

## THIẾT KẾ CƠ CHẤT PEPTIDE HUỖNH QUANG ĐẶC HIỆU CỦA PROTEASE HIV-1

Nguyễn Thị Hồng Loan<sup>1,2\*</sup>, Trần Thị Thu Huyền<sup>2</sup>,  
Đặng Thị Liễu<sup>2</sup>, Phan Thị Lam Hồng<sup>2</sup>, Phan Tuấn Nghĩa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học tự nhiên

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên

**TÓM TẮT:** Dựa trên vị trí cắt đặc hiệu của protease HIV-1, chúng tôi đã thiết kế cơ chất peptide huỳnh quang của protease HIV-1 (ký hiệu peptide HF) theo nguyên tắc FRET (Fluorescence resonance energy transfer). Peptide có trình tự QXL 520-GABA-SFNFPQITK-HiLyte Fluor 488-NH<sub>2</sub>, trong đó, cặp huỳnh quang HiLyte Fluor 488/QXL 520 có hệ số phát quang/hấp thụ cao và hoạt động tốt trong điều kiện pH thấp thích hợp cho hoạt tính của protease HIV-1 (pH<5) đã được lựa chọn. QXL 520 chỉ bền khi gắn với gốc serine qua nhóm GABA nên được liên kết với gốc serine có sẵn tại đầu N của peptide HF; trong khi gốc leucine tại đầu C được thay thế bởi lysine liên kết với HiLyte Fluor 488. Các điều kiện phản ứng tối ưu cho xác định hoạt độ protease HIV-1 sử dụng cơ chất peptide HF được xác định là: 100-200 ng protease HIV-1, 2 μM cơ chất peptide HF, đệm CH<sub>3</sub>COONa 100 mM pH 4,7 có NaCl 1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, DMSO 5% và BSA 0,5 mg/mL. Peptide HF có thể được bảo quản tốt nhất ở nồng độ 0,1 mg/mL trong DMSO ở -80°C. Trong các điều kiện phân tích nói trên, protease HIV-1 có ái lực cao với cơ chất peptide HF và thủy phân hiệu quả cơ chất này với các hằng số động học  $V_{max} = 4,45$  nM/giây,  $K_{cat}/K_m = 10,89$  (mM.giây)<sup>-1</sup> gấp khoảng 5 lần khi sử dụng cơ chất thương mại HIV-1 SensoLyte<sup>®</sup> 520 HIV-1 Protease Assay (Anaspec, Hoa Kỳ).

*Từ khóa:* Protease HIV-1, chất ức chế protease HIV-1, cơ chất huỳnh quang, hằng số Michaelis-Menten ( $K_m$ ).

### MỞ ĐẦU

Protease của HIV-1 (protease HIV-1) thuộc nhóm aspartyl protease, là một enzyme đích quan trọng trong liệu pháp kháng Retrovirus (ARV) cho điều trị bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS (Perez et al., 2010). Protease HIV-1 có tính đặc hiệu cao nên không thể dùng các cơ chất protein thông thường cho việc xác định hoạt độ của enzyme. Nhiều cơ chất peptide của protease HIV-1 đã được thiết kế cho mục đích phân tích hoạt độ của protease HIV-1 và chúng thường có chứa trình tự giống như 11 vị trí cắt của enzyme trong 2 chuỗi polyprotein Gag và Gag/Pol của HIV-1. Trình tự amino acid này thường khá đa dạng và đặc hiệu cao gồm 8 gốc amino acid ký hiệu P4-P3-P2-P1\*P1'-P2'-P3'-P4', trong đó enzyme sẽ cắt liên kết giữa P1\*P1' (Boross et al., 1999; Beck et al., 2000; Chaudhury et al., 2009). Vai trò, đặc tính của từng gốc amino acid cũng như các trình tự ưa thích của protease HIV-1 cũng đã được làm rõ (Beck et al., 2000; Bagossi et al., 2005; Chaudhury et al., 2009;). Về phân loại, có thể chia cơ chất của protease

HIV-1 thành hai nhóm; nhóm 1 tại P1 và P1' là các amino acid thơm (Aro-P), trong khi nhóm 2 là các amino acid kỵ nước (Chaudhury et al., 2009). Cơ chất được xem là hiệu quả nhất và thường được sử dụng trong các phương pháp để xác định hoạt tính và chất ức chế của protease HIV-1 là: Val-Ser-Gln-Asn-Tyr\*Pro-Ile-Val-Gln dựa trên vị trí cắt MA/CA trên polyprotein Gag (Dunn et al., 1994; Beck et al., 2000 Bagossi et al., 2005). Tuy nhiên, theo Kauslich et al. (1989), cơ chất P<sup>6pol</sup>/PR trên Gag-Pol lại hiệu quả nhất. Nghiên cứu của Perez et al. (2010) còn cho thấy một số cơ chất mang trình tự khác trên Gag/Pol không bị protease HIV-1 cắt theo lý thuyết và không được dùng làm cơ chất nhưng thực tế thí nghiệm lại có ái lực cao với trung tâm hoạt động của protease HIV-1 hơn cơ chất. Mặt khác, kích thước, trình tự và đặc tính các amino acid đều ảnh hưởng đến cấu hình và ái lực của cơ chất với trung tâm hoạt động của protease HIV-1 (Tie, 2006).

Nghiên cứu của chúng tôi nhằm thiết kế cơ chất peptide đặc hiệu có ái lực cao với protease sử

dụng trong phân tích hoạt độ của protease HIV, tạo điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu phát triển các thuốc ức chế protease HIV trong nước.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chế phẩm protease HIV-1 tái tổ hợp (HIV-1PrHis) được tạo ra theo quy trình của Nguyen et al. (2015). Cơ chất huỳnh quang đã được thiết kế và đặt tổng hợp bởi hãng Anaspec (Hoa Kỳ) và có độ tinh sạch hơn 95% (bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao-HPLC). Kit huỳnh quang SensoLyte® 520 HIV-1 Protease của hãng Anaspec (Hoa Kỳ). Các hóa chất khác đều đạt độ tinh sạch dành cho nghiên cứu sinh học phân tử.

**Xác định hoạt tính protease HIV-1:** Cơ chất của protease HIV-1 QXL 520-GABA-SFNFPQITK-HiLyte Flour 488-NH<sub>2</sub> được hòa tan ở nồng độ 0,5 mg/mL (tương ứng 235 μM) trong Dimethyl sulfoxide (DMSO). Phản ứng xác định hoạt tính của protease HIV-1 được thực hiện trong ống eppendorf ở 37°C với tổng thể tích 30 μl của đệm Natri acetate 100 mM pH 4,7 có NaCl 1 M, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 1 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, DMSO 5%, albumine huyết thanh bò (BSA) 1 mg/mL; cơ chất peptide HF (1-10 μM) và protease HIV-1 (50-300 ng). Các thành phần của phản ứng (trừ protease HIV-1) được ủ ở 37°C trước khi tiến hành trộn với nhau. Protease HIV-1 được bổ sung, trộn đều và đo giá trị Ex/Em (excitation/emmission) ở bước sóng tương ứng 488 nm/520 nm (bằng máy quang phổ huỳnh quang ND 3000, Thermo scientific) trong 5 phút ở 37°C. Mỗi phản ứng được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

**Xác định ảnh hưởng của các chất lên hoạt độ của protease HIV-1:** Chất nghiên cứu được hòa tan trong dung môi thích hợp và ủ trước 5 phút với protease HIV-1, sau đó đệm và cơ chất mới được bổ sung để bắt đầu phản ứng xác định hoạt độ còn lại của enzyme.

**Phân tích số liệu:** Tốc độ phản ứng (V) cùng các hằng số động học ( $K_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ) của protease HIV-1 được tính toán theo hai cách: theo phương trình Michaelis-Menten:  $V = (V_{max} [S]) / (K_m + [S])$ ; theo phương trình Lineweaver-Burk:  $1/V = (K_m/V_{max} [S]) + (1/V_{max})$ .

#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Thiết kế trình tự amino acid của cơ chất peptide gắn huỳnh quang cho xác định hoạt tính của protease HIV-1

Trên chuỗi polyprotein Gag-Pol tiền thân, vị trí P<sup>6pol</sup>-PR được phân cắt đầu tiên để giải phóng protease HIV-1 có hoạt tính cho các bước thủy phân tại Gag-Pol và Gag tiếp theo tạo các protein cấu trúc và chức năng cần thiết cho HIV-1 (Louis et al., 1999). Nhằm tạo cơ chất có ái lực và hiệu quả cắt cao, chúng tôi đã dựa trên vị trí cắt quan trọng này để thiết kế trình tự amino acid cho cơ chất huỳnh quang của protease HIV-1. Cơ chất được thiết kế theo nguyên tắc truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang FRET (Fluorescence resonance energy transfer) và có trình tự là: QXL 520-GABA-SFNFPQITK-HiLyte Flour 488-NH<sub>2</sub> (Peptide HF). Trong đó, QXL 520 chỉ bền khi gắn với gốc serine (Ser) qua nhóm γ-aminobutyric acid (GABA) nên được liên kết với Ser có sẵn tại đầu N của peptide HF; trong khi gốc leucine (Leu) tại đầu C được thay thế bởi gốc lysine (Lys) liên kết với HiLyte Fluor 488. Mặt khác, protease HIV-1 tái tổ hợp sử dụng trong nghiên cứu này được nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch theo quy trình của Nguyen et al. (2015), trong đó, protease HIV-1 được biểu hiện ở *E. coli* bằng pET32a dưới dạng tự cắt hiệu quả tại vị trí P<sup>6pol</sup>-PR của protein Gag-Pol. Việc thiết kế cơ chất tại vị trí P<sup>6pol</sup>-PR sẽ thích hợp với protease HIV-1 làm cơ sở cho việc tạo bộ kit xác định hoạt tính protease HIV-1 trong các nghiên cứu tiếp theo. Peptide HF được đặt tổng hợp bởi hãng Anaspec (Hoa Kỳ) và có độ tinh sạch >95% (HPLC).

Độ nhạy cao trong phân tích hoạt độ protease HIV-1 cũng là một tiêu chí cần thiết đối với cơ chất của enzyme. Toth et al. (1990) đã sử dụng cặp huỳnh quang acid p-aminonitrobenzoic (Abz)/nitrophenylalanine cho cơ chất của protease HIV-1. Tuy nhiên, Abz có hệ số phát quang yếu dẫn đến độ nhạy của cặp huỳnh quang thấp. Một số chất huỳnh quang khác và rhodamine thường được dùng cho các bộ kit xác định hoạt tính của enzyme với độ nhạy cao (Lavis et al., 2008). Tuy nhiên, sự proton hoá của các huỳnh quang chỉ bằng 1/2 tại pH 5 (pH tối thích cho hoạt tính của protease

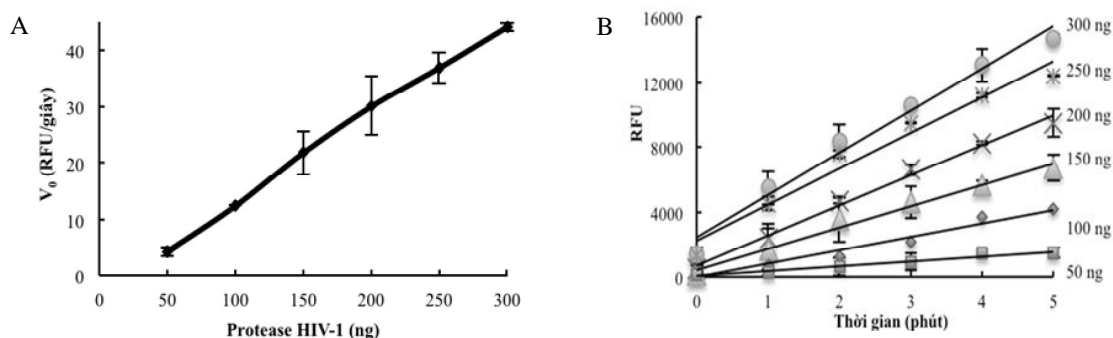
HIV-1) (Matoyoshi et al., 1990). Chính vì vậy, cặp huỳnh quang HiLyte Fluor 488/QXL 520 có hệ số phát quang/hấp thụ cao và hoạt động tốt trong điều kiện pH thấp đã được lựa chọn.

### Xác định các tính chất của cơ chất Peptide HF

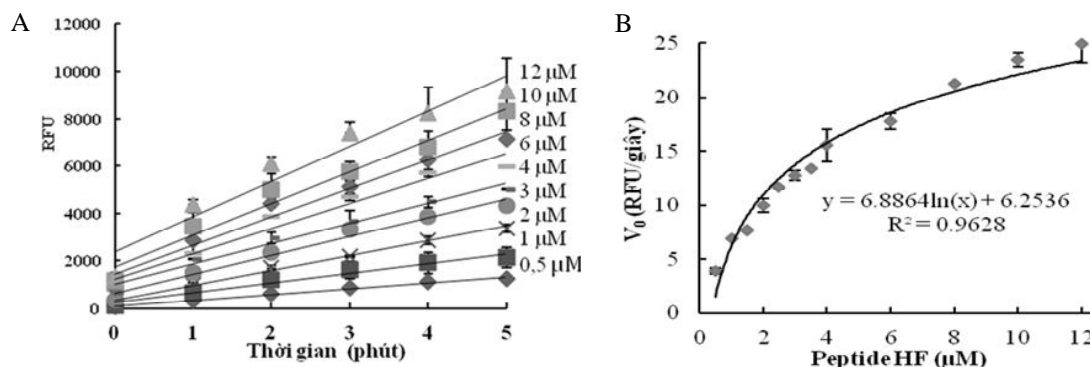
*Nồng độ thích hợp của protease HIV-1 cho phản ứng xác định hoạt tính sử dụng cơ chất peptide HF*

Trong phản ứng xác định hoạt tính của bất kỳ enzyme nào, nồng độ enzyme phải phù hợp để có sự biến đổi tuyến tính giữa mức độ chuyển hóa

ơ chất và thời gian phản ứng (Brook et al., 2012). Một số bộ kit thương mại khuyến cáo sử dụng protease HIV-1 với lượng enzyme từ 50-200 ng/phản ứng. Qua thử nghiệm lượng protease HIV-1 từ 50-300 ng/phản ứng, kết quả thu được (hình 1A) cho thấy, 100-200 ng protease HIV-1 thích hợp cho phản ứng sử dụng cơ chất peptide HF. Khi sử dụng nồng độ protease HIV-1 100 ng/phản ứng (30  $\mu$ l), thời gian phản ứng 5 phút đảm bảo sự biến đổi tuyến tính giữa mức độ chuyển hóa cơ chất và nồng độ enzyme (hình 1B).



Hình 1. Ảnh hưởng của lượng protease HIV-1 (A) và thời gian (B) đến tốc độ phản ứng, sử dụng cơ chất peptide HF



Hình 2. Ảnh hưởng nồng độ cơ chất Peptide HF đến hoạt tính của protease HIV-1

### Nồng độ thích hợp của cơ chất peptide HF

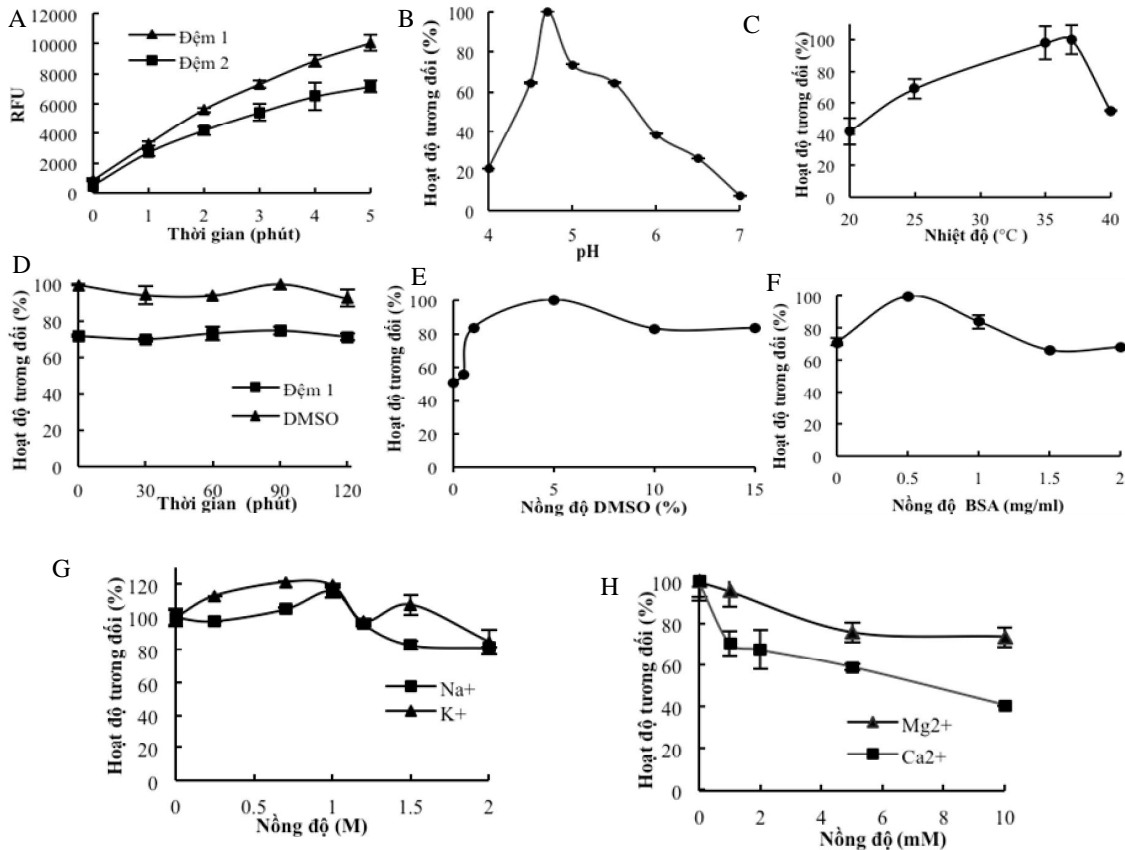
Với nồng độ protease HIV-1 100 ng/phản ứng (30  $\mu$ l) và khi sử dụng cơ chất peptide HF ở các nồng độ khác nhau, kết quả phân tích cho thấy nồng độ từ 2-3  $\mu$ M vẫn đảm bảo mức độ tuyến tính của tốc độ hình thành sản phẩm trong

thời gian 5 phút, chứng tỏ đây là nồng độ thích hợp cho phản ứng xác định hoạt tính của protease HIV-1 sử dụng cơ chất peptide HF (hình 2A). Theo phương trình Michaelis-Menten biểu diễn sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất peptide HF xác định được  $K_m = 2,88 \mu$ M và  $V_{max} = 4,73 \text{ nM/giây}$

(hình 2B). So sánh với cơ chất 1 trong nghiên cứu của Windsor & Raines (2015) có  $K_m = 14,7 \mu\text{M}$  và  $V_{max} = 1,58 \text{ nM/giây}$ ; cơ chất Peptide HF có  $K_m$  thấp hơn 5 lần,  $V_{max}$  lớn hơn 3 và hiệu quả xúc tác  $V_{max}/K_m$  lớn hơn 14 lần. Sự chênh lệch này có thể giải thích do sự khác nhau về trình tự amino acid cũng như cặp huỳnh quang EDANS/DAPCYL của cơ chất 1 có hệ số hấp

thụ thấp hơn HiLyte Fluor 488/QXL 520 của peptide HF. Tuy nhiên, tỷ lệ  $K_{cat}/K_m = 13 (\text{mM.giây})^{-1}$  lại thấp hơn nhiều lần, điều này có thể giải thích do sự khác nhau về nồng độ enzyme và thể tích phản ứng của hai quy trình.

**Điều kiện thích hợp cho phản ứng xác định hoạt tính protease HIV-1 sử dụng cơ chất peptide HF**



Hình 3. Ảnh hưởng của các điều kiện đến phản ứng thủy phân cơ chất peptide HF bởi protease HIV-1

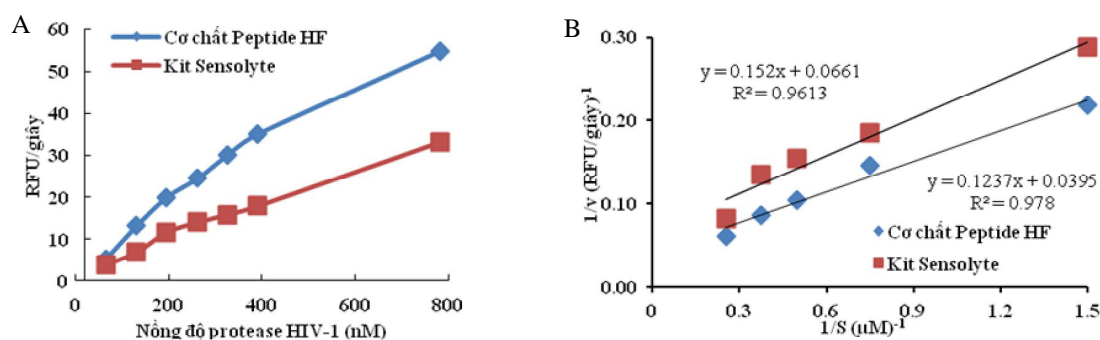
A. loại đệm phản ứng: đệm 1 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  100 mM pH 4,7 có  $\text{NaCl}$  1M, EDTA 1mM, DTT 1mM, DMSO 10%, BSA 1,0 mg/mL); đệm 2 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  100 mM pH 4,5 có  $\text{NaCl}$  0,9 M, EDTA 4 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 5 mM,  $\text{CaCl}_2$ ); B. pH tối thích; C. nhiệt độ tối thích; D. điều kiện đệm đến độ ổn định của cơ chất peptide HF; E. nồng độ DMSO; F. nồng độ BSA; G. nồng độ  $\text{NaCl}$  và  $\text{KCl}$ ; H) nồng độ  $\text{MgCl}_2$  và  $\text{CaCl}_2$ .

Với nồng độ protease HIV-1 100 ng/phần ứng (30  $\mu\text{l}$ ), nồng độ cơ chất 2  $\mu\text{M}$ , protease HIV-1 thể hiện khả năng phân cắt cơ chất peptide HF thích hợp trong đệm  $\text{CH}_3\text{COONa}$  100 mM có  $\text{NaCl}$  1 M, EDTA 1 mM,

DTT 1 mM, DMSO 10%, BSA 1,0 mg/mL (hình 3A) với một giải pH rộng (pH 4-7) và tối thích tại pH 4,7 (hình 3B). Kết quả này cũng tương tự các nghiên cứu đã công bố trước đây (Leuthardt & Roesel, 1993; Nguyen et al., 2015).

Cơ chất peptide HF cũng cho thấy bị phân giải tốt nhất bởi protease HIV-1 tại nhiệt độ 37°C (hình 3C) và nên bảo quản trong DMSO tại nồng độ 0,1 mg/mL (hình 3D). DMSO cũng giúp hoà tan tốt hơn cơ chất huỳnh quang nên làm tăng hoạt tính thủy phân cơ chất peptide HF của protease HIV-1 tại DMSO 5% (hình 3E). Hoạt tính thủy phân peptide HF của protease

HIV-1 cũng tăng lên khi có BSA 0,5 mg/mL (hình 3F) và NaCl hoặc KCl 1 M (hình 3G) nhưng bị ức chế bởi  $Ca^{2+}$  và  $Mg^{2+}$  (hình 3H). Do đó, điều kiện đệm  $CH_3COONa$  100 mM, pH 4,7 có NaCl 1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, DMSO 5%, BSA 0,5 mg/mL được lựa chọn cho các phản ứng xác định hoạt tính protease HIV-1 sử dụng cơ chất peptide HF.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ protease HIV-1 (A) và sự phụ thuộc của nồng độ cơ chất peptide HF và kit Sensolyte (B) đến tốc độ phản ứng

Trong các điều kiện thích hợp, peptide HF đã bị thủy phân bởi protease HIV-1 với các hằng số động học: tốc độ phản ứng  $V_{max} = 4,45$  nM/giây,  $K_m = 3,13$  μM và hiệu quả xúc tác  $K_{cat}/K_m = 10,89$  (mM.giây)<sup>-1</sup> (hình 4B). Khi so sánh với kit xác định hoạt tính protease HIV-1

của hãng Anaspec (Hoa Kỳ) HIV-1 Sensolyte<sup>®</sup> 520 HIV-1 Protease Assay (kit Sensolyte), cơ chất peptide HF có giá trị  $K_m$  tương đương nhưng tốc độ phản ứng  $V_{max}$  và hiệu quả xúc tác  $K_{cat}/K_m$  cũng như  $V_{max}/K_m$  cao gấp khoảng 5 lần kit hãng Sensolyte (hình 4A-B, bảng 1).

Bảng 1. Các hằng số động học của protease HIV-1 sử dụng cơ chất peptide HF và kit Sensolyte

Loại cơ chất	$V_{max}$ (nM/giây)	$K_m$ (μM)	$V_{max}/K_m$	$K_{cat}/K_m$ (mM.giây) <sup>-1</sup>
Cơ chất peptide HF	4,45	3,13	1,4	10,89
Kit sensolyte	0,73	2,3	0,3	2,4

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế thành công cơ chất huỳnh quang peptide HF cho phân tích hoạt độ protease HIV-1. Cơ chất peptide HF được thiết kế dựa theo nguyên tắc FRET và có trình tự amino acid QXL 520-GABA-SFNFPQITK-HiLyte Flour 488-NH<sub>2</sub>. Peptide HF ở nồng độ 2 μM bị thủy phân tốt nhất bởi protease HIV-1 dưới các điều kiện thích hợp: 100-200 ng protease HIV-1, đệm  $CH_3COONa$  100 mM pH 4,7 có NaCl 1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,

DMSO 5% và BSA 0,5 mg/mL và bảo quản tại nồng độ 0,1 mg/mL trong DMSO ở -80°C. Trong các điều kiện phân tích nêu trên, protease HIV-1 có ái lực cao và thủy phân hiệu quả cơ chất peptide HF với các hằng số động học  $V_{max} = 4,45$  nM/giây,  $K_{cat}/K_m = 10,89$  (mM.giây)<sup>-1</sup> tương ứng hơn gấp khoảng 5 lần khi sử dụng cơ chất thương mại HIV-1 Sensolyte<sup>®</sup> 520 HIV-1 Protease Assay (Anaspec, Hoa Kỳ).

**Lời cảm ơn:** Công trình nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ kinh phí của Đề tài Phòng

thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein mã số KLEPT 14.03.

*TÀI LIỆU THAM KHẢO*

- Bagossi P., Sperka T., Feher A., Kadas J., Zahuczky G., Miklossy G., Boross P and Tozser J., 2005. Amino Acid Preferences for a Critical Substrate Binding Subsite of Retroviral Proteases in Type 1 Cleavage Sites. *J. Virol.*, 79(7): 4213-4218.
- Beck Z. Q., Hervio L., Dawson P. E., Elder J. H. and Madison E. L., 2000. Identification of Efficiently Cleaved Substrates for HIV-1 Protease Using a Phage Display Library and Use in Inhibitor Development. *Virology*, 274(2): 391-401.
- Boross P., Bagossi P., Copeland T. D., Oroszlan S., Louis J. M., Tózer J., 1999. Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 264(3): 921-929.
- Brooks, H. B., Geeganage S., Kahl S. D., Montrose C., Sittampalam S., Smith M. C., Weidner J. R., 2012. *Assay Guidance Manual: Basic of Enzymatic Assay for HTS*. Eli Lilly & Company, Indianapolis, IN.
- Chaudhury S., Gray J. J., 2009. Identification of Structural Mechanisms of HIV-1 Protease Specificity Using Computational Peptide Docking: Implications for Drug Resistance. *Structure* 17(12): 1636-1648.
- Dunn B. M., Gustchina A., Wlodawer A. and Kay J., 1994. Subsite Preferences of Retroviral Proteinases. *Methods Enzymol.*, 241(14): 254-278.
- Kräusslich H. G., Ingraham R. H., Skoog M. T., Wimmer E., Pallai P. V., 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(3): 807-811.
- Lavis L. D., Raines, R. T., 2008. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.*, 3(3): 142-155.
- Leuthardt A., Roesel J. L., 1993. Cloning, expression and purification of a recombinant poly-histidine-linked HIV-1 protease. *FEBS Lett.*, 326(1-3): 275-280.
- Louis J. M., Clore G. M., Gronenborn A. M., 1999. Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding. *Nat. Struct. Biol.*, 6(9): 868-875.
- Matayoshi E. D., Wang G. T., Krafft G. A., Erickson, J., 1990. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science*, 247(4945): 954-958.
- Nguyen T. H. L., Nguyen T. T., Vu T. Q., Le T. H., Pham B. Y., Trinh P. L., Bui P. T., Phan T. N., 2015. An efficient procedure for the expression and purification of HIV-1 protease from inclusion bodies. *Protein. Expr. Purif.*, 116: 59-65.
- Perez M. A. S., Fernandes P. A. and Ramos M. J., 2010. Substrate Recognition in HIV-1 Protease: A Computational Study. *J. Phys. Chem. B.*, 114(7): 2525-2532.
- 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.
- Toth M. V., Marshall G. R., 1990. A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 36(6): 544-550.
- Windsor W., Raines R. T., 2015. Fluorogenic assay for inhibitors of HIV-1 protease with sub-picomolar affinity. *Sci Rep.*, 5(11286): 1-7.

## DESIGNING OF A SPECIFIC FLUOROGENIC PEPTIDE SUBSTRATE FOR HIV-1 PROTEASE ACTIVITY ASSAY

Nguyen Thi Hong Loan<sup>1,2\*</sup>, Tran Thi Thu Huyen<sup>2</sup>, Dang Thi Lieu<sup>2</sup>,  
Phan Thi Lam Hong<sup>2</sup>, Phan Tuan Nghia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology (KLEPT), VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi

<sup>2</sup>Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi

### SUMMARY

Based on the specific hydrolysis sequence in the Gag-Pol protein substrate of HIV-1 protease, we designed a fluorescence resonance energy transfer (FRET) substrate (designated peptide HF) for the enzyme. peptide HF has the sequence of QXL 520-GABA-SFNFPQITK-HiLyte Fluor 488-NH<sub>2</sub>. HiLyte Fluor 488/QXL 520 as a FRET pair because of high excitation/emission and good activity at the optimal pH of HIV-1 protease (pH<5) was chosen. QXL 520 was more stable when conjugated with serine residue at N-terminus via GABA group while leucine at the C-terminus was replaced with a lysine residue-HiLyte Fluor 488 conjugate.

The optimal reaction conditions for HIV-1 protease activity assay were found to include 100-200 ng HIV-1 protease, 2 μM peptide HF, 100 mM CH<sub>3</sub>COONa buffer at pH 4.7, containing 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% DMSO and 0.5 mg/mL BSA. Peptide HF could be stored at the concentration of 0.1 mg/mL in DMSO and at -80°C until use.

Under the above analysed conditions, HIV-1 protease showed the high affinity and the effective hydrolysis for the substrate with the kinetic parameters  $V_{max}$  of 4.45 nM/s,  $K_{cat}/K_m = 10.89$  (mM.s)<sup>-1</sup>, which were 5 times higher than the  $V_{max}$  and  $K_{cat}/K_m$  when the commercial Sensolyte® 520 substrate (Anaspec-America) was used.

**Keywords:** fluorogenic substrate, HIV-1 protease, HIV-1 protease inhibitor, Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ),  $V_{max}$ .

**Citation:** Nguyen Thi Hong Loan, Tran Thi Thu Huyen, Dang Thi Lieu, Phan Thi Lam Hong, Phan Tuan Nghia, 2017. Designing of a specific fluorogenic peptide substrate for HIV-1 protease activity assay. *Tap chi Sinh hoc*, 39(1): 115-121. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.8291.

\*Corresponding author: loannhbio@gmail.com

Received 1 May 2016, accepted 20 December 2016