đơn dòng kháng protease HIV-1. Các

kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã biểu hiện được protease HIV-1 ở dạng có hoạt tính tự cắt trên hệ thống vector pET32a trong *E. coli*. Kết quả cũng cho thấy, protease thu được chủ yếu trong phân đoạn tủa tế bào *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, tương tự như kết quả của các nghiên cứu khác trước đây (Rangwala và tập thể, 1992; Taylor và tập thể, 1992; Leuthardt và Roesel, 1993; Ohtaka và tập thể, 2003; Yanchunas và tập thể, 2005). Tuy vậy, có thể thấy rằng băng protease KLPT khoảng 12 kDa trên SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch tồn tại ở dạng băng đúp và hiện tượng này cũng được thấy trong một số nghiên cứu của các tác giả khác (Taylor và tập thể, 1992; Dergousova và tập thể, 1996). Nguyên nhân của hiện tượng tạo băng đúp này có thể do protease của tế bào *E. coli* đã phân cắt giới hạn protease HIV-1 để hình thành nên một protein có KLPT nhỏ hơn chút ít nhưng vẫn giữ được tính kháng nguyên của protease HIV-1.



Hình 3.15A. SDS-PAGE các phân đoạn sắc ký qua cột His-bind của protease HIV-1 biểu hiện trong hệ thống pET32a-Prot

1: thang chuẩn protein nhuộm sẵn; 2: dịch hòa tủa tế bào BL21 (DE3) pLysS mang pET32a-Prot; 3: phân đoạn không gắn cột His-bind; 4: phân đoạn rửa cột His-bind; 5: phân đoạn rửa chiết cột His-bind



Hình 3.16. Hoạt tính cắt cơ chất tổng hợp của protease HIV – 1 tái tổ hợp

(■): Protease thương mại (Anaspec); (●): Protease HIV-1 tái tổ hợp; (▲): Protease HIV-1 tái tổ hợp + pepstatin A, (▼): Protease HIV – 1 tái tổ hợp đã xử lý nhiệt 95°C, 5 phút

Protein trong phân đoạn tủa tế bào này được cho sắc ký qua cột gel His-bind (gel gắn Ni²⁺ tương tự Ni-agarose). Kết quả điện di SDS-PAGE (hình 3.15A) cho thấy phân đoạn protein gắn trên cột His-bind được rửa chiết ra bằng đệm có chứa imidazol 250 mM có băng 12 kDa của protease HIV-1. Tuy vậy, chế phẩm chưa hoàn toàn tinh sạch còn lẫn một số băng protein khác. Mặt khác hiệu suất gắn cột chưa cao (có băng 12 kDa của protease HIV-1 trong phân đoạn rửa qua cột His-bind) dẫn đến hiệu suất thu hồi protease HIV-1 thấp.

Chúng tôi cũng đã kiểm tra hoạt tính của chế phẩm protease HIV-1 tái tổ hợp thu được sau bước tinh sạch bằng cột His-bind, kết quả thu được ở hình 3.16 cho thấy protease HIV-1 thu được có khả năng phân cắt cơ chất tổng hợp (làm giảm độ hấp thụ ở bước sóng 300 nm của cơ chất), enzyme bị ức chế bởi pepstatin A giống như protease HIV-1 thương mại và bị mất hoạt tính xúc tác khi xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút.

Để protease HIV-1 tái tổ hợp hoàn toàn tinh sạch, chúng tôi cũng đã thử nghiệm một loạt các cột sắc ký ái lực và trao đổi ion với các điều kiện khác nhau nhưng chế phẩm protease HIV-1 thu được vẫn còn lẫn một số protein không mong muốn. Điều này buộc chúng tôi một lần nữa phải nghĩ đến việc cải tiến hệ thống biểu hiện để nâng cao hiệu suất biểu hiện và khả năng tinh sạch protease HIV-1.

3.2.3. Cải tiến quy trình biểu hiện protease HIV-1 trong pET32a và pET43a ở *E. coli* BL21 (DE3) RIL

Chúng tôi đã tiến hành thiết kế thêm đoạn gen mã hóa cho 9 axit amin là epitope của Hemagglutinin (HA) phân lập từ virus cúm vào đầu C của protease HIV-1 trước trình tự 6xHis nhằm có thể sử dụng thêm cột ái lực cho việc tinh sạch protease HIV-1 tái tổ hợp. Ngoài ra, để phòng khả năng các axit amin thiết kế thêm ở đầu C có thể làm ảnh hưởng đến biểu hiện và hoạt tính của protease HIV-1, giữa trình tự axit amin của protease HIV-1 nối với HA chúng tôi còn thiết kế thêm trình tự cắt của TEV protease. Trong quá trình biểu hiện, nếu protease HIV-1 tái tổ hợp không có hoạt tính sẽ được xử lý bằng TEV protease để loại peptide gắn thêm ở đầu C. Mỗi HIV-R4 và HIV-R5 được thiết kế thay cho HIV-R3 nhằm biểu hiện protease HIV-1 theo tính toán như trên.

HIV-R4: 5'- GAGTCCTCGAG**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**
XhoI **HA (Hemagglutinin)**

AAAATTTAAAGTGCAGCCAATCTG-3'

HIV-R5: 5'- GAGTCCTCGAG**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**
XhoI **HA**

TCCCTGAAA ATACAGGTTTC
TEV

AAAATTTAAAGTGCAGCCAATCTG-3'

Với hai dạng peptide gắn vào đầu C là có và không có trình tự cắt của TEV protease cùng với thiết kế gen protease HIV-1 biểu hiện trong 2 vector là pET32a và pET43a, sau biểu hiện và tự cắt sẽ có 4 dạng protease HIV-1 như sau: Protease-HA-6xHis, Protease-TEV-HA-6xHis ở vector pET32a và Protease-HA-6xHis, Protease-TEV-HA-6xHis ở pET43a (tất cả đều có Pro ở đầu N). Theo tính toán, Protease-HA-6xHis và Protease-TEV-HA-6xHis có KLPT tương ứng khoảng 13 kDa và 14 kDa.

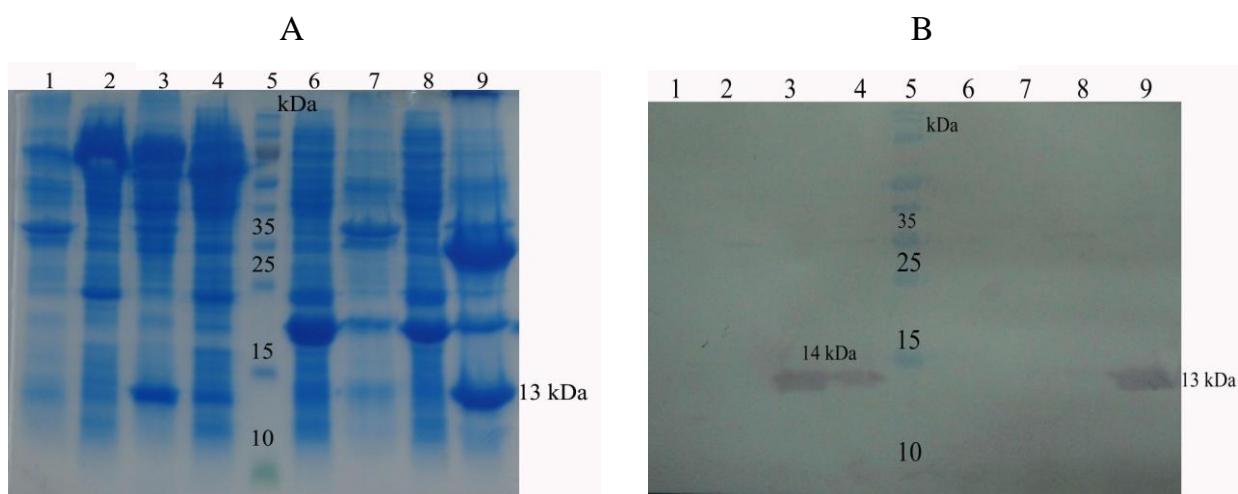
Một cải tiến nữa trong phần nghiên cứu này là chúng tôi sử dụng chủng vi khuẩn biểu hiện BL21 (DE3) RIL thay cho BL21 (DE3) plysS. BL21 (DE3) RIL có một số các tRNA mang các anticodon cho phép đọc các codon ít gặp ở vi khuẩn.

Tương tự như các bước ghép nối gen ở các phần trên, vector tái tổ hợp tạo ra đã được đưa vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) RIL, được kiểm tra về trình tự và khung đọc. *E. coli* BL21 (DE3) RIL mang pET32a-Prot-HA, pET32a-Prot-TEV-HA hay pET43a-Prot-HA, pET43a-Prot-TEV-

HA được nuôi cấy và được cảm ứng biểu hiện gen bằng IPTG 0,25 mM. Kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện gen protease HIV-1 (hình 3.19) cho thấy cả hai hệ thống vector đều cho phép biểu hiện protease HIV-1, tuy vậy, băng protease HIV-1 (13 kDa) rõ nét nhất trong phân đoạn tủa của tế bào *E. coli* mang pET32a-Prot-HA.

Như vậy, hệ thống pET32a biểu hiện protease HIV-1 tốt hơn so với pET43a và việc bổ sung thêm trình tự 9 axit amin của HA tại đầu C của protease đã không ảnh hưởng đến hoạt tính tự cắt của enzyme và đồng thời giúp tăng cường biểu hiện của gen đích. Mặt khác, khi có thêm trình tự cắt của TEV protease có lẽ đã ảnh hưởng đến hiệu quả biểu hiện của Prot-TEV-HA trên cả hai hệ thống pET32a và pET43a.

Trên cơ sở các kết quả thu được vừa nêu, chúng tôi đã lựa chọn phân đoạn dịch hòa tủa tế bào *E. coli* BL21 (DE3) RIL mang pET32a-Prot-HA cho các bước thu nhận chế phẩm protease HIV-1 tinh sạch.



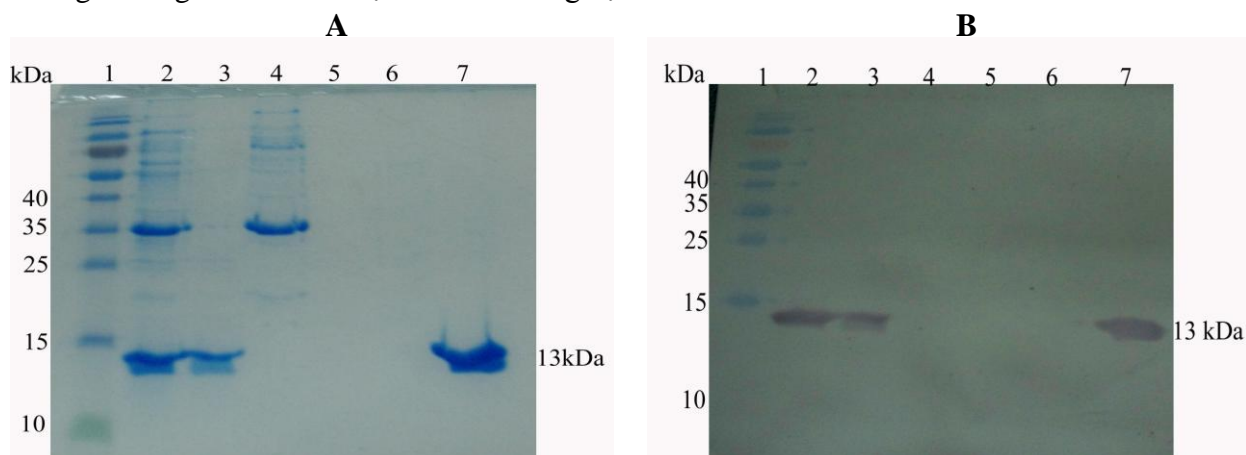
Hình 3.19. SDS-PAGE (A) và thẩm tách miễn dịch (B) kiểm tra sự biểu hiện của protease HIV-1 trong hệ thống vector pET32a và pET43a cải tiến

1: dịch hòa tủa tế bào mang pET43a-Prot-TEV-HA; 2: dịch chiết tế bào mang pET43a-Prot-TEV-HA; 3: dịch hòa tủa tế bào mang pET43a-Prot-HA; 4: dịch chiết tế bào mang pET43a-Prot-HA; 5: thang chuẩn protein nhuộm sẵn; 6: dịch chiết tế bào mang pET32a-Prot-TEV-HA; 7: dịch hòa tủa tế bào mang pET32a-Prot-TEV-HA; 8: dịch chiết tế bào mang pET32a-Prot-HA; 9: dịch hòa tủa tế bào mang pET32a-Prot-HA

3.2.4. Xây dựng quy trình tinh sạch protease HIV-1

Để bước đầu loại bỏ bớt các protein không mong muốn, trước khi hòa tan các protein trong tủa tế bào bằng đệm C, tủa tế bào *E. coli* mang pET32a-Prot-HA được rửa bằng đệm Tris-HCl 20 mM pH 7,9 có urea 1M và Triton X-100 1% (đệm B). Để tinh sạch hoàn toàn protease HIV-1, chúng tôi đã sử dụng cột trao đổi anion mạnh mono Q-sepharose mắc nối tiếp với cột ái lực His-bind trong môi trường đệm C có urea 8 M, pH 7,9, phân đoạn protein không gắn với gel mono Q-sepharose sau đó được cho ngay lên cột His-bind; các protein gắn với gel

mono Q-sepharose được rửa chiết bằng đệm C với gradient nồng độ NaCl 100- 1000 mM; các protein gắn với gel His-bind được rửa chiết bằng đệm C có imidazol 250 mM.



Hình 3.23. SDS-PAGE (A) và thẩm tách miễn dịch (B) các phân đoạn qua cột mono Q-sepharose và His-bind

1: thang chuẩn protein nhuộm sẵn; 2: dịch hòa tủa tế bào *E. coli* BL21 (DE3) RIL mang pET32a-Prot-HA; 3: phân đoạn không gắn cột mono Q-sepharose; 4-5: phân đoạn rửa chiết qua cột mono-Q-sepharose thứ 26, 44; 6: phân đoạn không gắn cột His-bind; 7: phân đoạn rửa chiết qua cột His-bind

Kết quả điện di (hình 3.23A) cho thấy protein tổng số trong dịch hòa tủa tế bào *E. coli* BL21 (DE3) RIL mang pET32a-Prot-HA đã được loại bỏ nhiều protein không mong muốn, ngoài băng protein KLPT 13 kDa của protease HIV-1, còn có một băng protein KLPT khoảng gần 35 kDa đậm nét và một số băng protein rất mờ khác. Trong điều kiện biến tính với nồng độ urea 8M, pH 7,9; protease HIV-1 hoàn toàn không gắn gel mono Q-sepharose, nhờ đó một số protein không mong muốn được giữ lại ở cột này; phân đoạn không gắn với gel mono Q-sepharose khi qua cột His-bind và được rửa chiết bằng đệm C có chứa imidazol 250 mM chỉ cho một băng protein duy nhất với KLPT khoảng 13 kDa trên SDS-PAGE và băng này được nhận ra bởi kháng thể đơn dòng kháng protease HIV-1 (hình 3.23B). Kết quả phân tích khối phổ MALDI-TOF-TOF (dẫn liệu không nêu ở đây) một lần nữa khẳng định protein 13 kDa tinh sạch đúng là protease HIV-1.

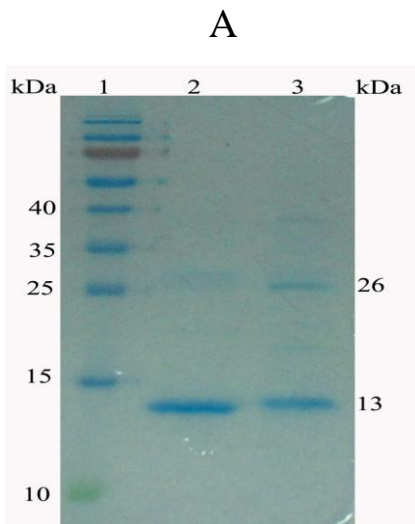
Protein HIV-1 tái tổ hợp sau tinh sạch được pha loãng về nồng độ 0,1 mg/ml để hồi tính bằng thẩm tách trong đệm C có nồng độ urea giảm dần từ 8 M xuống 0 M.

Chúng tôi cũng đã tiến hành ủ chế phẩm protease HIV-1 tái tổ hợp sau hồi tính trong đệm mẫu điện di có SDS và β -mercaptoethanol (β -ME) cũng như trong đệm không có SDS và β -ME, sau đó cho chạy điện di protein trong đệm có SDS. Kết quả thu được ở hình 3.24 cho thấy khi được ủ trong đệm có SDS và β -ME chế phẩm protease HIV-1 thu được chỉ cho một băng protein duy nhất 13 kDa và trong điều kiện đệm ủ không có SDS và β -ME thì chế phẩm cho 2 băng, một băng 13 kDa và một băng 26 kDa, điều này chứng tỏ sự tồn tại dạng homodimer trong chế phẩm thu được. Sự có mặt băng 13 kDa trong mẫu ủ không có SDS và β -ME có thể do trong đệm chạy điện di chứa SDS nên một phần dạng monomer đã hình thành từ dạng dimer, ngoài ra, có thể bước hồi tính trước đó (sau tinh sạch) của chúng tôi chưa đủ làm cho tất cả dạng monomer chuyển thành dạng dimer. Protease HIV-1 sau khi được

hồi tính cũng đã được kiểm tra hoạt tính thủy phân cơ chất tổng hợp, kết quả thu được ở hình 3.25 khẳng định protease HIV-1 tái tổ hợp là có hoạt tính và bị ức chế bởi pepstatin A.

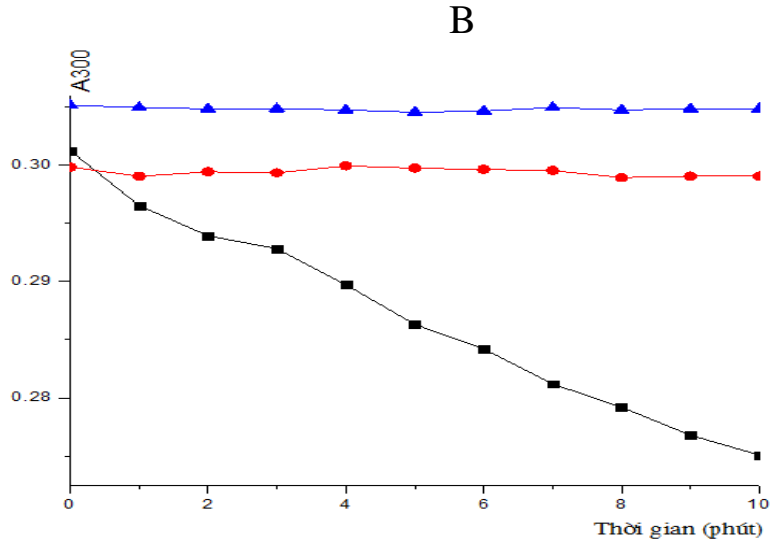
Tóm lại, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình tinh sạch hoàn toàn protease HIV-1 gồm 2 bước đơn giản: i) rửa tủa tế bào trong đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,9 có NaCl 100 mM, urea 1M và Triton X-100 1%; ii) sắc ký qua cột mono Q-sepharose và cột His-bind mắc nối tiếp, rửa chiết enzyme bám trên cột His-bind bằng đệm có chứa imidazol 250 mM. Với quy trình này chỉ cần một bước hồi tính protease HIV-1 nên tiết kiệm thời gian và không làm mất protease HIV-1 qua các khâu trung gian.

Kết quả tính toán của chúng tôi cho thấy từ 100 ml dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) RIL mang pET32a-Prot-HA chúng tôi đã thu được 1,38 g sinh khối tế bào, 23 mg protein tổng số trong dịch hòa tủa tế bào, sau các bước tinh sạch và hồi tính thu hồi được 3,4 mg protease HIV-1 hoàn toàn tinh sạch và có hoạt tính. Trước đây, quy trình biểu hiện và tinh sạch protease HIV-1 ở *E. coli* của Taylor và tập thể (1992) được xem là hiệu quả và đơn giản nhất; từ 10 lít môi trường nuôi cấy vi khuẩn lên men các tác giả đã thu được 75-100 mg protease HIV-1, như vậy, quy trình biểu hiện và tinh sạch của chúng tôi cho phép thu được lượng protease HIV-1 cao gấp 3 đến 4,5 lần quy trình của Taylor và tập thể. Chế phẩm protease HIV-1 tái tổ hợp tinh sạch sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tính chất tiếp theo.



Hình 3.24. SDS-PAGE của protease HIV-1 tái tổ hợp sau khi hồi tính

1: thang chuẩn protein
2: protease HIV-1 biến tính
3: protease HIV-1 không biến tính

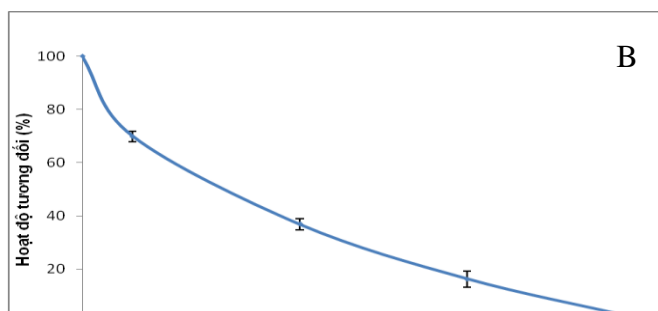
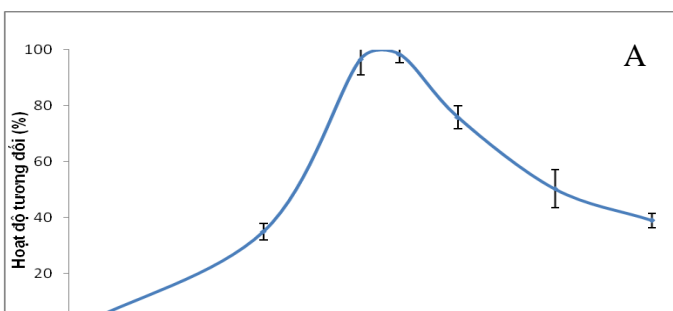


Hình 3.25. Hoạt độ cắt cơ chất tổng hợp của protease HIV-1 tái tổ hợp đã tinh sạch.

(■): Protease HIV-1 tái tổ hợp, (▲): Protease HIV-1 tái tổ hợp + pepstatin A, (●): Protease HIV-1 tái tổ hợp đã xử lý nhiệt.

3.3. Nghiên cứu một số tính chất của Protease HIV-1 tái tổ hợp

3.3.1. Nhiệt độ tối thích và độ bền nhiệt của protease HIV-1

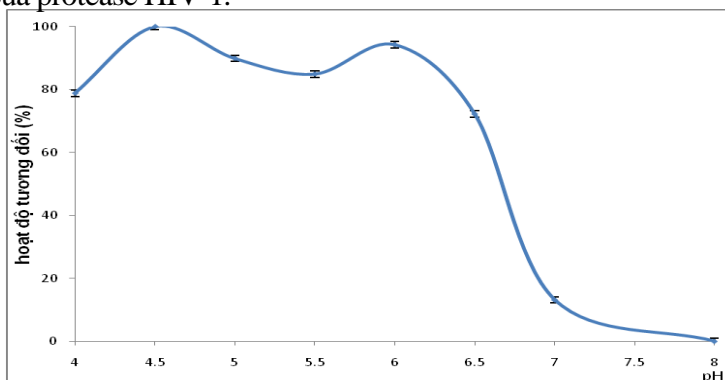


Hình 3.26. Nhiệt độ hoạt động tối thích (A) và ảnh hưởng của nhiệt độ (B) lên hoạt độ của protease HIV-1 tái tổ hợp

Kết quả xác định hoạt độ protease HIV-1 tái tổ hợp tại các pH khác nhau (hình 3.26A) cho thấy enzyme hoạt động tối thích tại nhiệt độ từ 35-37°C và không thể hiện hoạt tính ở 20°C. Khi xử lý protease HIV-1 ở các nhiệt độ khác nhau, sau đó xác định hoạt độ enzyme còn lại (hình 3.26B) thì thấy rằng hoạt tính của enzyme bị mất hoàn toàn sau khi xử lý nhiệt ở 70°C trong 10 phút. Nhiệt độ 37°C được chọn cho các phản ứng cắt cơ chất tổng hợp của protease HIV-1 tiếp theo.

3.3.2. pH hoạt động tối thích của protease HIV-1 tái tổ hợp

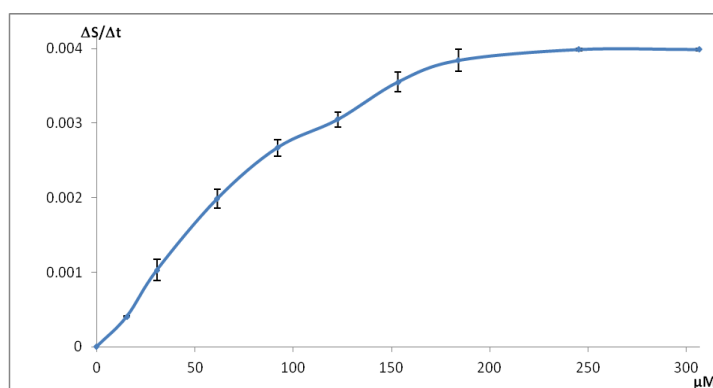
Như được chỉ ra ở hình 3.27, protease HIV-1 tái tổ hợp có hoạt độ cắt cơ chất tổng hợp cao trong vùng pH axit (pH 4 – 6), cao nhất tại pH 4,5; hoạt độ giảm dần tại vùng pH trung tính, kiềm và enzyme hoàn toàn không thể hiện hoạt tính ở pH 8. Trên cơ sở này, đệm Na-acetate pH 4,5 nồng độ 100 mM có EDTA 4 mM, β -ME 5 mM, NaCl 0,9 M và CaCl_2 1 mM, được chọn cho các phản ứng cắt cơ chất tiếp theo của protease HIV-1.



Hình 3.27. pH hoạt động tối thích của protease HIV-1 tái tổ hợp

3.3.3. Giá trị K_m , V_{max} và K_{cat} của protease HIV-1 tái tổ hợp

Phối hợp kết quả phân tích động học của protease HIV -1 tái tổ hợp (hình 3.28) sử dụng cơ chất tổng hợp và trên cơ sở phương trình Lineweaver-Burk chúng tôi đã xác định được protease HIV-1 tái tổ hợp có K_m là 61,3 μM , V_{max} là 0,0275 $\mu\text{M/s}$ và K_{cat} là 2,86 s^{-1} .



Hình 3.28. Đồ thị sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng thủy phân cơ chất tổng hợp của protease HIV-1 tái tổ hợp vào nồng độ cơ chất

So với K_m , K_{cat} của protease HIV-1 trong nghiên cứu của Richard và tập thể (1990) trên cùng một cơ chất tổng hợp, kết quả của chúng tôi có K_m cao hơn 4 lần, k_{cat} thấp hơn 20 lần. Điều này cũng có nghĩa là protease HIV-1 tái tổ hợp của chúng tôi có ái lực và hiệu quả xúc tác thấp hơn protease thu được trong nghiên cứu của Richard và tập thể (1990). Sự chênh lệch này có thể do việc hồi tính chế phẩm protease HIV-1 tái tổ hợp của chúng tôi chưa hoàn toàn tối ưu và cần được cải tiến thêm. Mặt khác, protease HIV-1 trong nghiên cứu của chúng tôi là từ HIV-1 phân nhóm CRF01_AE còn trong nghiên cứu của Richard và tập thể (1990) là của phân nhóm B. Theo Bandaranayake và tập thể (2008) hiệu quả xúc tác của protease phân nhóm CRF01_AE thấp hơn so với phân nhóm B.

3.3.4. Ảnh hưởng của một số chất tự nhiên và tổng hợp lên hoạt độ của protease HIV -1 tái tổ hợp

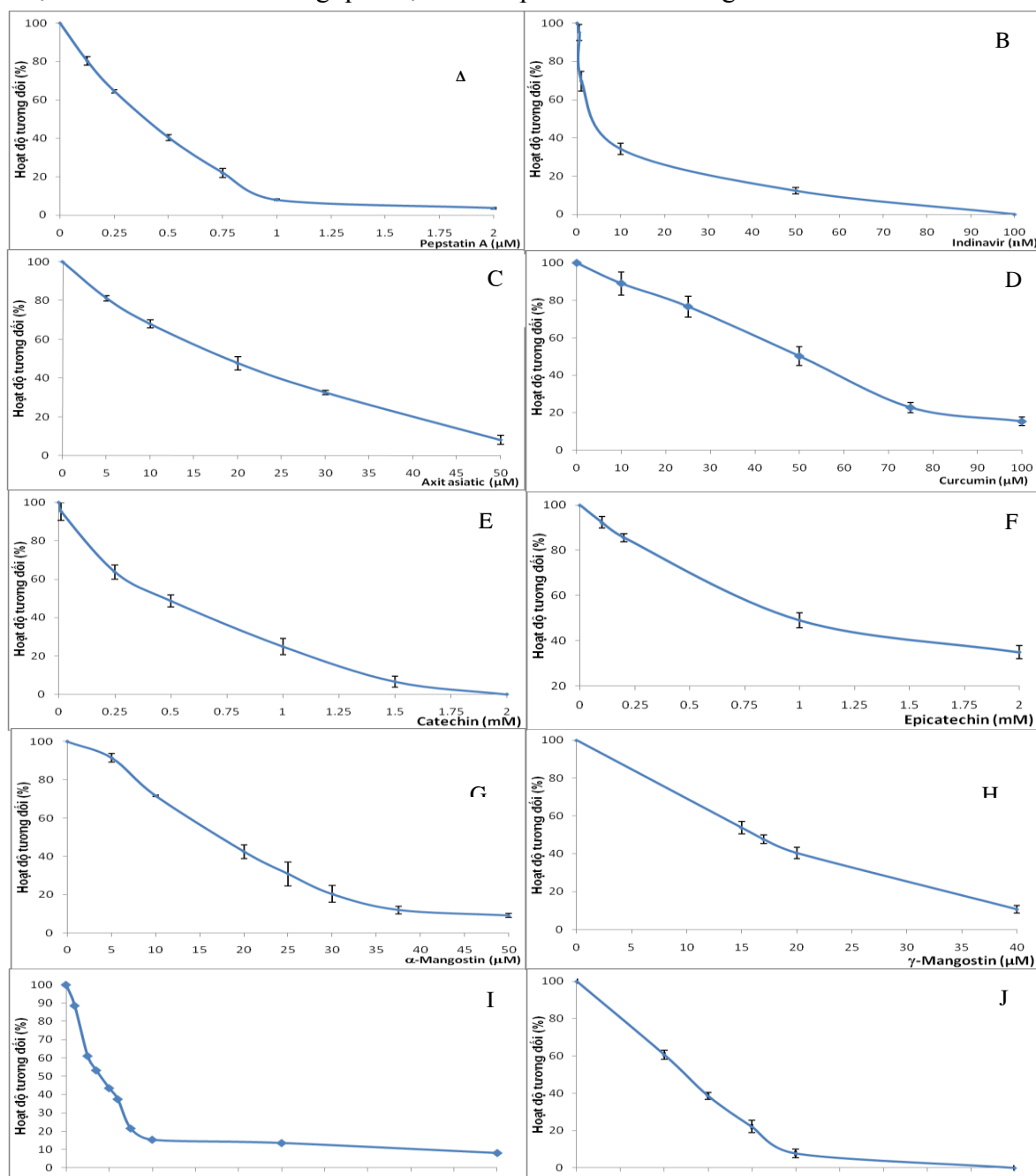
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của 10 hợp chất: pepstatin A, indinavir, axit asiatic, curcumin, catechin, epicatechin, α -mangostin, γ -mangostin, 8-hydroxyquinoline, menadione và 2 muối kim loại là Na-fluor (NaF) và Zn-sulfate ($ZnSO_4$) lên hoạt độ thủy phân cơ chất tổng hợp của protease HIV-1 tái tổ hợp. Trong số các chất vừa nêu, pepstatin A là chất ức chế các protease họ aspartyl (Darke và tập thể, 1989); indinavir là PI tổng hợp được dùng cho điều trị bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS từ những năm 90 (Hoffmann và tập thể, 2007); curcumin (Vajraguptaa và tập thể, 2005), α -mangostin, γ -mangostin (Chen và tập thể, 1996), catechin và epicatechin (Yu và tập thể, 2007) đều được biết là ức chế hoạt tính của protease HIV-1. Trong đó, curcumin được chỉ ra là gắn với trung tâm hoạt động, tương tác với Asp25, Asp29, Asp30, Gly27', Asp29' và Asp30' của protease HIV-1 dẫn đến làm mất hoạt tính của protease (Vajraguptaa và tập thể, 2005). Một số chất trong số này (curcumin, axit asiatic, mangostin) còn được biết là có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư do có khả năng kích hoạt quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư mà không có tác dụng gây độc tế bào khỏe mạnh (Hsu và tập thể, 2005; Akao và tập thể, 2008; Hatcher và tập thể, 2008). Ngoài ra, mangostin, catechin còn có tác dụng khác như chống viêm, kháng histamin trong điều trị dị ứng, chống lão hóa, có khả năng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn hay nấm (Akao và tập thể, 2008; Lambert và tập thể, 2003).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi (hình 3.29) cho thấy, protease HIV-1 tái tổ hợp bị ức chế rất mạnh bởi indinavir với nồng độ ức chế 50% hoạt độ (IC_{50}) của enzyme là 0,006 μ M. Pepstatin A, axit asiatic, curcumin, catechin, epicatechin, α -mangostin, γ -mangostin, 8-hydroxyquinoline và menadione đều ức chế protease HIV-1 tái tổ hợp với IC_{50} tương ứng là 0,4 μ M; 18,9 μ M; 48,32 μ M; 510 μ M; 960 μ M; 16,82 μ M; 16,25 μ M; 104 μ M; 114,26 μ M.

Chúng tôi cũng đã nghiên cứu tác dụng của NaF và $ZnSO_4$ lên hoạt độ xúc tác của protease HIV-1 tái tổ hợp nhưng cả 2 chất này đều không ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme thậm chí ở nồng độ lên tới 2 mM. Mặc dầu, Zn^{2+} được biết là ức chế hoạt tính của reverse transcriptase HIV-1 với IC_{50} là 53,7 μ M (Sabbioni và tập thể, 1999) và một số enzyme khác (Phan và tập thể, 2004). Fluor được biết đến như chất ức chế một số enzyme như F-ATPase, enolase, NADH oxidase (Sutton và tập thể 1987).

Như vậy, chúng tôi là nhóm nghiên cứu đầu tiên phát hiện thấy tác dụng ức chế protease HIV-1 bởi axit asiatic, 8-hydroxyquinoline và menadione.

Việc thiết lập được hệ thống biểu hiện và thu nhận chế phẩm protease HIV-1 tinh sạch có hoạt tính trong nghiên cứu này hy vọng sẽ giúp tìm kiếm và phát triển các chất ức chế mới hiệu quả sự nhân lên của HIV thông qua việc ức chế protease của chúng.



Hình 3.29. Ảnh hưởng của các hợp chất khác nhau lên hoạt độ thủy phân cơ chất của protease HIV-1 tái tổ hợp. A: Pepstatin A, B: Indinavir, C: Axit asiatic, D: Curcumin, E: Catechin, F: Epicatechin, G: α -Mangostin, H: γ -Mangostin, I: 8-Hydroxyquinoline, J: Menadione, K: NaF, L: ZnSO₄

KẾT LUẬN

1. Đã nhân bản, nhân dòng và xác định trình tự 8 đoạn gen mã hóa protease HIV-1 (297 bp) tách được từ một số bệnh nhân Việt Nam khác nhau và phát hiện được 19 đột biến thay thế nucleotide, trong đó có 10 đột biến dẫn đến sự thay thế axit amin (G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M, I13V, I15V, N83T). Các trình tự này đã được đăng ký trong ngân hàng gen thế giới.
2. Đã thiết kế và biểu hiện thành công protease HIV-1 trong vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) RIL sử dụng vector pET32a dưới dạng protein dung hợp gắn với thioredoxin và 7 axit amin của protein gag-pol (GTVSFNF) tại đầu N và epitope của hemagglutinin cùng 6xHis tại đầu C. Đã xây dựng được quy trình đơn giản để tinh sạch protease HIV-1 tái tổ hợp với 2 bước: i) rửa tủa tế bào trong đệm Tris-HCl 20 mM pH 7,9 có NaCl 100 mM, urea 1M và Triton X-100 1%; ii) sắc ký qua cột mono Q-sepharose và cột His-bind mắc nối tiếp, rửa chiết enzyme gắn với gel His-bind bằng đệm có chứa imidazol 250 mM.
3. Protease HIV-1 tái tổ hợp có hoạt tính cắt cơ chất peptide tổng hợp đặc hiệu với $K_m = 61,3 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 0,0275 \mu\text{M}/\text{giây}$, $K_{\text{cat}} = 2,86 \text{ s}^{-1}$ và hoạt động tối thích tại pH 4,5 ở 37°C; mất hoàn toàn hoạt tính xúc tác khi bị xử lý nhiệt ở 70°C trong thời gian 10 phút. Lần đầu tiên trong nghiên cứu này đã phát hiện thấy protease HIV-1 tái tổ hợp bị ức chế bởi axit asiatic, 8-hydroxyquinoline và menadione với nồng độ ức chế 50% hoạt độ tương ứng là 18,9 μM , 104 μM và 114,26 μM .

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục điều tra các đột biến kháng thuốc trong gen mã hóa cho protease HIV-1 để có một bức tranh đầy đủ hơn về mức độ kháng loại thuốc này ở Việt Nam.
2. Hoàn thiện việc phục hồi hoạt tính xúc tác của protease HIV-1 tái tổ hợp và sử dụng protease thu được làm enzyme đích trong sàng lọc, thiết kế các chất ức chế mới, hiệu quả cao của enzyme để có thể ứng dụng trong điều trị HIV/AIDS.

References

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tài liệu Tiếng Việt

1. Phan Trọng Hoàng, Ngô Văn Trường, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2007), “Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa tiểu đơn vị p66 của enzyme phiên mã ngược của virus HIV-1”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5, tr. 463-470.
2. Nguyễn Thị Mai Phương, Phan Tuấn Nghĩa, Robert E. Marquis (2003), “Ảnh hưởng của 8-hydroxyquinolin lên các quá trình sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn *Streptococcus mutans* UA-159”, *Tạp chí Dược học* 43, tr. 11-13.

3. Đồng Văn Quyền, Hoàng Anh, Bạch Thị Như Quỳnh, Phạm Minh Tuấn, Nguyễn Thanh Tùng, Lê Thị Tâm, Đinh Duy Kháng (2008), “Tách dòng và biểu hiện gen p24 từ chủng HIV lưu hành ở Việt Nam và nghiên cứu phản ứng của protein tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6, tr. 27-34.
4. Bạch Thị Như Quỳnh, Vũ Thị Hiền, Hà Thị Thu, Nguyễn Thị Hoa, Lê Phương Hằng, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Xuân Bắc, Đồng Văn Quyền, Lê Văn Phùng, Đinh Duy Kháng (2011), “Biểu hiện protein GP41 của virus HIV phân type CRF01_AE trong *E. coli* ứng dụng để phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân bằng Western blot và ELISA”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 9, tr. 29-36.

II. Tài liệu Tiếng Anh

5. Abecasis A.B., Deforchea K., Snoeck J., Bachelier L.T., McKenney P., Carvalhad A.P., Gomes P., Camacho R.J. and Vandamme A.M. (2005), "Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G", *AIDS* 19, pp. 1799-1806.
6. Aggarwal B.B., Shishodia S. (2004), "Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1030, pp. 434-441.
7. Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M., Nozawa Y. (2008), "Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen", *Int. J. Mol. Sci.* 9, pp. 355-370.
8. Alastair J.J., Wood M.D., (1998), "HIV-Protease inhibitors", *N. Engl. J. Med.* 338, pp. 1281-1292.
9. Anson B.D., Weaver J.G., Ackerman M.J., Akinsete O., Henry K., January C.T., Badley A.D. (2005), "Blockade of HERG channels by HIV protease inhibitors", *Lancet* 365, pp. 682-686.
10. Ariyoshi K., Matsuda M., Miura H., Tateishi S., Yamada K., Sugiura W. (2003), "Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection", *JAIDS* 33, pp. 336-342.
11. Bandaranayake R.M., Jeyabalan M.P, Kakizawa J., Sugiura W., and Schiffer C.A. (2008), "Structural analysis of HIV-1 CRF01_AE protease in complex with the substrate p1-p6 ", *J. Virol.* 82, pp. 6762-6766.

12. Baum E.Z., Bebernitz G.A. and Gluzman Y. (1990), "Isolation of mutants of human immunodeficiency virus protease based on the toxicity of the enzyme in *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, pp. 5573-5577.
13. Bradford M.M. (1976), "A dye binding assay for protein", *Anal. Biochem.* 72, pp. 248-254.
14. Brik A., Wong C.H. (2003). "HIV-1 protease: mechanism and drug discovery", *Org. Biomol. Chem.* 1, pp. 5 - 14.
15. Ceccherini-Silberstein F., Erba F., Gago F., Bertoli A., Forbici F., Bellocchi M.C., Gori C., D'Arrigo R., Marcon L., Balotta C., Antinori A., Monforte A.D., Perno C.F. (2004), "Identification of the minimal conserved structure of HIV-1 protease in the presence and absence of drug pressure", *AIDS* 18, pp. 9-11.
16. Chelur D., Unal O., Scholtyssek M., Strickler J. (2008), "Fusion tags for protein expression and purification" *BioPharm Inter. Supp.* nguồn <http://biopharminternational.findpharma.com>.
17. Chen H., Xu Z., Yin X., Cen P. (2007), "Cloning and expression of the HIV protein in *Escherichia coli* cell-free system", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, pp. 347-354.
18. Chen S.X., Wan M., Loh B.N. (1996), "Mangosteen demonstrates potent inhibitory activity against HIV-1", *Planta Med.* 62, pp. 381-382.
19. Cheng Y.S.E., Lo K.H., Hsu H.H., Shao Y.M., Yang W.B., Lin C.H., Wong C.H. (2006), "Screening for HIV protease inhibitors by protection against activity-mediated cytotoxicity in *Escherichia coli*" *J. Virol. Methods*, 137, pp. 82-87.
20. Cheng Y.S.E., McGowan M.H., Kettner C.A., Schloss J.V., Erickson S., Yin F.H. (1990), "High-level synthesis of recombinant HIV-1 protease and the recovery of active enzyme from inclusion bodies", *Gene* 87, pp. 243-248.
21. Daar E.S., Little S., Pitt J., Santangelo J., Ho P., Harawa N., Kerndt P., Glorgi J.V, Bai J., Gaut P., Richman D.D., Mandel S., Nichols S. (2001), "Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network", *Ann. Intern. Med.* 134, pp. 25-29.
22. Danley D.E., Geoghegan K.F., Scheld K.C., Lee S.E., Merson J.R., Hawrylik S.J., Rickett G.A., Atmnirati M.J. and Hobart P.M. (1989), "Crystallizable HIV-1 protease derived from expression of the viral pol gene in *Escherichia coli*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, pp. 1043-1050.

23. Darke P.L., Leu C.T., Davis L.J., Heimbach J.C., Diehl R.E., Hill W.S., Dixon R.A.F. and Siga I.S. (1989), "Human immunodeficiency virus protease bacterial expression and characterization of the purified aspartic protease", *J. Biol. Chem.* 264, pp. 2307-2312.
24. Debouck C., Gorniak J.G., Strickler J.E., Meek T.D., Metcalf B.W., Rosenberg M. (1987), "Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibit autoprocessing and specific maturation of the gag precursor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, pp. 8903-8906.
25. Dergousova N., Amerik A.U., Volynskaya A.M. and Rumsh L.D. (1996), "HIV-I protease cloning, expression, and purification", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, pp. 97-107.
26. Feinberg M.B. (1996), "Changing the natural history of HIV disease" *Lancet* 348, pp. 239-246.
27. Field J., Broek D., MacDonald B., Rodgers L., Wilson I.A., Lerner R.A. and Wigler M. (1988), "Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method", *Mol Cell. Biol.* 8, pp. 2159-2165.
28. Galli M., Ridolfo A.L., Adorni F., Gervasoni C., Ravasio L., Corsico L., Gianelli E., Piazza M., Vaccarezza M., d'Arminio Monforte A., Moroni M. (2002), "Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors", *JAIDS* 29, pp. 21-31.
29. Gong Y.F., Robinson B.S., Rose R.E., Deminie C., Spicer T.P., Stock D., Colonno R.J., Lin P.F. (2000), "In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632", *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44, pp. 2319– 2326.
30. Graves M.C., Lim J.J., Heimer, E.P. (1988) "An 11-kDa form of human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* is sufficient for enzymatic activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, pp. 2449-2453.
31. Greene W.C. (2007), "A history of AIDS: looking back to see ahead", *Eur. J. Immunol.* 37, pp. 94-102.
32. Guo J.S., Cheng C.L., Koo M.W. (2004), "Inhibitory effects of *Centella asiatica* water extract and asiaticoside on inducible nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in rats", *Planta Med.* 70, pp. 1150-1154.
33. Hare B.C., (2006), "Clinical Overview of HIV Disease", HIV Insite Knowledge Base Chapter- Nguồn www.hivinsite.ucsf.edu.

34. Hilton B.J., Wolkowicz R. (2010), "An assay to monitor HIV-1 protease activity for the identification of novel inhibitors in T-Cells", *PloS. One.* 5, pp. 1-7.
35. Hoffmann C., Rockstroh J.K., Kamps B.S. *HIV medicine* (2007), www. HIV Medicine.com.
36. Hsu Y.L., Kuo P.L., Lin L.T., Lin C.C. (2005), "Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 31, pp. 333-344.
37. Ido E., Han H.P., Kezdyll F.J. and Tang J. (1991), "Kinetic studies of human immunodeficiency virus type 1 protease and its active-site hydrogen bond mutant A28S", *J. Biol. chem.* 266, pp. 24359-24366.
38. Ishizaki A., Nguyen H.C., Pham V.T., Nguyen V.T., Kiyofumi S., Kageyama S., Ishigaki K., Tanuma J., Oka S. and Ichimura H. (2009), "Profile of HIV type 1 infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV type 1-infected individuals in Hai Phong, Viet Nam", *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 25, pp. 175-182.
39. Jacobsen H., Yasargil K., Winslow D.L., Craig J.C., Kröhn A., Duncan I.B., Mous J. (1995), "Characterization of HIV type 1 mutants with decreased sensitivity to proteinase inhibitor Ro 31-8959", *Virology* 206, pp. 527-534.
40. Jamison J.M., Gilloteaux J., Taper H.S. and Summers J.L. (2001), "Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of vitamin C and K-3 combinations against human prostate cancer", *J. Nutr.* 131, pp. 158-160.
41. Johnson V.A., Brun-Vézinet F., Clotet B., Conway B. (2006), "Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. Special contribution - drug resistance mutations", *Top. HIV. Med.* 14, pp. 125-130.
42. Johnson V.A., Brun-Vézinet F., Clotet B., Günthard H.F., Kuritzkes D.R., Pillay D., Schapiro J.M. and Richman, D.D. (2010), "Special contribution update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010", *Top. HIV. Med.* 18, pp. 156-163.
43. Jullaksorn D., Boonchawalit S., Uttiyoung J., Soonthornsata B., Yowang A., Krathong N., Chautrakul S., Ikuta K., Roobsoong A., Anitvittaya S., Sawanpanyalert P. and Kameoka M. (2010), "Sustained appearance of drug resistance-associated mutations in HIV-1 CRF01_AE protease and reverse transcriptase derived from protease inhibitor-naive Thai patients", *J. Trop. Med.* 41, pp. 347-357.

44. Kantor R., Katzenstein D.A., Efron B., Carvalho A.P., Wynhoven B., Cane P., Clarke J., Sirivichayakul S., Soares M.A., Snoeck J., Pillay C., Rudich H. et al. (2005), "Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration", *PloS. Med.* 2, pp. 0325-0337.
45. Kato K., Kusagawa S., Motomura K., Yang R., Shiino T., Nohtomi K., Sato H., Shibamura K., Nguyen T.H., Pham K.C., Pham H.T., Duong C.T., Nguyen C.Q., Bui D.T., Hoang T.L., Nagal Y. and Takebe Y. (2001), "Closely related HIV-1 CRF01_AE variant among injecting drug users in northern Vietnam: evidence of HIV spread across the Vietnam–China border". *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 17, pp. 113–123.
46. Kemp D.J., Isaacson J.D., King M.S., Brun S.C., Sylte J., Richards B., Bernstein B., Rode R., Sun E. (2002), "Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the HIV protease by coadministration with Ritonavir", *Antivir. Ther.* 7, pp. 165-174.
47. King N.M., Melnick L., Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E.A., Yang S.S., Gao Y., Nie X., Zepp C., Heefner D.L. and Schiffer C.A. (2000), "Lack of synergy for inhibitors targeting a multi-drug-resistant HIV-1 protease", *Protein Sci.* 44, pp. 2319-2326.
48. Komai T., Ishikawa Y., Yagi R., Suzuki-Sunagawa H., Nishigaki T., Handa H. (1997), "Development of HIV-1 protease expression methods using the T7 phage promoter system", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, pp. 241-245.
49. Kräusslich H.G., Ingraham R.H., Skoog M.T., Wimmer E., Pallai P.V. and Carter C.A. (1989), "Activity of purified biosynthetic proteinase of human immunodeficiency virus on natural substrates and synthetic peptides", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, pp. 807-811.
50. Laemmli U.K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 227, pp. 680-685.
51. Lambert J.D., Yang C.S. (2003), "Mechanisms of cancer prevention by tea constituents", *J. Nutr.* 133, pp. 3262S-3267S.
52. Lech W.J., Wang G., Yang Y.L., Chee Y., Dorman K., McCrae D., Lazzeroni L.C., Erickson J.W., Sinsheimer J.S., Kaplan A.H. (1996), "In vivo sequence diversity of the protease of human immunodeficiency virus type 1: presence of protease inhibitor-resistant variants in untreated subjects", *J. Virol.* 70, pp. 2038-2043.
53. Leuthardt A., Roesel J.L. (1993), "Cloning, expression and purification of a recombinant poly-histidine-linked HIV-1 protease", *FEBS Lett.* 36, pp. 275-280.
54. Liao H., Tee K.K., Hase S., Uenishi R., Li X.Z., Kusagawa S., Pham H.T., Pybus O.G., Takebe Y. (2009), "Phylogenetic analysis of the dissemination of HIV-1 CRF01_AE in Vietnam", *Virology* 391, pp. 51-56.

55. Liu J., Yue. J., Wu S., Yan Y. (2007), "Polymorphisms and drug resistance analysis of HIV-1 CRF01_AE strains circulating in Fujian Province, China", *Arch. Virol.* 152, pp. 1799-1805.
56. Louis J.M., Mcdonald R.A., Nashed N.T., Wondraku E.M., Jerina D.M., Oroszlan S., Mora P.T. (1991), "Autoprocessing of the HIV-1 protease using purified wild-type and mutated fusion proteins expressed at high level in *Escherichia coli*", *Eur. J. Biochem.* 199, pp. 361-369.
57. Louis J.M., Nashed N.T., Parris K.D., Kimmel A.R., Jerina D.M. (1994), "Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the gag-pol protein", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, pp. 7970- 7974.
58. Maki K.C., Reeves M.S., Farmer M., Yasunaga K., Matsuo N., Katsuragi Y., Komikado M., Tokimitsu I., Wilder D., Jones F., Blumberg J.B. and Cartwright Y. (2009), "Green tea catechin consumption enhances exercise-induced abdominal fat loss in overweight and obese adults", *J. Nutr.* 139, pp. 264-270.
59. Merrill D.P., Manion D.J., Chou T.V. and Hirsch M.S. (1997), "Antagonism between Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors Indinavir and Saquinavir in vitro", *J. Infect. Dis.* 176, pp. 265-268.
60. Michael N.L., Herman S.A., Kwok S., Dreyer K., Wang J., Christopherson C., Spadaro J.P., Young K.K., Polonis V., McCutchan F.E., Carr J., Mascola J.R., Jagodzinski L.L., Robb M.L. (1999), "Development of calibrated viral load standards for group M subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and performance of an improved amplicor HIV-1 monitor test with isolates of diverse subtypes", *J. Clin. Microbiol.* 37, pp. 2557-2563.
61. Mildner A.M., Rothrock D.J., Leone J.W., Bannow C.A., Lull J.M., Reardon I.M., Sarcich J.L., Howe W.J., Tomich C.C., Smith C.W., Heinrickson R.L. & Tomasselli A.G. (1994), "The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable of mutant with retained kinetic properties", *Biochemistry* 73, pp. 1391-1396.
62. Nakatani K., Yamakuni T., Kondo N., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Inoue H., Ohizumi Y. (2004), "Gamma-mangostin xanthone acts as anti-inflammatory", *Mol. Pharmacol.* 66, pp. 667-674.
63. Nashed N.T., Louis J.M., Sayer J.M., Wondrak E.M., Mora P.T., Oroszlan S., Jerina D.M. (1989), "Continuous spectrophotometric assay for retroviral protease of HIV-1 and AMV", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, pp. 1079-1085.

64. Navia M.A., Fitzgerald P.M., McKeever B.M., Leu C.T., Heimback J.C., Herber W.K., Sig I.S., Darke P.L., Springer J.P. (1989), "Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1", *Nature* 337, pp. 615-620.
65. Nguyen T.H.L., Recordon-Pinson P., Pham V.H., Nguyen T.V.U., Truong T.X.L., Huynh T.T., Garrigue I., Schrive M.H., Pellegrin I., Lafon M.E., Aboulker J.P., Barre'-Sinoussi F. and Fleury H.J. (2003), "HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 study. Large predominance of CRF01_AE and presence of major resistance mutations to antiretroviral drugs", *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 19, pp. 925-928.
66. Nijhuis M., Schuurman R., de Jong D., Erickson J., Gustchina E., Albert J., Schipper P., Gulnik S., Boucher C.A. (1999), "Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy", *AIDS* 13, pp. 2349-2359.
67. Nolan D. (2003), "Metabolic complications associated with HIV protease inhibitor therapy", *Drugs* 63, pp. 2555-2574.
68. Noor M.A, Parker R.A., O'Mara E., Grasela D.M., Currie A., Hodder S.L., Fiedorek F.T., Haas D.W. (2004), "The effects of HIV protease inhibitors atazanavir and lopinavir/ritonavir on insulin sensitivity in HIV-seronegative healthy adults", *AIDS* 18, pp. 2137-2144.
69. Ohtaka H., Schon A. and Freire E. (2003), "Multidrug Resistance to HIV-1 Protease Inhibition Requires Cooperative Coupling between Distal Mutations", *Biochemistry* 42, pp. 13659-13666.
70. O'Loughlin T.L, Greene D.N., Matsumura I. (2006), "Diversification and specialization of HIV protease function during in vitro evolution", *Mol. Biol. Evol.* 23, pp. 764-772.
71. Phan T.N., Bucker T., Sheng J., Baldeck, J.D. and Marquis R.E. (2004), "Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms and enhanced peroxide killing", *Oral. Microbiol. Immunol.* 19, pp. 31-38.
72. Phan T.N., Reidmiller J.S. and Marquis R.E. (2001), "Selective sensitization of bacteria to peroxide damage associated with fluoride inhibition of catalase and pseudocatalase", *Oral. Microbiol. Immunol.* 16, pp. 28-33.
73. Phan T.T.C., Ishizaki A., Phung D.C., Bi X., Oka S. and Ichimura H. (2010), "Characterization of HIV type 1 genotypes and drug resistance mutations among drug-

- naive HIV type 1-infected patients in northern Vietnam", *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 26, pp. 233-236.
74. Ramanathan M., Sivakumar S., Anandvijayakumar P.R., Saravanababu C. (2007), "Neuroprotective evaluation of standardized extract of *Centella asiatica* in monosodium glutamate treated rats", *Indian J. Exp. Biol.* 45, pp. 425-431.
75. Rangwala S.H., Finn R.F., Smith C.E., Berberich S.A., Salsgiver W.J., Stallings W.C., Glover G.I., Olins P.O. (1992), "High-level production of active HIV-1 protease in *Escherichia coli*", *Gene* 122, pp. 263-269.
76. Rao M., Tanksale A., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998), "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, pp. 600-601.
77. Richards A.D., Phylip L.H., Farmerie W.G., Scarborough P.E., Alvares A., Dunn B.M., Hirel H., Konvalinka J., Strop P., Pavlickova L., Kostla J., Kay V. (1990), "Sensitive, soluble chromogenic substrates for HIV-1 proteinase", *J. Biol. Chem.* 265, pp. 7733-7736.
78. Rittenhouse J., Turon M.C., Helfrich R.J., Albrecht K.S., Weig I.D., Simmer R.L., Mordini F., Erickson J. and Kohlbrennerl W.E. (1990) "Affinity purification of HIV-1 and HIV-2 proteases from recombinant *E. coli* strains using pepstatin-agarose", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, pp. 60-66.
79. Robbins G.K., De Gruttola V., Shafer R.W., Smeaton L.M., Snyder S.W., Pettinelli C., Dubé M.P., Fischl M.A., Pollard R.B., Delapenha R., Gedeon L., van der Horst C., Murphy R.L., Becker M.I, D'Aquila R.T., Vella S., Merigan T.C., Hirsch M.S. (2003), "Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection", *N. Engl. J. Med.* 349, pp. 2293-2303.
80. Rose J.R., Saltol R. and Craik C.S. (1993), "Regulation of autoproteolysis of the HIV-1 and HIV-2 proteases with engineered amino acid substitutions", *J. Biol. Chem.* 268, pp. 11939-11945.
81. Rozzelle J.E., Dauber D.S., Todd S., Kelley R., and Craiki C.S. (2000), "Macromolecular inhibitors of HIV-1 protease characterization of designed heterodimers", *J. Biol. Chem.* 275, pp. 7080-7086.
82. Sabbioni E., Blanch N., Baricevic K. and Serra M.A. (1999), "Effects of trace metal compounds on HIV-1 reverse transcriptase an *in vitro* study", *Biol. Trace. Elem. Res.* 68, pp. 107-119.
83. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977), *DNA sequencing with chain terminator inhibitors*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, pp. 5463-5467.

84. Seelmeier S., Schmidt H., Turk, V. and Helm K.V.D. (1988), "Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, pp. 6612-6616.
85. Shedlock D.J., Daniel H., Andy Y.C., Christopher W.C., Karuppiyah M., David B.W. (2008), "HIV-1 viral gene and mitochondria apoptosis", *Apoptosis* 13, pp. 1088-1099.
86. Shukla P.K., Khanna V.K., Ali M.M., Khan M.Y., Srimal R.C. (2008), "Anti-ischemic effect of curcumin in rat brain", *Neurochem. Res.* 33, pp. 1036-1043
87. Siliciano J.D., Kajdas J., Finzi D., Quinn T.C., Chadwick K., Margolick J.B., Kovacs C., Gange S.J., Siliciano R.F. (2003), "Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells", *Nat. Med.* 9, pp. 727-728.
88. Snow A., Hipkiss A.P. (1987), "Stability of urogastrone and some fusion derivatives and induction of stress proteins in *Escherichia coli*", *Biochem. Soc. Trans.* 15, pp. 965-969.
89. Srivastava K.C., Bordia A., Verma S.K. (1995), "Curcumin, a major component of the food spice turmeric (*Curcuma longa*), inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets", *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52, pp. 223-227.
90. Sui Z., Salto R., Li J., Craik C., Montellano P.R.O. (1993), "Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes", *Bioorg. Med. Chem.* 1, pp. 415-422.
91. Sutton S.V.W., Bender G.R. and Marquis R.E. (1987), "Fluoride inhibition of proton-translocating ATPases oral bacterial", *Infect. Immun.* pp. 2597-2603.
92. Taylor A., Brown P.D., Kadam S., Maus M., Kohlbrenner E.W., Weigl D., Turon C.M. and Katz L. (1992), "High-level expression and purification of mature HIV-1 protease in *Escherichia coli* under control of the *araBAD* promoter", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, pp. 205-210.
93. Tie Y. (2006), *Crystallographic analysis and kinetic studies of HIV-1 protease and drug-resistant mutants*, Chemistry Dissertations, Department of Chemistry, Georgia State University, p. 2.
94. Tomasselli A.G., Olsen M.K., O-Hui J., Staples D.J., Sawyer T.K., Heinrikson R.L., C-Tomich C.S. (1990), "Substrate analog inhibition and active site titration of purified recombinant HIV-1 protease", *Biochemistry* 29, pp. 264-269.
95. Trottier B., Walmsley S., Reynes J., Piliero P., O'Hearn M., Nelson M., Montaner J., Lazzarin A., Lalezari J., Katlama C., Henry K., Cooper D., Clotet B., Arastéh K. (2005),

- "Safety of enfuvirtide in combination with an optimized background of antiretrovirals in treatmentexperienced HIV-1-infected adults over 48 weeks" *JAIDS* 40, pp. 413-421.
96. UNAIDS in Vietnam from www.unaids.org.vn.
 97. United nations program on HIV/AIDS, U. W. A. Epidemic update December 2010.
 98. Vajraguptaa O., Boonchoong P., Morrisc G.M. and Olsonc A.I. (2005), "Active site binding modes of curcumin in HIV-1 protease and integrase", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, pp. 3364-3368.
 99. Valer L., De Mendoza C., De Requena D.G. (2002), "Impact of HIV genotyping and drug levels on the response to salvage therapy with saquinavir/ritonavir", *AIDS* 16, pp. 1964-1966.
 100. Van der Valk M., Reiss P. (2003), "Lipid profiles associated with antiretroviral drug choices", *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, pp. 19-23.
 101. Weiss R. (2001), "Gulliver's travels in HIVland", *Nature* 410, pp. 963-967.
 102. Wensing A.M., Boucher C.A. (2003), "Worldwide transmission of drug-resistant HIV", *AIDS Rev.* 5, pp. 140-155.
 103. Wensing A.M., an de Vijver D.A., Angarano G. (2005), "Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management", *J. Infect. Dis.* 192, pp. 958-966.
 104. Wilson J.W. (2003), "Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care", *AIDS* 13, pp. 25-38.
 105. Wlodawer A. and Vondrasek J. (1998), "Inhibitors of HIV-1 protease:a major success of structure-assisted drug design", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, pp. 249-84.
 106. Yanchunas J., Langley D.R., Tao L., Rose R.E., Friberg J., Colonno R.J., Doyle M.L. (2005), "Molecular basis for increased susceptibility of isolates with atazanavir resistance-conferring substitution I50L to other protease inhibitors", *Antimicrob Agents Chemother.* 49, pp. 3825-3832.
 107. Yu Y.B., Miyashiro H., Nakamura N., Hattori M. and Park J.C. (2007), "Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from alnus firma on HIV-1 viral enzymes", *Arch. Pharm. Res.* 30, pp. 820-826.