TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ VÙNG *PRE*S GIEN KHÁNG NGUYÊN BỀ MẶT CỦA VIRÚT VIÊM GAN B

ĐỔNG VĂN QUYỀN, ĐINH DUY KHÁNG

Viện Công nghệ sinh học

YU YEON GYU

Viện Khoa học và Công nghệ Hàn Quốc

Viêm gan do virút viêm gan B (HBV) hiện đang là vấn đề sức khỏe y tế cộng đồng toàn cầu, là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây nên bệnh viêm gan mãn tính và xơ gan [1, 11]. Theo ước tính của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), hiện có trên 2 tỷ người có tiền sử nhiễm HBV và khoảng 400 triệu người nhiễm HBV mãn tính, số người chết liên quan trực tiếp đến nhiễm HBV hàng năm lên tới 2 triệu người [4, 7]. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có một hóa trị liệu nào đặc hiệu để điều trị bệnh viêm gan B. Phương pháp duy nhất để tránh bị viêm gan B là dự phòng bằng vắc xin, đây cũng được coi là phương pháp hữu hiệu để dự phòng ung thư gan nguyên phát [5, 9].

Riêng ở Việt Nam, theo các báo cáo của các tác giả khác nhau, tỷ lệ nhiễm HBV dao động từ 10-15% [2, 10]. Trong đó khoảng 20% trường hợp viêm gan B mạn tính chuyển thành xơ gan với những triệu chứng nặng, có thể dẫn đến tử vong. Việt Nam hiện được xếp vào một trong số các quốc gia có tỷ lệ người nhiễm HBV cao nhất thế giới.

Việc thanh toán được căn bệnh hiểm nghèo này phụ thuộc vào tính hiệu lực, độ an toàn của các loại vắc xin viêm gan B đang lưu hành. Các hướng nghiên cứu hiện nay đều nhằm tìm ra một loại vắc xin có hiệu lực và độ an toàn cao, hay nói cách khác là có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch mạnh của cơ thể đối với HBV và không gây các phản ứng phụ. Một trong các hướng nghiên cứu đó là tạo ra vắc xin viêm gan B tái tổ hợp (recombinant vaccine) trên cơ sở tách dòng và biểu hiện gien kháng nguyên bề mặt của virút viêm gan B, bao gồm cả vùng *pre*S và S. Ngoài ra, việc phát hiện sớm sự lây nhiễm HBV, từ đó có những liệu pháp điều trị kịp thời là vô cùng quan trọng và cần thiết, đây cũng là vấn đề được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm nghiên cứu.

Trong bài này, chúng tôi thông báo kết quả phân lập vùng *pre*S gien kháng nguyên bề mặt của virút viêm gan B, bước đầu tiên trong việc hoàn thiện bộ Kit chẩn đoán sự lây nhiễm virút viêm gan B.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

ADN tổng số tách chiết từ khối u của bệnh nhân ung thư gan có mang ADN của virút viêm gan B đã được tách chiết và bảo quản ở -75^{0}C.

Các cặp mồi đặc hiệu để tách dòng vùng *pre*S, được thiết kế bằng chương trình phần mềm PC/Gene và được tổng hợp tại Trung tâm Nghiên cứu sinh học cấu trúc, Viện Khoa học và Công nghệ Hàn Quốc, có trình tự như sau:

Cặp mồi 1:

HBVBN1: 5'- ATC GCG CCA TGG GGA CGA ATC TTT CTG TTC CC-3'

HBVVN2: 5' - GCT ACC GGA TCC TAA CGC CGC AGA CAC ATCCAG CGA TGA-3'

Cặp mồi 2:

Q-BamHI: 5'-GGCATCGGATCCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCC-3'

*Bam*H I

Q-SalI : 5'-GTCACCGTCGACTGAGGTTGGGGACTGCGAATTTTG-3'

Sal I

PCR được tiến hành theo chương trình:

Bước 1: 94°C - 3 phút Bước 2: 94°C - 1 phút

Bước 3: 55°C - 50 giây Bước 4: 72°C - 1 phút

Lập lại 30 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4

Bước 5: 72°C - 8 phút.

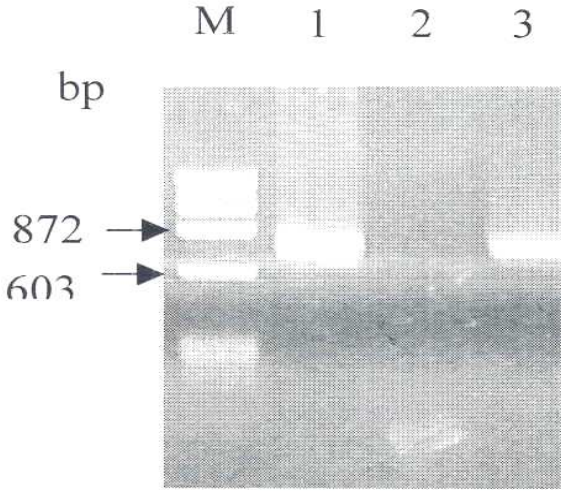
Tách dòng gien được tiến hành bằng gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vectơ pCR™2.1, sau đó được biến nạp vào *E. coli* chủng DH5α.

Xác định trình tự nucleotit của đoạn gien tách dòng được thực hiện theo phương pháp của Sanger và cs. [6].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Để tách dòng và biểu hiện vùng *pre*S, trước hết chúng tôi phải tách ADN chứa bộ gien của HBV, công việc này đã được phòng thí nghiệm của chúng tôi tiến hành trước đây [3]. Sau khi đã tách chiết được ADN chứa hệ gien của HBV chúng tôi tiến hành phân lập vùng *pre*S bằng kỹ thuật PCR lồng (nested PCR). Dựa vào trình tự vùng *pre*S đã được công bố trong Ngân hàng Dữ liệu gien Quốc tế, chúng tôi thiết kế các cặp mồi đặc hiệu để nhân bản vùng *pre*S. Với kỹ thuật PCR lồng, chúng tôi sử dụng 2 cặp mồi. Cặp mồi thứ nhất sẽ tạo ra sản phẩm PCR có kích thước khoảng 1400 cặp bazơ chứa toàn bộ gien kháng nguyên bề mặt của virút viêm gan B (*hbs*+*preS*).

Sau khi khuếch đại bằng kỹ thuật PCR, sản phẩm PCR vòng một được điện di kiểm tra trên gel agaroza 1%. Kết quả điện di được phản ánh ở hình (1). Do lượng ADN của HBV so với lượng ADN tổng số được tách từ khối u của bệnh nhân ung thư gan rất nhỏ, vì vậy trong nhiều trường hợp nếu chỉ sử dụng PCR một lần, hay nói cách khác là chỉ dùng một cặp mồi thì sẽ không tạo ra được sản phẩm PCR mong muốn (hình 1) vì lượng ADN khuôn quá thấp. Hơn nữa, chúng tôi không thể tăng quá nhiều lượng ADN tổng số làm khuôn ban đầu vì điều này làm cho PCR xảy ra không đặc hiệu và có thể cho ra nhiều sản phẩm phụ. Với kỹ thuật PCR lồng, chúng tôi sẽ khắc phục được nhược điểm này. Sản phẩm PCR vòng một sau đó sẽ được sử dụng làm sợi khuôn cho PCR lần 2 để nhân bản vùng *pre*S. Ở lần chạy PCR thứ hai, chúng tôi sử dụng 1µl và 2µl sản phẩm PCR lần một làm khuôn với mục đích tìm được nồng độ khuôn thích hợp cho phản ứng nhân bản gien.



Hình 1. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR vòng một và vòng hai trên gel agaroza 1%

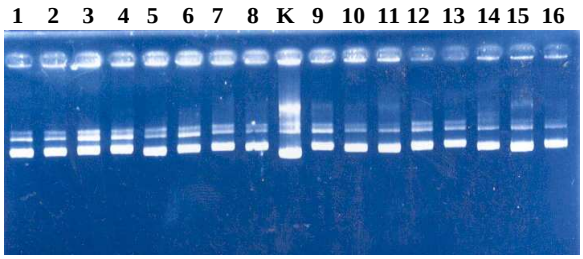
Ghi chú: Đường chạy M : ADN Fx cắt bằng *Hae* III
Đường chạy 1: sản phẩm PCR vòng 2 (1µl PCR vòng 1 làm khuôn)
Đường chạy 2: sản phẩm PCR vòng 1
Đường chạy 3: sản phẩm PCR vòng 2 (1µl PCR vòng 1 làm khuôn)

Với cặp mồi này, sản phẩm PCR sẽ mang đoạn gien với kích thước 660 bp gồm toàn bộ vùng *pre*S dài 490 bp và 170 bp của vùng S. Mong muốn ban đầu của chúng tôi là tách dòng và biểu hiện được toàn bộ gien kháng nguyên bề mặt lớn (gien *hbs*L) của HBV, bao gồm vùng *pre*S + vùng S. Tuy nhiên, điều này đã không thực hiện được bởi trên gien mã hóa protein bề mặt loại nhỏ (gien *hbs*) có bốn vùng trình tự xuyên màng (transmembrane sequence), các vùng này sẽ ức chế sự biểu hiện của gien trong *E. coli*. Vì vậy, để có thể biểu hiện được, chúng tôi đã cắt bỏ vùng trình tự xuyên màng, chỉ giữ lại 170 nucleotit của gien *hbs* với hy vọng trên đoạn còn lại của gien này có mang những quyết

định kháng nguyên quan trọng. Sản phẩm PCR vòng hai được kiểm tra bằng điện di trên gel agaroza 1%. Kết quả (hình 1) cho thấy vùng *pre*S đã được nhân lên đặc hiệu, thể hiện một băng sáng rõ nét, có kích thước khoảng 0.7kb đúng như mong muốn. Điều đó chứng tỏ chương trình PCR mà chúng tôi sử dụng là phù hợp.

Sản phẩm PCR lần 2 được tách dòng bằng cách gắn trực tiếp vào vectơ tách dòng pCR™2.1 với sự tham gia của enzym T4 ADN ligaza, sau đó biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α. Các thể biến nạp sau đó được cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường LB chọc lọc có thành phần: 1% trypton; 1% yeast extract; 1% NaCl; 2% Bacto agar; pH = 7,4; có bổ sung IPTG 1 mM; X-gal 40 µg/ml và ampixilin 100 µg/ml.

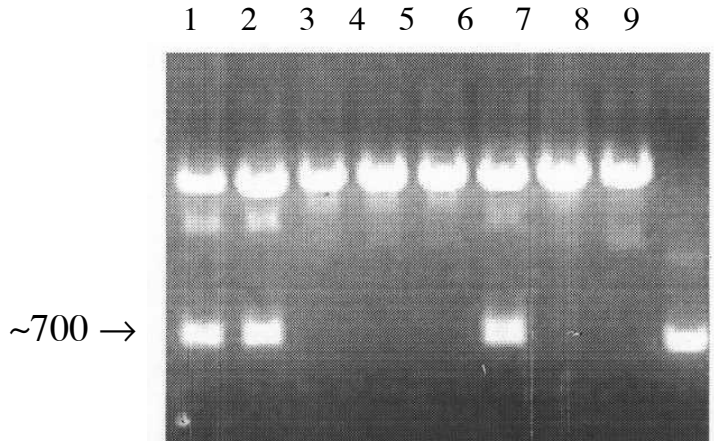
Để chọn lọc các dòng tế bào chứa plasmit có mang đoạn ADN ngoại lai, chúng tôi nhặt ngẫu nhiên 16 khuẩn lạc riêng rẽ màu trắng và 1 khuẩn lạc màu xanh làm đối chứng, nuôi cấy và tách chiết plasmit. Các plasmit có kích thước lớn hơn plasmit pCR™2.1 gốc sẽ được chọn, để phân tích tiếp. Chúng tôi chọn 8 plasmit có kích thước lớn hơn plasmit gốc để phân tích tiếp bằng enzym cắt giới hạn.



Hình 2. Kết quả điện di ADN plasmit trên gel agaroza 1% để chọn lọc các plasmit pCR™2.1 tái tổ hợp có khả năng chứa vùng *pre*S ngoại lai.

Ghi chú: Đường chạy K: plasmit pCR™2.1 gốc,
Đường chạy 1-16: các plasmit từ 1-16

Vì cấu trúc của vectơ pCR™2.1 có 2 vị trí cắt của *Eco*R I nằm ở hai đầu của vùng nối ghép đa vị, do vậy nếu vectơ pCR™2.1 mang vùng *pre*S thì khi cắt bằng enzym *Eco*R I sẽ tạo ra đoạn ADN có kích thước khoảng 0,7 kb. Kết quả cắt được phản ánh ở hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di trên gel agaroza 1% kiểm tra các plasmit pCR™2.1 mang đoạn ADN ngoại lai sau khi cắt bằng EcoR I.

Ghi chú: Đường chạy 1-8: các plasmit từ 1-8.
Đường chạy 9: sản phẩm PCR vòng 2 (dùng làm đối chứng)

Kết quả ở hình 3 cho thấy các plasmit 1, 2, 6 khi cắt kiểm tra bằng *Eco*RI đã tách ra đoạn ADN có kích thước bằng kích thước sản phẩm PCR vòng 2 (đường chạy 9) được sử dụng làm đối chứng. Phân tích bằng enzym giới hạn có thể xem như chúng tôi đã tách dòng thành công vùng *pre*S. Tuy nhiên, để khẳng định một cách chắc chắn, chúng tôi tiến hành xác định được trình tự nucleotit của đoạn gien vừa tách dòng.

Để xác định trình tự nucleotit của vùng *pre*S, chúng tôi sử dụng bộ kít xác định trình tự ADN của hãng Amersham-Pharmacia Biotech với máy đọc trình tự ADN ALF-Express của hãng Pharmacia, sử dụng mồi T7 promotơ và M13 teminator, vị trí bắt cặp của mồi đã được thiết kế sẵn trong vectơ pCR™2.1 dùng cho việc xác định trình tự nucleotit của gien tách dòng. Kết quả xác định trình tự nucleotit được phản ánh ở hình 4.

```
ID      preS PRELIMINARY;   DNA;  660 BP.
SQ   SEQUENCE   660 BP;   151 A;   206 C;   157 G;   146 T;
ATGGGGACGA ATCTTTCTGT TCCCAATCCT CTGGGATTCT TTCCCGATCA CCAGTTGGAC   60
CCTGCGTTCG GAGCCAACTC AAACAATCCA GATTGGGACT TCAACCCCAA CAAGGATCAC  120
TGGCCAGAGG CGAATCAGGT AGGAGCGGGA GCATTCGGGC CAGGGTTCAC CCCACCACAC  180
GGCGGTCTTT TGGGGTGGAG CCCTCAGGCT CAGGGCATAT TGACAGCAGT GCCAGCAGCG  240
CCTCCTCCTG CCTCCACCAA TCGGCAGTCA GGAAGACAGC CTACTCCCAT CTCTCCACCT  300
CTAAGAGACA GTCATCCTCA GGCCATGCAG TGGAATTCCA CAACATTCCA CCAAGCTCTG  360
CTAGATCCCA GAGTGAGGGG CCTATATTTT CCTGCTGGTG GCTCCAGTTC CGGAACAGTA  420
AACCCTGTTC CGACTACTGC CTCTCCCATA TCGTCAATCT TCTCGAGGAC TGGGGACCCT  480
GCACCGAACA TGGAGAACAC AACATCAGGA TTCCTAGGAC CCCTGCTCGT GTTACAGGCG  540
GGGTTTTTCT TGTTGACAAG AATCCTCACA ATACCGCAGA GTCTAGACTC GTGGTGGACT  600
TCTCTCAATT TTCTAGGGGG AGCACCCACG TGTCCTGGCC AAAATTCGCA GTCCCCAACC  660
```

Hình 4. Trình tự nucleotit của vùng preS được xác định bằng máy đọc trình tự ADN ALF-Express của hãng Pharmacia.

Sử dụng chương trình Aligment của phần mềm DNA Star để so sánh kết quả trình tự nucleotit của vùng preS được tách dòng này với trình tự nucleotit của vùng preS được công bố trên Ngân hàng Dữ liệu gien Quốc tế, chúng tôi khẳng định đã tách dòng thành công vùng preS và một đoạn gồm 170 nucletotit của vùng S gien kháng nguyên bề mặt của virút viêm gan B. Kết quả so sánh còn cho thấy mức độ tương đồng giữa trình tự nucleotit của vùng preS phân lập tại Việt Nam với các trình tự nucleotit của vùng preS công bố trong Ngân hàng Dữ liệu gien Quốc tế là rất cao từ 90 - 97%. Đặc biệt với vùng preS do Sugauchi F. và cộng sự đã công bố [8], kết quả cho thấy sự tương đồng đạt tới 98,94%. Kết quả này cũng gợi ý cho chúng tôi rằng chủng virút HBV đang gây bệnh ở Việt nam và chủng do Sugauchi F. và cs. công bố có thể cùng phân typ adr.

III. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật PCR lồng (nested PCR) với việc sử dụng 2 cặp mồi đặc hiệu, chúng tôi đã nhân bản thành công vùng preS và một đoạn gồm 170 nucleotit thuộc vùng S gien kháng nguyên bề mặt của virút viêm gan B từ ADN tổng số tách chiết từ khối u của bệnh nhân ung thư gan có mang ADN của virút viêm gan B.

Vùng preS sau đó được tách dòng vào vectơ tách dòng pCRTM2.1 và được xác định trình tự. So sánh trình tự nucleotit vùng preS phân lập tại Việt Nam này với trình tự nucleotit của vùng preS công bố trong Ngân hàng Dữ liệu gien Quốc tế chúng tôi nhận thấy mức độ tương đồng cao từ 90-97%, đặc biệt với vùng preS do Sugauchi F. và cs. công bố [8], kết quả cho thấy sự tương đồng đạt tới 98,94%.

Vùng preS phân lập này sẽ được thiết kế để biểu hiện và tinh sạch để thu nhận protein preS tái tổ hợp, tiến tới tạo ra bộ Kit chẩn đoán HBV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ganem, D.**, **Varmus, H. E.**, 1987: Ann. Rev. Biochem.: 651-693.

2. **Nguyễn Hữu Hồng**, 1993). Bài giảng Vi sinh Y học. NXB Y học, Hà Nội.
3. **Đinh Duy Kháng và cs.**, 1996: Phân lập, tách dòng và xác định trình tự gien kháng nguyên bề mặt của virút viêm gan B từ khối U của bệnh nhân ung thư gan. Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học, 20-25.
4. **Le Seyec, J. P. et al.**, 1998: *J*. Virol., 2052-2057.
5. **Rogers S. A.**, **Dienstag, J. L.**, and **Liang.T. J.**, 1997: Hepatitis B virus-clinical disease, prevention and therapy in Viral Hepatitis. Ed. By Willson, R. A., New York, 119-146.
6. **Sanger F.**, **Niclen S.**, and **A. R. Coulson**, 1977: Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463.
7. **WHO-UNICEF Bulletin**, 1996: State of the World's Vaccines and Immunization. Geneva.
8. **Sugauchi F.**, 2000: *J*. Med. Virol., 44: 96-103.
9. **Tiolais P.**, **Pourcal C.**, **Dejean A.**, 1985: Nature, 317: 489-495.
10. **Nguyễn Thu Vân**, 1991: Tinh khiết kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg) cho việc điều chế bộ sinh phẩm micro- Elisa (Thử nghiệm miễn dịch men) dùng để chẩn đoán HBsAg trong huyết thanh, huyết tương người. Luận án phó tiến sĩ sinh học, Hà Nội.
11. **Vassileva A. et al.**, 2002: Protein Protein Expr. Purif., 21: 71-80.

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE OF THE *PRE*S DOMAIN OF HUMAN HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN

DONG VAN QUYEN, DINH DUY KHANG, YU GYUN GYU

SUMMARY

By using nested PCR with specific primers, we have amplified and cloned the *pre*S domain, including 170 nucleotides of the S domain of the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from human liver tumor biopsies. The sequence of this isolated *pre*S domain was compared with other *pre*S domains from the International Gene Bank Database. The identity ranges from 90 to 97%. These results suggested that the HBV strain isolated from Vietnamese patient was an adr subtype.

Ngày nhận bài: 11-7-2002