

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC CỦA PROTEASE HIV-1 TÁI TỔ HỢP

Nguyễn Thị Hồng Loan^{1,2}, Nguyễn Văn Sáng²,
Trịnh Hồng Thái^{1,2}, Phan Tuấn Nghĩa^{1,2}, Bùi Phương Thuận^{1,2*}

¹Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein,
Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, *thuanbp@vnu.edu.vn

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

TÓM TẮT: Protease tái tổ hợp của HIV-1 (HIV-1PrHis) được tạo ra dưới dạng protein dung hợp chứa 114 gốc axit amin, bao gồm chuỗi peptide của protease HIV-1 (99 gốc axit amin), trình tự nhận biết của protease virus Etch thuốc lá (TEV, 7 gốc axit amin) và 6 gốc histidine, có khối lượng phân tử gần 12,8 kDa. Các kết quả phân tích cấu trúc bậc một bằng khối phổ MS/MS đã khẳng định trình tự axit amin của protease hoàn toàn (100%) tương đồng với trình tự axit amin như tính toán lý thuyết. Cấu trúc bậc hai của protease HIV-1 có dạng gấp nếp β (β sheet) rõ rệt với đỉnh phổ âm tại bước sóng 205 nm và cường độ gần -8 mdeg bằng phương pháp phổ CD (circular Dichroism). Bằng việc sử dụng phần mềm SWISS-MODEL và các cấu trúc protease HIV-1 đã công bố, cấu trúc 3D của HIV-1PrHis đã được dự đoán với các chỉ số tin cậy như TM-score 0,9982; chỉ số Z-core này tối ưu so với Z-core của các cấu trúc protein thu được từ phương pháp NMR và X-ray; hầu hết các góc Phi và Psi đều nằm trong vùng tối ưu. Theo đó, HIV-1PrHis là một homodimer với dạng chủ yếu là phiến gấp nếp β . Kết quả nghiên cứu là cơ sở để sử dụng HIV-1PrHis trong việc sàng lọc các chất ức chế của enzyme.

Từ khóa: cấu trúc protease, cấu trúc 3D, HIV-1, protease HIV-1, ức chế protease.

MỞ ĐẦU

HIV-1 là virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải AIDS ở người. Protease của HIV-1 là một trong các enzyme có vai trò thiết yếu trong sự hình thành thể virus và vì vậy được xem là một trong những đích chính để phát triển các thuốc ức chế protease (PI), chống HIV-1 [4].

Cho đến nay, Cục Thực phẩm và Thuốc của Hoa Kỳ (FDA) đã cấp phép 9 loại thuốc PI cho điều trị bệnh nhiễm HIV/AIDS. Tuy nhiên, nhiều tác dụng phụ khi sử dụng thuốc kéo dài và kháng thuốc là vấn đề đối với thuốc PI nói riêng và các thuốc điều trị HIV/AIDS nói chung. Chính vì vậy, các nghiên cứu phát triển thuốc mới hiệu quả hơn vẫn đang được tiến hành và protease HIV-1 trở thành một trong các enzyme được nghiên cứu nhiều nhất [4, 7]. Hầu hết protease HIV-1 đều được tạo ra bằng con đường tái tổ hợp. Gần đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã thiết lập được quy trình biểu hiện và tinh sạch một protease tái tổ hợp từ chủng HIV-1 phân nhóm CRF01_AE gây bệnh chủ yếu ở người Việt Nam. Protein tạo ra dưới dạng

dung hợp chứa 114 gốc axit amin, bao gồm chuỗi peptide của protease HIV-1 (99 gốc axit amin), trình tự nhận biết của protease virus Etch thuốc lá (TEV, 7 gốc axit amin) và 6 gốc histidine, có khối lượng phân tử (KLPT) gần 12,8 kDa, ký hiệu HIV-1PrHis [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích một số đặc điểm về cấu trúc của HIV-1PrHis, làm cơ sở cho các nghiên cứu sử dụng protease sàng lọc chất ức chế từ dược liệu Việt Nam ứng dụng trong điều trị bệnh nhân HIV/AIDS.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chế phẩm protease HIV-1 tái tổ hợp (HIV-1PrHis) là sản phẩm của đề tài cấp Nhà nước, mã số ĐT-PTNTĐ.2012-G/02, được tạo ra theo quy trình công bố trước đây [5].

Thang chuẩn protein (BNPM50) của Bionexus (Hàn Quốc); gel Q-sepharose, Ni-Sepharose, Sephacryl S100 được mua từ GE Healthcare (Hoa Kỳ); các IPG strip pH 3-10, chiều dài 7cm của Biorad (Hoa Kỳ). Các peptide chuẩn Insulin B, Bradikinin, Angiotensin II, ACTH, chất nền CHCA (α -Cyano-4-

hydroxycinnamic acid) chuyên dùng cho nghiên cứu proteomics từ Sigma Aldrich (Hoa Kỳ). Enzyme trypsin, chymotrypsin, elastase đạt độ sạch phân tích trình tự của Promega (Hoa Kỳ). Các hóa chất khác (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid (CHAPS), urea, Thiourea (Invitrogen), dithiothreitol (DTT), Iodoacetamide (Biorad), SDS, Acylamide (USB-Pharmacia) đều đạt độ tinh sạch dành cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Chế phẩm HIV-1PrHis được tái tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel Sephacryl S 100 để chuyển sang hệ đệm thích hợp cho phân tích cấu trúc bậc 2. Cụ thể: 126 ml gel Sephacryl S-100 (GE Healthcare) được nhồi vào cột XK16/70 (GE Healthcare) đạt 63 cm chiều cao cột trên hệ thống máy tự động AKTAprimer (GE Healthcare). Cột được cân bằng với 3 lần thể tích đệm phosphate kali 20 mM, pH 8,0 chứa NaCl 50 mM (đệm E) với tốc độ 0,5 ml/phút. Tiếp theo, 5 ml protease HIV-1 hồi tính, nồng độ 0,4 mg/ml được cho lên cột. Cột được rửa chiết bằng 2 lần thể tích đệm E để thu nhận lại protease HIV-1.

Phân tích cấu trúc bậc 1 của HIV-1PrHis bằng khối phổ MS/MS

Băng protein của HIV-1PrHis KLPT 12,8 kDa được cắt ra khỏi bản gel, tẩy màu và thủy phân thành các peptide nhờ các enzyme trypsin, chymotrypsin và elastase. Các peptide này được thu lại bằng ziptip C18 (Milipore-Hoa Kỳ), bước này còn giúp cô đặc peptide và loại muối cũng như một số thành phần khác khỏi mẫu trước khi phân tích khối phổ. Các sản phẩm peptide được phân tích trên máy khối phổ MS/MS *AXIMA-CRF^{PLUS}* (KRATOS ANALYTICAL, Anh). Phổ các mảnh con thu được từ sự phân mảnh peptide được tra cứu trên cơ sở dữ liệu sử dụng chương trình Mascot 2.5.1 với các thông số: sai số 0,020 Dal với ion con, 10,0 ppm với ion mẹ, cải biến cố định carbamidomethyl (+57 với C); cải biến biến đổi (-17 với n (Gln->pyro-Glu), +1 với NQ (loại amine), +16 với M (oxidation), +42 với n (acetyl).

Phân tích cấu trúc bậc 2 của HIV-1PrHis bằng phương pháp CD (circular dichroism)

HIV-1PrHis nồng độ 30 μ M được phân tích cấu trúc bậc 2 tại Viện Khoa học và Công nghệ

tiên tiến Hàn Quốc (KAIST), sử dụng cuvette 0,1 cm, tại dải bước sóng 190-260 nm trên hệ thống máy quang phổ phân cực Jasco J185 (Nhật Bản). Mẫu được quét lặp lại 10 lần với tốc độ 100 nm/phút.

Dự đoán cấu trúc không gian 3D của HIV-1PrHis bằng công cụ SWISS MODEL

Phương pháp dự đoán cấu trúc sử dụng nguyên lý mô phỏng tính tương đồng (homology modeling) được đánh giá là phương pháp duy nhất hiện nay dự đoán được cấu trúc 3D của protein với độ tin cậy cao [9]. Trong nghiên cứu này, công cụ mô phỏng tính tương đồng SWISS-MODEL [2] sẽ được sử dụng để dự đoán cấu trúc 3D của HIV-1PrHis, gồm các bước cụ thể như sau:

i) Lựa chọn cấu trúc 3D của protease làm khuôn cho HIV-1PrHis trong ngân hàng dữ liệu protein PDB SWISS-MODEL, sử dụng các công cụ tìm kiếm và phân tích trình tự BLAST và HHblits [11].

ii) Phân tích và so sánh chính xác các vùng trình tự tương đồng của các cấu trúc làm khuôn tìm được và so sánh với trình tự bảo thủ của HIV-1PrHis sử dụng các công cụ phân tích, so sánh trình tự bằng HHblits.

iii) Xây dựng cấu trúc khung và loop của HIV-1PrHis sử dụng công cụ ProMod-II [3]. Vùng loop thường có cấu trúc linh động và ít bảo thủ hơn, vì vậy, trong trường hợp công cụ ProMod-II xây dựng mô hình các loop không đạt được kết quả mong muốn, phương pháp MODELLER sẽ được áp dụng [6]. Các cấu trúc mạch bên được xây dựng dựa trên các thông tin thu thập từ các cấu trúc 3D của protein có độ phân giải cao được giải cấu trúc bằng phương pháp chụp X-quang tinh thể (X-ray) hoặc cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

iv) Tối ưu hóa mức năng lượng của mô hình qua nhiều bước. Sau mỗi bước tối ưu các lỗi lớn như khoảng cách giữa các nguyên tử quá ngắn sẽ được loại bỏ và xuất hiện các lỗi nhỏ hơn. Sau nhiều bước tối ưu hóa năng lượng, các lỗi lớn sẽ bị loại và các lỗi nhỏ cũng được làm giảm tới mức tối đa.

v) Đánh giá chất lượng mô hình bằng các tiêu chí độ lệch chuẩn (RMSD) giữa mô hình dự

đoán và cấu trúc làm khuôn, chỉ số TM-score (đánh giá mức độ tương đồng giữa mô hình được dự đoán và cấu trúc tồn tại trong thực tế), chỉ số Z-score (nhằm so sánh năng lượng của cấu trúc mô hình với năng lượng cấu trúc được phân tích bởi các phương pháp chụp X-quang tinh thể và cộng hưởng từ hạt nhân) và phân tích các góc Phi và Psi bằng phần mềm PROCHECK.

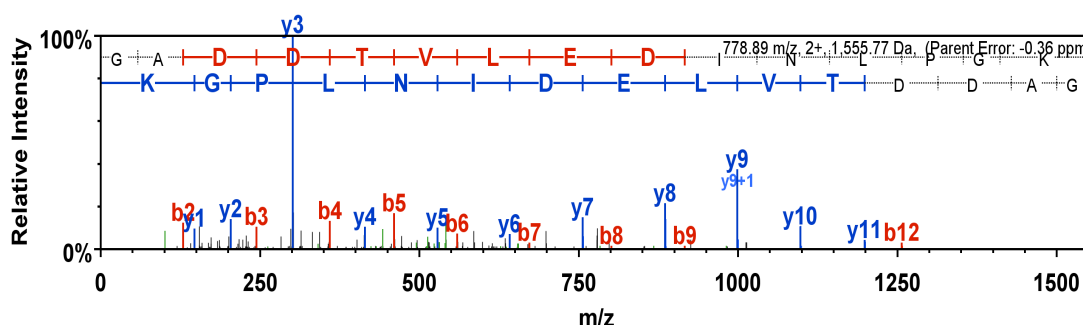
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cấu trúc bậc 1 của HIV-1PrHis bằng phân tích khối phổ MS/MS

Chế phẩm HIV-1PrHis được tinh sạch từ

dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* BL21 (DE3) RIL mang vector pET32a-HIV-1PrHis theo quy trình của Nguyen và cộng sự [5]. Trong đó, protease mang đoạn trình tự peptide của protease HIV-1 với 99 gốc axit amin, mở đầu bằng Pro, có trình tự cắt của TEV protease và 6xHis tại đầu C (HIV-1PrHis).

Các phân mảnh peptide sau khi tinh sạch bằng ziptip được xác định KLPT trên hệ thống máy khối phổ MS/MS. Bảng 1 và hình 1 là minh họa khối phổ đã xác định được KLPT các mảnh ion con b và y được hình thành từ một phân mảnh peptide đặc thù của HIV-1PrHis có trình tự GADDTVLEDINLPGK.



Hình 1. Các mảnh ion được hình thành từ peptide GADDTVLEDINLPGK của HIV-1PrHis được xác định bằng khối phổ

Bảng 1. Dữ liệu KLPT của các mảnh ion được hình thành từ peptide GADDTVLEDINLPGK của HIV-1PrHis

B	Ion B	B+2H	H-NH ₃	B-H ₂ O	Axit amin	Ion Y	Y+2H	Y+NH ₃	Y+H ₂ O	Y
1	58,0				G	1.556,8	778,9	1.539,8	1.538,8	15
2	129,1				A	1.499,8	750,4	1.482,7	1.481,7	14
3	244,1			226,1	D	1.428,7	714,9	1.411,7	1.410,7	13
4	359,1			341,1	D	1.313,7	657,4	1.296,7	1.295,7	12
5	460,2			442,2	T	1.198,7	599,8	1.181,6	1.180,7	11
6	559,2	280,1		541,2	V	1.097,6	549,3	1.080,6	1.079,6	10
7	672,3	336,7		654,3	L	998,6	499,8	981,5	980,5	9
8	801,4	401,2		783,4	E	885,5	443,2	868,4	867,5	8
9	916,4	458,7		898,4	D	756,4	378,7	739,4	738,4	7
10	1.029,5	515,2		1.011,5	I	641,4	321,2	624,4		6
11	1.143,5	572,3	1.126,5	1.125,5	N	528,3		511,3		5
12	1.256,6	628,8	1.239,6	1.238,6	L	414,3		397,2		4
13	1.353,7	677,3	1.336,6	1.335,6	P	301,2		284,2		3
14	1.410,7	705,8	1.393,6	1.392,7	G	204,1		187,1		2
15	1.556,8	778,9	1.539,8	1.538,8	K	147,1		130,1		1

HIV-1 (100%), 12,772.5 Da

HIV-1

267 exclusive unique peptides, 410 exclusive unique spectra, 626 total spectra, 114/114 amino acids (100% coverage)

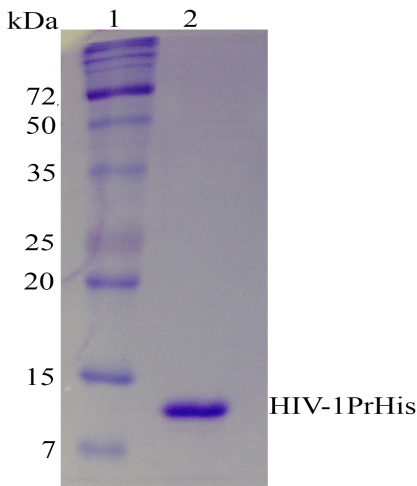
PQITLWQRPL VTIKIEGQLK EALLDTGADD TVLEDINLPG KWKPKMIGGI
 GGFIKVRQYD QILIEICGKK AIGTVLVGPT PINIIGRNML TQIGCTLNFE
 NLYFQGLEHH HHHH

Hình 2. Kết quả phân tích cấu trúc bậc 1 của HIV-1PrHis

Kết quả cho thấy HIV-1PrHis chính xác là protease HIV-1 với tổng vạch phổ 626, số peptide đặc thù 257 và độ bao phủ 100%. Cụ thể, cấu trúc bậc 1 của HIV-1PrHis như hình 2, HIV-1PrHis có KLPT là 12.7225 Dal và gồm 114 gốc axit amin với trình tự giống 100% trình tự như tính toán lý thuyết [5].

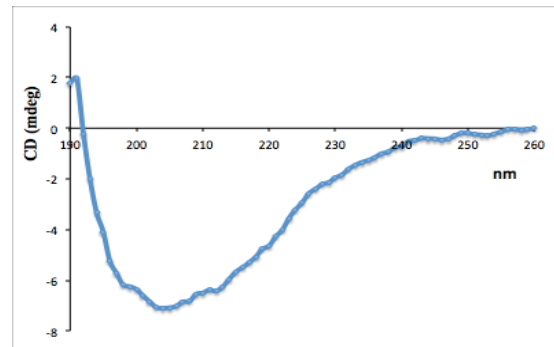
Cấu trúc bậc 2 của HIV-1PrHis bằng phương pháp CD

Chế phẩm HIV-1PrHis dạng hoạt tính trong đệm D (Tris-HCl 20 mM pH 7,9 có chứa NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 1mM và glycerol 5%) [5] được sắc ký lọc gel Sephacryl S-100 để đổi sang đệm E thích hợp cho phân tích phổ CD. Các phân đoạn có HIV-1PrHis sau lọc gel được dồn lại và cô đặc đến nồng độ protein 30 μM (hình 3, giếng 2) dựa trên kết quả định lượng protein bằng A₂₈₀ sử dụng hệ số hấp thụ phân tử gam = 13.980. Chế phẩm HIV-1PrHis này sẵn sàng cho phân tích phổ CD trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Điện di SDS-PAGE chế phẩm HIV-1PrHis qua cột lọc gel Sephacryl S-100 Giếng 1: thang chuẩn protein, giếng 2: HIV-1PrHis sau lọc gel

Kết quả phân tích phổ CD của HIV-1PrHis (hình 4) cho thấy nồng độ protease HIV-1 30 μM phù hợp cho xác định phổ CD, thể hiện ở đỉnh của đường cong trên -5 mdeg. HIV-1PrHis có cấu trúc bậc hai dạng gấp nếp β rõ rệt, có đỉnh tại bước sóng 205 nm và đơn vị gần -8 mdeg. Sử dụng phần mềm K2D2 (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d2/>) phân tích phổ CD của protease HIV-1 cũng cho thấy chế phẩm có khoảng 28% cấu trúc gấp nếp β. Phổ CD của HIV-1PrHis trong nghiên cứu này cũng tương tự như công bố gần đây nhất của Volonte et al. (2011) [8], protease HIV-1 có cấu trúc gần 30% phiến gấp nếp β và phổ CD âm với đỉnh tại 208 nm và đơn vị gần -8 mdeg.



Hình 4. Kết quả phân tích phổ CD của HIV-1PrHis

Dự đoán mô hình cấu trúc 3D của HIV-1PrHis bằng các công cụ tin sinh học

Trên cơ sở dữ liệu cấu trúc các protein trong ngân hàng SWISS-MODEL và trình tự axit amin của HIV-1PrHis, các phần mềm BLAST và Hhblits đã tìm được lần lượt khoảng 200 và 230 cấu trúc protein khuôn có bản chất là các protease trong đó chủ yếu là các protease của HIV có trình tự axit amin tương đồng cao với HIV-1PrHis, kết quả được minh họa một phần trong bảng 2.

Bảng 2. Một số cấu trúc 3D của các protein được sử dụng làm khuôn cho dự đoán cấu trúc 3D của HIV-1PrHis

Khuôn (mã cấu trúc trên PDB)	Mức độ giống nhau trình tự axit amin (%)	Dạng cấu trúc	Phần mềm	Phương pháp	Độ phân giải (Å)	Mức độ giống nhau	Độ bao phủ	Mô tả
1hvc.1.A	90,20	monomer	HHblits	X-ray	1,80Å	0,58	0,94	Protease HIV-1
3lzs.1.A	95,96	homo-dimer	HHblits	X-ray	1,95Å	0,60	0,92	Protease HIV-1
3kt5.1.A	83,81	monomer	HHblits	X-ray	1,80Å	0,55	0,97	Protease
1lv1.1.A	85,58	monomer	HHblits	X-ray	2,10Å	0,56	0,96	Protease HIV-1
3lzu.1.A	94,95	homo-dimer	HHblits	X-ray	1,76Å	0,60	0,92	Protease HIV-1
3d3t.1.A	94,95	hetero-oligomer	HHblits	X-ray	2,80Å	0,60	0,92	Protease HIV-1
3n3i.1.A	83,81	monomer	HHblits	X-ray	2,50Å	0,55	0,97	Protease
4qlh.1.A	85,58	monomer	HHblits	X-ray	2,45Å	0,56	0,96	Protease, linker, Protease
3kt2.1.A	84,62	monomer	HHblits	X-ray	1,65Å	0,56	0,96	Protease
3u71.1.A	91,92	homo-dimer	HHblits	X-ray	2,72Å	0,59	0,92	Protease HIV-1

Theo lý thuyết, khi trình tự axit amin giống nhau từ 30% trở lên có thể xem là tương đồng về cấu trúc. Tuy nhiên, thực tế cho thấy độ tương đồng trên 40% mới đảm bảo được độ chính xác cho mô hình xây dựng. Mặt khác, các cấu trúc được chọn làm khuôn cần có độ phân giải cao và thường dao động từ 1 đến 3Å [9]. Bảng 2 cho thấy nhiều protease HIV-1 có trình tự tương đồng cao với HIV-1PrHis. Trong đó, protease HIV-1 ký hiệu 3LZU đáp ứng các tiêu chí trên và được chọn làm khuôn cho xây dựng cấu trúc 3D của HIV-1PrHis. Trên cơ sở so sánh trình tự axit amin của khuôn 3LZU và HIV-1PrHis, sử dụng phần mềm ProMod-II: các vùng bảo thủ giữa hai protein sẽ được sao chép trực tiếp từ cấu trúc 3LZU sang HIV-1PrHis; mô hình cấu trúc ở các vùng thêm hoặc mất axit amin được xây dựng dựa trên thư viện các đoạn khuôn.

Kết quả nghiên cứu mô hình cấu trúc 3D (hình 5) cho thấy, HIV-1PrHis có cấu trúc dạng homodimer tương tự như cấu trúc của các protease HIV-1 khác đã được công bố trên Ngân hàng protein PDB. Trong đó, hai

monomer có cấu trúc bậc 2 giống nhau gồm chủ yếu là các phiến gấp nếp β . Kết quả này hoàn toàn phù hợp với cấu trúc bậc 2 của HIV-1PrHis phân tích bằng phương pháp CD.

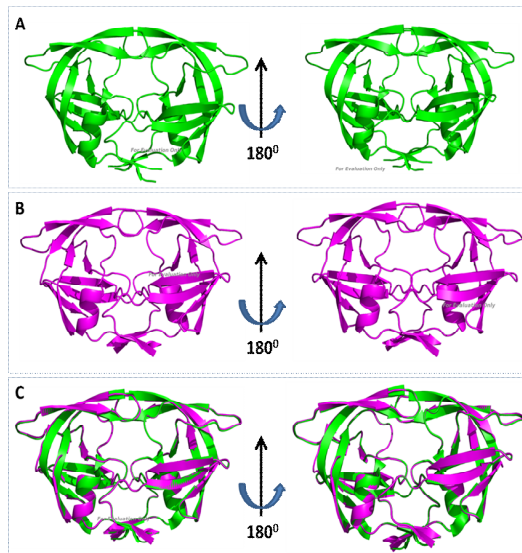
Hình 5 cũng cho thấy, mô hình cấu trúc 3D của HIV-1PrHis có độ tương đồng cao với cấu trúc khuôn 3LZU trong nghiên cứu của Bandaranayake et al. (2010) [1]. Sự sai khác ở đây là rất nhỏ, với độ lệch chuẩn bình phương trung bình (RMSD) chỉ là 0,154 Å. Điều này hoàn toàn phù hợp với thực tế vì HIV-1PrHis và 3LZU đều có bản chất là protease HIV-1. Hơn nữa, hai protein này lại có độ tương đồng cao về trình tự axit amin, lên đến 94%.

Chỉ số TM-score (website: <http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/TM-score/>) thường dao động từ 0 đến 1, được dùng để đánh giá chất lượng cấu trúc 3D của protein trên cơ sở tính toán mức độ tương đồng giữa mô hình dự đoán và cấu trúc tồn tại trong thực tế. Trong đó, TM-score càng gần 1 thì độ tương đồng với cấu trúc thực tế càng cao. TM-score của HIV-1PrHis tính được là 0,9982. Điều này cho thấy mô hình cấu trúc 3D của HIV-1PrHis có độ tương đồng

cao với cấu trúc tồn tại trong thực tế.

Z-score là chỉ số so sánh năng lượng của cấu trúc cần phân tích với các cấu trúc 3D đã được xây dựng bằng cả hai phương pháp giải cấu trúc NMR và X-ray [10]. Đánh giá chỉ số Z-score của mô hình HIV-1PrHis trên server phân tích cấu trúc protein ProSA-web, kết quả cho

thấy mô hình cấu trúc có các thông số nằm ở trung tâm phân bố thông số cấu trúc các protein được giải cấu trúc bằng cả NMR và X-ray. Như vậy, cấu trúc 3D dự đoán của HIV-1PrHis có các thông số phù hợp với các thông số thực tế thu được từ tất cả các nguồn dữ liệu về cấu trúc protein.



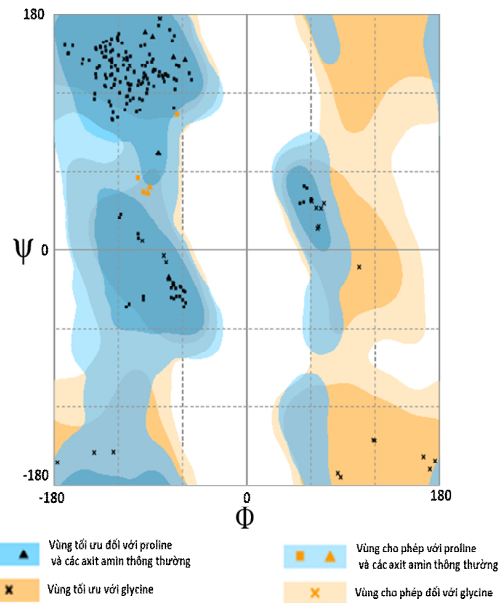
Hình 5. Mô hình cấu trúc 3D dự đoán của HIV-1PrHis

A. Cấu trúc khuôn protease HIV-1 3LZU; B. cấu trúc 3D dự đoán của HIV-1PrHis; C. so sánh cấu trúc 3D của 3LZU và HIV-1PrHis. Màu xanh lá cây là cấu trúc protein HIV-1 3LZU

Kết quả phân tích bằng PROCHECK (hình 6) cũng cho thấy mô hình cấu trúc 3D của HIV-1PrHis có 98% các axit amin có góc Phi và Psi nằm trong vùng tối ưu, 2% số axit amin có góc Phi và Psi nằm trong vùng cho phép, và không có axit amin nào có góc Phi và Psi nằm ngoài vùng cho phép. Kết quả này một lần nữa khẳng định mô hình cấu trúc 3D của HIV-1PrHis có độ tin cậy cao.

KẾT LUẬN

Cấu trúc bậc 1 của HIV-1PrHis gồm 114 gốc axit amin, KLPT gần 12,8 kDa với trình tự giống 100% với trình tự axit amin theo tính toán lý thuyết. Ở mức độ cấu trúc bậc 2, HIV-1PrHis có dạng phiến gấp nếp β rõ rệt, phổ CD tương tự các protease HIV-1 đã công bố.



Hình 6. Đánh giá cấu trúc 3D của HIV-1PrHis bằng công cụ PROCHECK

Đã dự đoán được mô hình cấu trúc 3D của HIV-1PrHis dựa trên các công cụ tin sinh học với các chỉ số tin cậy: TM-score là 0,9982; Z-core này tối ưu so với Z-core của các cấu trúc protein thu được từ phương pháp NMR và X-ray; hầu hết các góc Phi và Psi đều nằm trong vùng tối ưu. Theo mô hình cấu trúc 3D, HIV-1PrHis là một homodimer gồm hai monomer với dạng chủ yếu là phiến gấp nếp β . Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các kết quả phân tích cấu trúc bậc 2 bằng phương pháp CD và các cấu trúc của protease HIV-1 khác đã được công bố trên ngân hàng protein PDB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandaranayake R. M., Kolli M., King N. M., Nalivaika E. A., Heroux A., Kakizawa

- J., Sugiura W., Schiffer C. A., 2010, The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J. Virol.*, 84: 9995-10003.
2. Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino T. G., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T., 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.*, 42: W252-258.
3. Guex N., Peitsch M. C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18: 2714-2723.
4. Levy Y., Caflisch A., Onuchic J. N. and Wolynes P. G., 2004. The Folding and Dimerization of HIV-1 Protease: Evidence for a Stable Monomer from Simulations. *J. Mol. Biol.*, 340: 67-79.
5. Hong-Loan Thi Nguyen, Thuy Thi Nguyen, Quy Thi Vu, Hang Thi Le, Yen Pham, Phuong Le Trinh, Thuan Phuong Bui, Tuan-Nghia Phan, 2015. An efficient procedure for the expression and purification of HIV-1 protease from inclusion bodies, *Protein Expression and Purification* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.07.011>.
6. Sali A., Blundell T. L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.*, 234: 779-815.
7. Song M. C., Rajesh S., Hayashi Y. and Kiso Y., 2001. Design and Synthesis of New Inhibitors of HIV-1 Protease Dimerization with Conformationally Constrained Templates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 2465-2468.
8. Volontè F., Piubelli L., Pollegioni L., 2011. Optimizing HIV-1 protease production in *Escherichia coli* as fusion protein, *Microbial. Cell. Factories.*, 10: 1-10.
9. Vyas V. K., Ukawala R. D., Ghate M., Chintha C., 2012. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives, *Indian. J. Pharm. Sci.*, 74: 1-17.
10. Wiederstein M. & Sippl M. J., 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.*, 35: W407-W410.
11. Ye J., McGinnis S., Madden T. L., 2006. BLAST: improvements for better sequence analysis, *Nucleic Acids Res.*, 34: W6-9.

SOME STRUCTURAL PROPERTIES OF RECOMBINANT HIV-1 PROTEASE

Nguyen Thi Hong Loan^{1,2}, Nguyen Van Sang²,
Trinh Hong Thai^{1,2}, Phan Tuan Nghia^{1,2}, Bùi Phương Thuận^{1,2}

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology (KLEPT), VNU University of Science, Vietnam national University - Hanoi

²Faculty of biology, VNU University of Science, Vietnam national University - Hanoi

SUMMARY

HIV-1PrHis Protease was produced in the recombinant form of 114 amino acid residues (ca. 12.8 kDa), consisting of 99 amino acid peptide of HIV-1 protease fused with TEV and 6xHis sequences at the C terminal. The MS/MS analysis indicated that the amino acid sequence of HIV-1PrHis was exactly the same as theoretically designed. The circular dichroism spectrum of the HIV-1PrHis showed clear β sheet with a negative peak at 205 nm and intensity of nearly -8 mdeg. By using ProMod-II software and based on 3D

structures of reported HIV-1 proteases, 3D structure of the HIV-1PrHis was deduced, it had RMSD of 0.154 Å; TM-score of 0.9882 and Z-core in the same range of the known HIV-1 proteases analyzed by NMR and X-ray diffraction. The obtained results will enable to use the recombinant HIV-1PrHis for screening its inhibitors.

Keywords: 3D structure, HIV-1, HIV-1 protease, primary structure, secondary structure.

Ngày nhận bài: 11-12-2015