

Một số đột biến trong gen mã hóa protease HIV type -1 phân lập ở Việt Nam

Nguyễn Thị Hồng Loan, Nguyễn Văn Dũng, Nguyễn Thị Trang Huyền,
Nguyễn Thị Vân Anh, Phan Tuấn Nghĩa*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 30 tháng 5 năm 2011

Tóm tắt. Bằng cách nhân dòng và xác định trình tự đoạn gen mã hoá cho protease của HIV phân lập tại Việt Nam, chúng tôi đã phát hiện thấy 10 loại đột biến thay thế axit amin khác nhau (I13V, I15V, G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, N83T và L89M) trong 8 trình tự gen được khảo sát. Khi so sánh với các đột biến trong ngân hàng dữ liệu HIV quốc tế (<http://hivdb.stanford.edu>) thì thấy rằng trong số 10 đột biến vừa nêu, đột biến xảy ra ở vị trí nucleotide 248 (A248C), dẫn đến sự thay thế asparagine bằng threonine ở vị trí 83 (N83T) trong chuỗi polypeptide là thuộc nhóm đột biến kháng nhẹ thuốc ức chế protease (minor mutation). Chúng tôi đang tiến hành nghiên cứu biểu hiện gen này để xem xét một số tính chất xúc tác của enzyme.

Từ khóa: HIV, Protease HIV-1, đột biến kháng thuốc.

1. Mở đầu

Virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) bao gồm type 1 và 2, trong đó virus type 1 (gọi tắt là HIV-1) là nguyên nhân gây ra hội chứng suy giảm miễn dịch (AIDS) ở người. Bệnh lây qua đường máu và cho đến nay thế giới vẫn chưa có vaccine để ngăn ngừa căn bệnh hiểm nghèo này. Từ năm 2003 liệu pháp dùng thuốc chống virus (ART-antiretroviral drug therapy) bao gồm thuốc ức chế enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase), thuốc ức chế integrase và thuốc ức chế protease (PI) đã được áp dụng ở nước ta giúp giảm tỷ lệ mắc và tử vong do HIV. Tuy nhiên, HIV có tốc độ

đột biến cao và luôn tạo ra các chủng mới dẫn đến khả năng kháng thuốc ART. Tỷ lệ kháng ART nói chung ở các bệnh nhân nhiễm HIV-1 tại Thành phố Hồ Chí Minh là 6,5% năm 2003; ở Hà Nội là dưới 5% năm 2006 và ở Hải Phòng là 2,9% năm 2007 [1]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập quy trình nhân dòng và đọc trình tự gen mã hóa protease HIV-1 nhằm phát hiện các đột biến trong trình tự gen mã hóa protease HIV-1 của bệnh nhân chưa điều trị và bệnh nhân đang điều trị bằng thuốc PI ở Việt Nam, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về đánh giá hiệu quả ức chế của một số thuốc PI lên protease HIV-1 đột biến.

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-35575497.
E-mail: phantn@fpt.vn

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu huyết thanh có HIV-1 từ bệnh nhân chưa điều trị và đang điều trị bằng thuốc PI được thu từ Viện Các bệnh truyền nhiễm và Nhiệt đới Quốc gia. Kit nhân dòng gen trực tiếp pGEM-T easy của hãng Promega, các oligonucleotide được mua từ hãng Invitrogen; thang chuẩn DNA của hãng Fermentas; vector, kit tinh sạch đồng thời DNA/RNA có độ nhạy cao QIAmp UltraSen Virus của hãng Qiagen. Enzyme reverse transcriptase được mua từ hãng Enzymomics (Hàn Quốc) và kit đọc trình tự của hãng Beckman coulter cùng các hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn cho nghiên cứu.

2.2. Phương pháp

Tinh sạch hệ gen virus và tổng hợp cDNA: Hệ gen của HIV-1 (RNA) trong huyết thanh được phân lập và tinh sạch theo QIAmp UltraSen Virus kit. cDNA được tổng hợp bằng cách sử dụng 10 µl RNA và 1 µl môi ngẫu nhiên (0,2 µg) được biến tính ở 70°C trong 5 phút và được làm lạnh trên đá, hỗn hợp phản ứng sau đó được bổ sung 4 µl đệm M-MLV reverse transcriptase 5x; 2,5 µl dNTPs 2 mM; 1,5 µl H₂O và 1 µl M-MLV reverse transcriptase và ủ ở 37°C trong 90 phút. Phản ứng được kết thúc bằng xử lý ở 70°C trong 10 phút và làm lạnh trên đá.

Nhân bản các đoạn gen đặc hiệu của virus bằng PCR: Gen mã hóa protease (*prot*) của HIV-1 được nhân bản bằng kỹ thuật RT-PCR “lồng” với cặp môi ngoài là HIVF1 (5'-ATGCTGCAGAGAGGCAATTT-3') và HIVR1 (5'-GGCAAATACTCGAGTATTGT-3) và cặp môi trong là HIVF2 (5'-GGGCGGATCCACTAGT GGAAGTGTATCCTTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGGC

-3' có chứa điểm cắt của *SpeI* và *BamHI*) và HIVR2 (5'- GAGTCCTCGAGAAAATTTAAAGTGCAGCCAATCTG-3' có chứa điểm cắt của *XhoI*). Các cặp môi này được thiết kế dựa trên trình tự gen protease của HIV-1 [2, 3]. PCR được thực hiện qua 2 vòng phản ứng với tổng thể tích 25 µl. Thành phần phản ứng vòng 1 bao gồm: 1x đệm Taq DNA polymerase; 2,5 đơn vị Taq DNA polymerase; 0,4 mM dNTPs; 3 µl cDNA (10 ng - 5 µg) và 10 pmol môi ngoài. 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 môi 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 môi ngoài được thay bằng cặp môi trong, chu trình nhiệt gắn môi ở 53°C và thực hiện với 40 chu kỳ.

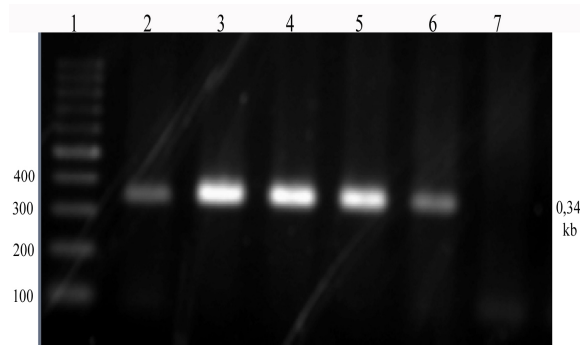
Nhân dòng gen: Sản phẩm PCR được tách dòng trực tiếp vào vector pGEM-T dạng mạch thẳng có đầu dính T (theo kit pGEM T easy của Promega). Sản phẩm nhân dòng được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α và các tế bào biến nạp được nuôi cấy trên môi trường LB chứa ampicilin 50 µg/ml với sự cảm ứng của IPTG và cơ chất Xgal. Plasmid tái tổ hợp được tách ra từ các khuẩn lạc trắng và kiểm tra sự có mặt của *prot* HIV-1 bằng PCR với các cặp môi của vector và môi đặc hiệu của gen mã hóa.

Giải trình tự và phân tích kết quả: Các sản phẩm PCR mong muốn được đọc trình tự trực tiếp theo phương pháp Sanger trên máy giải trình tự tự động CEQ 8000 (Beckman Counter). Các gen *prot* HIV-1 sau khi đọc trình tự sẽ được so sánh và phân tích tìm đột biến với các trình tự tương ứng trong ngân hàng HIV quốc tế (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index> và <http://hivdb.stanford.edu>).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nhân bản đoạn gen mã hóa protease của HIV-1 bằng RT-PCR “lồng”

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tinh sạch RNA từ huyết thanh 20 bệnh nhân nhiễm HIV-1 chưa điều trị ART và 30 bệnh nhân nhiễm HIV-1 đang điều trị bằng thuốc PI. Gen mã hóa protease HIV-1 đã nhân bản được bằng kỹ thuật RT-PCR “lồng” với hai cặp mồi HIV-F1, HIV-R1 và HIV-F2, HIV-R2 được thiết kế dựa trên trình tự đoạn gen 297 bp mã hóa cho protease HIV-1 của người Việt Nam đã được công bố trên ngân hàng gen thế giới [2]. Để thuận tiện cho việc biểu hiện sau này, trên trình tự mồi HIV-F2 còn có trình tự 21 nucleotide mã hóa cho 7 axit amin của gen *gag-pol* và trình tự nhận biết của hai enzyme giới hạn *BamHI* và *SpeI*; trên mồi HIV-R2 cũng có trình tự nhận biết của *XhoI*. Tổng chiều dài đoạn gen và phần mồi thiết kế thêm là 345 bp.



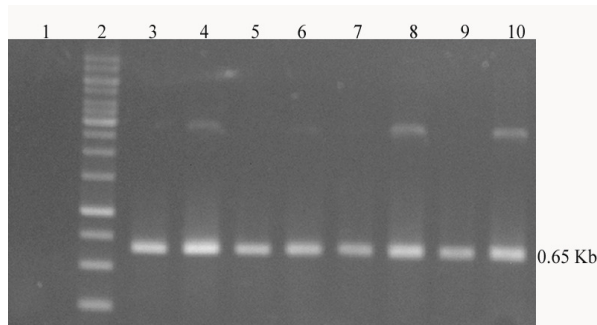
Hình 1. Kết quả nhân bản gen mã hóa protease HIV-1 bằng RT-PCR lồng.

Giếng 1: Thang chuẩn 100 bp; giếng 2-6: Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *prot* từ các bệnh nhân nhiễm; giếng 7: đối chứng âm (mẫu không nhiễm HIV)

Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2% (hình 1) cho thấy chúng tôi đã nhân

bản thành công đoạn gen với kích thước như tính toán lý thuyết (345 bp) từ một số mẫu máu bệnh nhân nhiễm HIV-1. Tuy nhiên, trong 20 mẫu bệnh nhân nhiễm HIV-1 chưa điều trị ART, chỉ có 6 mẫu thu được kết quả PCR dương tính, và trong số 30 mẫu nhiễm HIV đang điều trị ART, chúng tôi chỉ thu được kết quả PCR dương tính với 2 bệnh nhân. Tỷ lệ phát hiện thấp này có thể là do các bệnh nhân đang điều trị HIV-1 bằng thuốc ART có nồng độ virus rất thấp nên khó được phát hiện bằng RT-PCR. Hơn nữa, để phát hiện sự có mặt của HIV-1 bằng PCR thì gen *gag*, được xem là bảo thủ nhất giữa các nhóm, phân nhóm HIV, được dùng làm gen đích, chứ không phải là gen mã hóa protease HIV-1 [4]. Mức độ bảo thủ thấp của gen protease HIV-1 cũng có thể là nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ phát hiện HIV thấp.

Các sản phẩm PCR chứa các đoạn gen nhân bản (345 bp) mã hóa protease HIV-1 từ các mẫu huyết thanh khác nhau được gắn trực tiếp vào vector nhân dòng pGEM-T. Từ các khuẩn lạc xuất hiện (chủ yếu là các khuẩn lạc trắng), chúng tôi đã chọn ngẫu nhiên mỗi mẫu một khuẩn lạc trắng (làm nguồn cho DNA khuôn) để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen nhân dòng bằng PCR sử dụng cặp mồi pGEM.Fw và pGEM.Rv được thiết kế đặc hiệu cho vector pGEM để kiểm tra sự có mặt của gen đích trong vùng nhân dòng. Theo tính toán lý thuyết, nếu vector có mang đoạn gen *prot* HIV-1 thì sản phẩm PCR thu được sẽ có kích thước 645 bp, bao gồm đoạn gen *prot* HIV-1 345 bp và đoạn DNA 300 bp của vector pGEM. Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng DNA từ khuẩn lạc trắng làm khuôn (Hình 2) cho thấy, tất cả các khuẩn lạc trắng được lựa chọn đều cho băng DNA nhân bản với kích thước khoảng 0,65 kb, chứng tỏ các chúng đều chứa plasmid tái tổ hợp với đoạn gen *prot* HIV-1.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với khuôn là các khuẩn lạc trắng.

Giếng 1: đối chứng âm, giếng 2: thang chuẩn DNA 100 bp, giếng 3-10: sản phẩm PCR với khuôn là DNA từ các khuẩn lạc trắng.

3.2. Xác định trình tự các đoạn gen mã hóa protease HIV-1

Chúng tôi đã tách plasmid từ các khuẩn lạc trắng và tiến hành xác định trình tự các đoạn gen mã hóa protease của HIV-1 từ 8 mẫu có kết quả dương tính PCR. Kết quả phân tích các trình tự nucleotide của gen *prot* HIV-1 thu được trong nghiên cứu của chúng tôi (không nêu chi tiết ở đây) khi được so sánh với ngân hàng dữ liệu HIV quốc tế [5] cho thấy chúng đều thuộc chủng CRF01_AE đã phân lập được ở phía bắc Việt Nam và tỉnh Guangxi miền Nam Trung Quốc. Nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Ishizaki và tập thể trên 294 bệnh nhân nhiễm HIV-1 chưa điều trị ART tại Hải Phòng năm 2009 [2] và các nghiên cứu trước đây cho rằng chủng CRF01-AE là phổ biến ở các tỉnh phía bắc Việt Nam dọc theo biên giới Việt – Trung từ tỉnh GuangXi (Trung Quốc) đến Hà Nội [6]. Các trình tự gen của 8 mẫu nghiên cứu (ký hiệu từ BN1-BN8) đã được đăng ký vào ngân hàng gen thế giới (GeneBank) với các mã số (accession number): HQ317454, JF276387 –

JF276391, HQ890881 và JF276392 tương ứng cho các mẫu từ 1-8 (bảng 1).

Kết quả phân tích trong ngân hàng dữ liệu HIV-1 Stanford [7] cho thấy trình tự axit amin suy diễn của protease HIV-1 từ 8 mẫu nghiên cứu thu được có 10 loại đột biến thay thế gốc axit amin khác nhau (bảng 1) và trong số này không có đột biến nào thuộc nhóm đột biến chính (major mutation) mà chỉ có một đột biến phụ (minor mutation) N83T được tìm thấy ở bệnh nhân đang điều trị PI (BN7*).

Đã có một số đột biến được phát hiện tại vị trí axit amin 83, trong đó hay xảy ra là đột biến N83T, nhưng chỉ có một vài đột biến như N83D là làm giảm hiệu quả khi điều trị với thuốc ức chế protease là tipranavir/r[®]. Ngoài ra, đột biến M36I xuất hiện với tần suất cao nhất trong tất cả các mẫu phân tích và đã được các nghiên cứu trước đây chỉ ra là đột biến phụ làm giảm tác dụng của thuốc ức chế protease trong các nhóm HIV-1 thuộc phân nhóm B phổ biến ở Mỹ và các nước Tây Âu [7]. Điều này chứng tỏ bệnh nhân đã nhiễm phải các chủng đột biến có khả năng làm giảm tác dụng của PI trước khi điều trị. Theo nghiên cứu của Wensing và tập thể [8] trên 1.050 bệnh nhân thì có tới 9,1% bệnh nhân nhiễm HIV-1 đã mang virus kháng thuốc và dưới 1% bệnh nhân mang virus kháng với 2 nhóm thuốc. Do đó, xét nghiệm kháng thuốc theo hướng phát hiện đột biến gen mã hóa protease HIV-1 có vai trò rất quan trọng trong việc xây dựng phác đồ điều trị HIV/AIDS cho mỗi bệnh nhân nhiễm HIV-1 [1, 9]. Hiện tại, chúng tôi đang tiến hành biểu hiện gen mã hóa protease HIV-1 có chứa đột biến N83T để nghiên cứu một số đặc trưng xúc tác của nó cũng như sự ảnh hưởng của một số PI lên hoạt độ của nó.

Bảng 1. Một số đột biến trong gen mã hoá của protease HIV-1 phân lập tại Việt Nam

STT	Mã bệnh nhân	Ký hiệu mẫu	Mã số (accession number) đăng ký trong ngân hàng gen thế giới	Đột biến (được dịch ra mức protein)
1	BN1	01VN.HN23209	HQ317454	G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M
2	BN2	03VN.HN0609	JF276387	I13V, G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, L89M
3	BN3	04VN.HN0609	JF276388	G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M
4	BN4	05VN.HN0609	JF276389	G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M
5	BN5	06VN.HN0609	JF276390	G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M
6	BN6	07VN.HN0609	JF276391	G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M
7	BN7*	02VN.HN27510	HQ890881	I13V, I15V, M36I, R41K, H69K, N83T, L89M
8	BN8*	08VN.HN27510	JF276392	I13V, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, L89M

Ghi chú: * bệnh nhân được điều trị ART

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện thấy 10 loại đột biến thay thế axit amin (I13V, I15V, G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, N83T và L89M) trong 8 trình tự gen mã hóa protease HIV-1 phân lập từ các bệnh nhân nhiễm HIV-1 khác nhau. Trong đó đột biến thay thế asparagine bằng threonine ở vị trí axit amin 83 (N83T) trong chuỗi polypeptide là thuộc nhóm đột biến kháng nhẹ thuốc ức chế protease.

Lời cảm ơn

Công trình được hỗ trợ kinh phí bởi đề tài mã số TN-10-27 của Trường ĐHKHTN và đề tài KLEPT.09.01 thuộc kinh phí hỗ trợ thường xuyên của Bộ Khoa học và Công nghệ dành cho Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein. Các tác giả chân thành cảm ơn Viện Các bệnh truyền nhiễm và Nhiệt đới Quốc gia đã cung cấp các mẫu bệnh phẩm.

Tài liệu tham khảo

- [1] T.T.C. Phan, A. Ishazaki, D.C. Phung, X. Bi, S. Oka, H. Ichimura, Characterization of HIV Type 1 Genotypes and Drug Resistance Mutations Among Drug-Naive HIV Type 1-Infected Patients in Northern Vietnam. *AIDS Res Hum Retrovir* 26 (2010) 233.
- [2] A. Ishizaki, H.C. Nguyen, V.T. Pham, V.T. Nguyen, K. Saijoh, S. Kageyama, K. Ishigaki, J. Tanama, S. Oka and H. Ichimura, Profile of HIV-1-infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV-1-infected individuals in Hai Phong, Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25 (2009) 175.
- [3] W.J. Lech, G. Wang, Y.L. Yang, Y. Chee, K. Dorman, D. McCrae, L.C. Lazzeroni, J.W. Erickson, J.S. Sinsheimer, A.H. Kaplan, *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 (1996) 2038.
- [4] N.L. Michael, S.A. Herman, S. Kwok, K. Dreyer, J. Wang, C. Christopherson, J.P. Spadoro, K.K. Young, V. Polonis, F.E. McCutchan, J. Carr, J.R. Mascola, L.L. Jagodzinski, M.L. Robb, 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 (1999) 2557.

- [5] <http://hiv.lanl.gov>
- [6] K. Kato, S. Kusagawa, K. Motomura, R. Yang, T. Shiino, K. Nohtomi, K. Sato, K. Shibamura, T.H. Nguyen, K.C. Pham, H.T. Pham, C.T. Duong, C.Q. Nguyen, D.T. Bui, T.L. Hoang, Y. Nagai, Y. Takebe, Closely related HIV-1 CRF01_AE variant among injecting drug users in Vietnam: Evidence of HIV spread across the Vietnam-China border. *AIDS Res Hum Retrovir* 20 (2001)113.
- [7] <http://hivdb.stanford.edu>.
- [8] A.M. Wensing, C.A. Boucher Worldwide transmission of drug-resistant HIV, *AIDS Res Hum Retrovir*. 5 (2003) 140-55.
- [9] A. Caumont, T.H.L. Nguyen, T.V.U. Nguyen, V.H. Pham, E. Schvoerer, M.S.G. Urriza, P. Roques, M.H. Schrive, T.T.X. Lien, M.E. Lafon, D. Dormont, F.B. Sinoussi, H.J.A. Fleury, Sequence Analysis of *env* C2/V3, *gag* p17/p24, and *pol* Protease Regions of 25 HIV Type 1 Isolates from Ho Chi Minh City, Vietnam, *AIDS Res Hum Retrovir* 13 (2001) 1285.

Some mutations in protease-encoding gene of HIV-type 1 isolated from Vietnam

Nguyen Thi Hong Loan, Nguyen Van Dung, Nguyen Thi Trang Huyen,
Nguyen Thi Van Anh, Phan Tuan Nghia

Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the causative agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in humans. Upto date no effective vaccine is available for prevention of the disease. Antiretroviral drug therapy at the present time is based on specific inhibitors of reverse transcriptase, integrase and pretease which are essential of the virus to multiply in the host. However, mutations in HIV genome have occurred at a high rate, which make the virus become resistant to the drugs. Investigation of the mutations in each gene of the HIV genome enables to develop better drugs for HIV/AIDS treatment.

In our present study, the gene encoding for protease of HIV-1 isolated from Vietnamese patients was amplified by using RT-nested-PCR with 2 pairs of primers, cloned and sequenced. The analysis of the obtained HIV-1 protease sequences was shown to have 10 different amino acid replacement mutations (I13V, I15V, G16E, E35D, M36I, R41K, H69K, V82I, N83T and L89M) in the protease HIV-1 polypeptide of 8 different samples, of which the N83T belongs to the minor mutation group of the gene. The expression of the mutated gene was in progress for characterization of the obtained protease.

Keywords: HIV, HIV-1 protease, drug resistance mutation.