

GEN PB1 VÀ PB1-F2 CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 CHỦNG A/CK/VIETNAM/HG4/2005 VÀ SO SÁNH VỚI MỘT SỐ CHỦNG PHÂN LẬP 2004 - 2007 TẠI VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Trần Quang Vui¹, Nguyễn Thị Bích Nga², Đoàn Thị Thanh Hương², Nguyễn Bá Hiên³, Lê Thanh Hòa²

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

²Viện Công nghệ sinh học

³Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Toàn bộ chuỗi gen PB1 của một chủng virus cúm A/H5N1 phân lập từ gà Hậu Giang năm 2005 (ký hiệu A/Ck/Vietnam/HG4/2005) đã được thu nhận, giải trình tự và phân tích mức độ tương đồng về nucleotide và amino acid với một số chủng phân lập năm 2004 - 2007 tại đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả phân tích cho thấy, toàn bộ gen PB1 thu nhận được từ chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) có độ dài 2274 bp, mã hóa cho chuỗi polypeptide PB1 gồm 757 amino acid. 2274 bp là độ dài vốn có của gen PB1 ở tất cả các chủng cúm A/H5N1 phân dòng Quảng Đông (Guangdong sublineage), hoàn toàn không thay đổi kể từ khi phát sinh clade 1.0 (1997) cho đến nay. PB1 có 11 nucleotide và 5 amino acid sai khác so với các chủng A/H5N1 phân lập từ gia cầm vùng đồng bằng sông Cửu Long các năm 2004 - 2007. Gen PB1-F2, lồng vào trong chuỗi nucleotide của gen PB1 từ vị trí 95 đến 367, bao gồm 90 amino acid. Amino acid asparagin (N) ở vị trí 66 trong protein PB1-F2 không biến đổi ở các chủng A/H5N1 vùng đồng bằng sông Cửu Long qua các năm 2004 - 2007. Tỷ lệ đồng nhất (identity) của gen PB1 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 so với các chủng so sánh về nucleotide thấp nhất là 97%; cao nhất là 99%; tỷ lệ tương đồng (homology) về amino acid là 98 - 99% (protein PB1) và 96 - 98% (protein PB1-F2). Tất cả 18 chủng phân lập tại đồng bằng sông Cửu Long cùng clade 1.0, vẫn thuộc phân dòng Quảng Đông.

Từ khóa: Cúm A/H5N1, đồng nhất/tương đồng, PB1, PB1-F2, thành phần nucleotide/amino acid

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cúm gia cầm (avian influenza) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, có tốc độ lây lan nhanh với tỷ lệ chết cao trong đàn gia cầm nhiễm bệnh, gây thiệt hại kinh tế lớn cho nhiều nước trên thế giới. Từ năm 2003, cúm gia cầm do phân type A/H5N1 xuất hiện tại Việt Nam và từ đó đến nay bệnh xảy ra liên tục và đang là vấn đề dịch tễ phức tạp cần phải giải quyết tại nước ta (Lê Thanh Hòa *et al.*, 2008). Hệ gen của virus cúm A phân type H5N1 bao gồm 8 phân đoạn (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS). Gen PB1 (phân đoạn 2 trong hệ gen RNA sợi đơn âm của virus) mã hóa enzyme PB1, là tiểu đơn vị xúc tác của phức hợp enzyme RNA-polymerase trong quá trình tổng hợp RNA của virus, chịu trách nhiệm gắn mũ RNA (Murphy, Webster, 1996). Những nghiên cứu gần đây cho thấy gen PB1 liên quan đến khả năng nâng cao tính gây bệnh (pathogenicity) của một số chủng virus H5N1 trên vịt (Hulse-Post *et al.*, 2007). Gen PB1 cũng là gen duy nhất có xuất xứ từ virus cúm gia cầm được phát hiện ở các virus gây đại dịch cúm trên người năm

1957 và 1968 (Kawaoka *et al.*, 1989).

Protein PB1-F2 là một chuỗi polypeptide ngắn, được mã hóa bởi một khung đọc mở, lồng hẳn vào bên trong chuỗi nucleotide của PB1 (Hình 1), có chức năng gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) đối với các tế bào có nguồn gốc miễn dịch, đặc biệt là đại thực bào phế nang (alveolar macrophage) theo cơ chế làm thay đổi hình thái, làm mất điện thế của màng ty thể (Chen *et al.*, 2001; Coleman, 2007). PB1-F2 làm tế bào nhạy cảm với sự chết do tương tác giữa 2 protein của ty thể: ANT3 (adenine nucleotide translocater 3) và VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1). Tương tác này làm tăng cường tính thấm của ty thể, làm cho các sản phẩm dễ dàng thoát ra khỏi ty thể, do đó khởi động quá trình chết theo chương trình (Zamarin *et al.*, 2005). Nghiên cứu gần đây cho thấy, sự thay đổi một amino acid, từ asparagine thành serine ở vị trí 66 (N66S) trong chuỗi PB1-F2 có tác dụng tăng cường khả năng gây bệnh của virus cúm và có vai trò quan trọng quyết định tính trầm trọng của đại dịch cúm (Conenello *et al.*, 2007).

Chủng virus cúm A/H5N1 phân lập từ gà Hậu Giang năm 2005 (chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 (H5N1)) thuộc phân dòng Quảng Đông đã được phân tích một số phân đoạn trong đó có gen H5 và N1 (Trần Quang Vui *et al.*, 2008). Trong bài báo này, chúng tôi xem xét sự biến đổi thành phần nucleotide và amino acid của gen PB1 và gen PB1-F2, so sánh với các chủng cúm A/H5N1 phân lập trên gia cầm tại vùng đồng bằng sông Cửu Long qua các năm 2004 - 2007.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Bệnh phẩm

Bệnh phẩm là dịch khí quản-phế quản chứa virus cường độc cúm A/H5N1 thu thập từ một gà mắc bệnh tại Hậu Giang năm 2005 (ký hiệu là A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) hay vắn tắt là CKHG4, đã được vô hoạt bằng nhiệt độ, bảo quản ở 20°C.

Tách RNA hệ gen của virus

RNA hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ kit QIAamp Viral Mini kit (QIAGEN Inc.) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thiết kế mồi và thực hiện phản ứng RT-PCR

Để thu nhận toàn bộ phân đoạn 2 chứa gen PB1, các cặp mồi dùng cho phản ứng RT-PCR được thiết kế như sau:

Mồi xuôi PB1F1: 5'TTGAATGGATGTCAATCC GA3';

Mồi ngược PB1R2: 5'CATCGGTATGTGTATC TGTAGTCC3'.

Mồi xuôi PB1F3: 5'TGAGCATTGGTGTTAC AGTG3';

Mồi ngược PB1R3: 5'AGTAGAAACAAGGCA TTTTTT3'.

Bằng phản ứng RT-PCR một bước, với cặp mồi PB1F1-PB1R2 và cặp mồi PB1F3-PB1R3, hai đoạn sản phẩm của chuỗi nucleotide PB1 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 đã được thu nhận, theo chu trình nhiệt: 42°C/59 phút, 95°C/10 phút, 40 chu kỳ [94°C/1 phút, 55°C/1 phút, 72°C/3 phút], 72°C/10 phút, sau chu kỳ cuối cùng bảo quản sản phẩm ở 4°C cho đến khi kiểm tra và tinh sạch sản phẩm.

Kiểm tra sản phẩm, tách dòng và giải trình tự

Các sản phẩm RT-PCR được kiểm tra trên thạch agarose 1%, tinh sạch bằng bộ kit QIAquick Purification kit (QIAGEN) và dòng hóa vào vector pCR2.1TOPO (Invitrogen). Tách dòng và thu nhận DNA của plasmid tái tổ hợp bằng bộ kit QIApreps Spin Mini kit của hãng QIAGEN.

Trình tự nucleotide của plasmid tái tổ hợp được giải trình trên máy tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học. Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03, sau đó là chương trình AssemLIGN1.9 và hệ chương trình MacVector 8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh. So sánh đối chiếu và xử lý số liệu các chuỗi bằng chương trình GENEDOC 2.5. Thành phần amino acid được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn) trong Ngân hàng gen thông qua chương trình GENEDOC 2.5.

Phân tích số liệu và chọn chuỗi so sánh

Chúng tôi truy cập Ngân hàng gen, thu thập chuỗi gen PB1 và PB1-F2 của các chủng A/H5N1 cường độc đương nhiên phân lập trong các năm 2004 - 2007 từ gia cầm vùng đồng bằng sông Cửu Long tại Việt Nam. Danh sách các chuỗi gen PB1 và PB1-F2 sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở bảng 1.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thu nhận chuỗi gen PB1 và PB1-F2 của virus cúm A/H5N1 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005

Bằng các phương pháp sinh học phân tử bao gồm phản ứng RT-PCR, tách dòng, giải trình trình tự và phân tích chuỗi gen bằng các chương trình xử lý chuỗi trình tự nucleotide, chúng tôi đã thu nhận toàn bộ gen PB1 và PB1-F2 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005, trình bày ở hình 1.

Trình tự trình bày ở Hình 1 cho thấy, toàn bộ gen PB1 thu nhận được từ chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) có độ dài 2274 bp, mã hóa cho chuỗi polypeptide PB1 gồm 757 amino acid. 2274 bp là độ dài gen PB1 vốn có ở tất cả các chủng cúm A/H5N1 phân dòng Quảng Đông (Guangdong sublineage), hoàn toàn không thay đổi kể từ khi phát sinh clade 1.0 cho đến nay (Hulse-Post *et al.*, 2007).

Lồng vào trong chuỗi nucleotide của PB1, từ vị trí 95 đến 367 (lệch 1 nucleotide trên khung đọc theo chiều xuôi so với PB1) là PB1-F2, có độ dài 273 bp bao gồm 90 amino acid (Hình 1). Như vậy, toàn bộ chuỗi gen PB1 và gen PB1-F2 lồng vào bên trong PB1 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 đã được thu nhận và giải trình tự. Sự tận dụng thành phần RNA/DNA lồng gen để tạo nên cấu trúc gen hoạt động ở virus là hiện tượng hiếm gặp. Do vậy, cùng với gen NS1 và NS2, gen M1 và M2, trên cùng một chuỗi nucleotide ở phân đoạn 2, có hai gen PB1 và PB1-F2 càng chứng minh virus cúm A nói chung và H5N1 nói riêng có những đặc tính cấu trúc hết sức đặc sắc.

Phân tích biến đổi thành phần gen PB1 và PB1-F2 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 so sánh với các chủng phân lập tại vùng đồng bằng sông Cửu Long trong các năm 2004 - 2007

Gen PB1 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 có:

- Mười một nucleotide sai khác hoàn toàn so với tất cả các chủng so sánh (Bảng 1) ở các vị trí: 551

(C>T), 616 (A>G), 894 (A>C), 917 (G>A), 968 (T>C), 1000 (A>C), 1077 (C>T), 1698 (A>G), 1809 (C>T), 1891 (C>T), 2187 (C>T);

- Tám vị trí sai khác với 3 chủng phân lập các năm 2005 - 2007: 360 (T>C), 525 (T>C), 702 (C>T), 781 (A>T), 792 (G>A), 795 (G>A), 1254 (C>T), 1860 (C>T);

- Năm vị trí sai khác so với tất cả các chủng phân lập năm 2007: 504 (G>A), 664 (C>T), 1092 (A>G), 1098 (A>G), 1890 (A>G).

- Ngoài ra chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 còn có 2 nucleotide sai khác hoàn toàn so với tất cả các chủng phân lập trong các năm 2004 - 2005 ở các vị trí 225 (A>G) và 1479 (A>G) (không trình bày ở đây).

Những thay đổi về nucleotide trên đây, dẫn đến sai khác hoàn toàn 5 amino acid trên protein PB1 so với tất cả các chủng, cụ thể ở các vị trí **S206G**, **S306N**, **M323T**, **S334R**, **L631F**; 2 amino acid so với các chủng phân lập năm 2005 - 2007, (**S261C**, **N265K**); và 1 amino acid (**K168N**) sai khác so với tất cả các chủng phân lập năm 2007 (Bảng 2).

Bảng 1. Các chuỗi gen của các chủng A/H5N1 của Việt Nam sử dụng để so sánh, phân tích gen PB1 và PB1-F2.

STT	Gen đăng ký	Loài mắc	Năm	Phân type	Địa phương	Số đăng ký
1	A-Ck-VN-HG4-05	Gà	2005	H5N1	Hậu Giang	Nghiên cứu này
2	A-Ck-VN-AG-010-04	Gà	2004	H5N1	An Giang	DQ138149
3	A-Ck-VN-VL-008-04	Gà	2004	H5N1	Vĩnh Long	DQ138148
4	A-Ck-VN-CT-018-04	Gà	2004	H5N1	Cần Thơ	DQ138151
5	A-Ck-VN-LA-024-04	Gà	2004	H5N1	Long An	DQ138153
6	A-Ck-VN-KG-076-04	Gà	2004	H5N1	Kiên Giang	DQ138157
7	A-Ck-VN-DT-171-04	Gà	2004	H5N1	Đồng Tháp	DQ138156
8	A-Ck-VN-TG-023-04	Gà	2004	H5N1	Tiền Giang	DQ138152
9	A-Dk-VN-TG-007A-04	Vịt	2004	H5N1	Tiền Giang	DQ138146
10	A-Dk-VN-1231-05	Vịt	2005	H5N1	Sóc Trăng*	CY029517
11	A-Dk-VN-1233-05	Vịt	2005	H5N1	An Giang*	CY029525
12	A-Dk-VN-1771-05	Vịt	2005	H5N1	Cần Thơ*	CY029549
13	A-Ck-VN-15-07	Gà	2007	H5N1	Sóc Trăng*	CY029613
14	A-Ck-VN-29-07	Gà	2007	H5N1	Hậu Giang*	CY029629
15	A-Dk-VN-5-07	Vịt	2007	H5N1	Cà Mau*	CY029581
16	A-Dk-VN-18-07	Vịt	2007	H5N1	Kiên Giang*	CY029621
17	A-Dk-VN-34-07	Vịt	2007	H5N1	Cần Thơ*	CY029645
18	A-Dk-VN-7-07	Vịt	2007	H5N1	Cà Mau*	CY029597

Ghi chú: * Nguyen et al., 2008.

30 60 90 120
 ATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTGAAAGTACCAGTGC AAAATGCTATAAGTACCACATTC CCTTATACTGGAGACCCCTCCATACAGCCATGGACACAGGACAGGATACACCATG
 M D V N P T L L F L K V P V Q N A I S T T F P Y T G D P P Y S H G T G T G Y T M >
 |-----CKHG4 PB1-F2 (273bp)---->
 CKHG4-PB1 (274bp)
 150 180 210 240
 GACACAGTCAACAGACACACCAATATTCAGAAAAGGGGAAGTGGACAACAACACAGAGACTGGAGCACCCCACTCAACCCCGATTGATGGACACTACCTGAAGATAATGAGCCGAT
 D T V N R T H Q Y S E K G K W T T N E T G A P Q L N P I D G P L P E D N E P S >
 T Q S T E H T N I Q K R G S G Q Q T Q R L E H P N S T R L M D H Y L K I M S P V
 -----CKHG4 PB1-F2 (273bp)----->
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 270 300 330 360
 GGSTATGCACAAACAGATTCTGTATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCCACCGGATCTTTGAAAACCTCGTGCTTGA AACCTGGAATTTGTTCAACAAACAAGAGTGGAT
 G Y A Q T D C V L E A M A F L E E S H P G I F E N S C L E T M E I V Q Q T R V D >
 G M H K Q I V Y W K Q W L S L L K N P T Q G S L K T R V L K R W K L F N K Q Q R E W I >
 -----CKHG4 PB1-F2 (273bp)----->
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 390 420 450 480
 AAACAGTCCCAAGGTGCCACGACCTGACTGGACATTGAATAGAAACCAACCGGCTCAACTGCTTTGGCCAACTATAGAAATCTCAGATCGAACCGTCTAACCGCAATGAATCG
 K L T Q G R Q T Y D W T L N R N Q P A A T A L A N T I E I F R S N G L T A N E S >
 N * >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 510 540 570 600
 GGACGGCTAATAGATTTCCTCAAGGATGTGATGGAATCAATGGAATAGGAAGAAATGGAGATAACAACACACTTCCAGAGAAAGAGAAAGGGTGGAGGACAAACATGACCAAGAAAATGGTC
 G R L I D F L K D V M E S M D K E E M E I T H F Q R K R R V R D N M T K K M V >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 630 660 690 720
 ACACAAGAACAATAGGAAGAAAACAAAGGCTGAACAAAAGAGCTACCTGATAAGAGCAGTACACTGAAACAATGACAAAAGATCGACAAAAGAGGCAAAATGAGAGGCGGAGCG
 T Q R T I R K K K Q R L N K K S Y L I R A L T L N T M T K D A E R G K L K R R A >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 750 780 810 840
 ATTGCAACACCCGGAATGCAAAATCAGAGGATTCGTCTACTTTGTTGAACACTAGCGAGGAGTATCTGTGAGAACTTGGCAATCTGGACTCCAGTCGGAGGGAATGAGAAGAAGGCT
 I A T P G M Q I R G F V Y F V E T L A R S I C E K L E Q S G L P V G G N E K K A >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 870 900 930 960
 AAATGGCAACGCTCGTGAGGAAAGATGATGACTAACAAGTACTGAACTATCCTTACAACTTACTGGACAGTACCAAAATGGAATGAGAATCAGAATCCTAGGATGTTCTTGCCA
 K L A N V V R K M M T N S Q D T E L S F T I T G D S T K W N E N Q N P R M F L A >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 990 1020 1050 1080
 ATGATAATGTACATCACAAGGAACAGCCAGAAATGGTTAGGAATGTCTTAAGCAATGCTCTAATGTTCTCAACAAAATGGCGAGACTAGGAAAAGGATACATGTTCCGAAAGCAAG
 M I M Y I T R N Q P E W F R N V L S I A P I M F S N K M A R L G K G Y M F E S K >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1110 1140 1170 1200
 AGCATGAAGTTACGAACACAATACCAGCAGAAATGCTGCAAACTGATCTTAAATCTCAATGAATTAACGAAAAGAAAATGAGAAAATTAAGCCCTCTATTAATAGATGGTACA
 S M K L R T Q I P A E M L A N I D L K Y F N E L T K K K I E K I R P L L I D G T >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1230 1260 1290 1320
 GCCTCATTGACCCCTGGAATGATGGGATGTTCAACATGCTGAGTACAGTCTAGGATTTCAATCTGAACTTTGGACAGAAAAGGTACACAAAACCATATATGGTGGGACCGA
 A S L S P G M M M G M F N M L S T V L G V S I L N L G Q K R Y T K T T Y W W D G >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1350 1380 1410 1440
 CTCCAATCCTCTGATGATTTCGCTCTCATGTAATGCACCGAATCATGAGGAAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTATAGGACTTGAACATAGTTGGAATCAATATGAGCAAGAG
 L Q S S D D F A L I V N A P N H E G I Q A G V D R F Y R T C K L V G I N M S K K >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1470 1500 1530 1560
 AAGTCTTACATAAAATCGGACAGGACATTTGAATTCACAAGCTTTTTCTACCGCTATGGATTTGTAGCCAATTCAGTATGGAGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCG
 K S Y I N R T G T F E F T S F F Y R Y G F V A N F S M E L P S F G V S G I N E S >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1590 1620 1650 1680
 GCCGACATGAGCATGGTGTACAGTATAAAAACAATATGATAAACAACGACCTTGGGGCAGCAACAGCTCAGATGGCTCTCAGTTATTATCAAGGACTACAGATACATACCGA
 A D M S I G V T V I K N N M I N N D L G P A T A Q M A L Q L F I K D Y R Y Y R >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1710 1740 1770 1800
 TGCCACAGAGGGGATACACAATCCAAACAAGGAGATCATTGAGCTGAAGAAGCTGTGGGAGCAACCCGTTCAAAGCCAGGACTGTGGTTTCAGATGGAGGACCAATCTATACAAT
 C H R G D T Q I Q T R R S F E L K K L W E Q T R S K A G L L V S D G G P N L Y N >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1830 1860 1890 1920
 ATCCGAAAACCTCCATATTCCTGAAGTCTGCTTAAAATGGAATGATGGATGAAGATTAACAGGGCAGACTGTGTAATCCTCTGAATCCACTCGTTCAGCCATAAGGAAATGAATCTGTG
 I R N L H I P E V C L K W E L M D E D Y Q G R L C N P L N P L V S H K E I E S V >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 1950 1980 2010 2040
 AACAAATGCTAGTAAATGCCAGCTCATGGCCCGCCAAAGATGGAATATGATGCCGTGCAACTACACATTCATGGAATCCTAAAAGGAACCGTTCCATTCTCAATCAGGATCAAAAG
 N N A V V M P A H G P A K S M E Y D A V A T T H S W I P K R N R S I L N T S Q R >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 2070 2100 2130 2160
 GGAATCTTGGAGTGAACAGATGACAGAAAGTGCATCACTTTCAGAAAATCTTCCACAGCTTCATATCGGAGGCCAGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCT
 G I L E D E Q M Y Q K C C N L F E K F P S S S Y R R P V G I S S M V E A M V S >
 CKHG4-PB1 (2274bp)
 2190 2220 2250
 AGGCCCGAATGACGCAGAAATGACTTCGAGTTCGGAAGGATTAAGAAGAAGAGTTTCTGAGATCATGAAGATCTGTCCACCATTAAGAACTCAGACGGCAAAAATAG
 R A R I D A R I D F E S G R I K K E E F A E I M K I C S T I E E L R R Q K * >
 CKHG4-PB1 (2274bp)

Hình 1. Trình tự nucleotide và amino acid của gen PB1 và PB1-F2 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1). Dòng trên là trình tự nucleotide, dòng dưới là trình tự amino acid, trình bày bằng chương trình MacVector 8.2 (Accelrys Inc.). Chuỗi nucleotide cấu trúc của gen PB1-F2 được bôi đậm và gạch bên dưới.

Bảng 2. Vị trí và loại amino acid sai khác của protein PB1 giữa chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 và các chủng A/H5N1 vùng đồng bằng sông Cửu Long.

Vị trí có sai khác amino acid trong PB1	
Chủng	8 11 52 64 152 168 206 214 215 235 261 265 306 323 334 397 455 458 493 553 566 569 571 584 586 618 631 691
1	L N K P S K S N K N S N S M S I N G T K T Q S R K E L K
2	G N T R F
3	G N T R F
4	G N T R K F
5	G N T R V F
6	G N T R F
7	G N T R F
8	G N T R V F
9	G N T R V F
10	G C K N T R F
11	K L N G C K N T R F
12	K G C K N T R F
13	I K S N G C K N T R N M H N F
14	K N G S C K N T R M N F
15	K T N G C K N T R N F
16	K N G C K N T R N V F
17	N G C K N T R D R N V F S
18	K N G K K C K N T R N V F

Ghi chú: Ký hiệu các chủng 1 - 18 ở bảng 1; Chuỗi số 1 là các amino acid của PB1 ở chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 (H5N1) có sai khác với các chủng còn lại; Vị trí 206, 306, 323, 334, 631 cho thấy sai khác hoàn toàn với tất cả các chủng được bồi đậm.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*
A-Ck-VN-HG :	MEQQQDTPWTQSTEHTNIQKRGSGQQTQRLEHPNSTRLMDHYLKIMSPVGMHKQIVYWKQWLSLKNPTQGSGLKTRVLKRWKLFNKQEWIN-								
A-Ck-VN-AG :								
A-Ck-VN-VL :								
A-Ck-VN-CT :								
A-Ck-VN-LA :								
A-Ck-VN-KG :								
A-Ck-VN-DT :								
A-Ck-VN-TG :								
A-Dk-VN-TG :								
A-Dk-VN-12 :E.....								
A-Dk-VN-12 :S.....								
A-Dk-VN-17 :								
A-Ck-VN-15 :G.....								
A-Ck-VN-29 :								
A-Dk-VN-5- :								
A-Dk-VN-18 :								
A-Dk-VN-34 :								
A-Dk-VN-7- :A.....								

Hình 2. So sánh thành phần amino acid của protein PB1-F2 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng A/H5N1 vùng đồng bằng sông Cửu Long 2004 - 2007. Ghi chú: Không có thay đổi amino acid N>S ở vị trí 66 của tất cả các chủng A/H5N1 của Việt Nam trong nghiên cứu này.

Bảng 3. Tỷ lệ tương đồng (%) nucleotide (trên đường chéo) và amino acid (dưới đường chéo) của gen PB1 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng A/H5N1 vùng đồng bằng sông Cửu Long.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	■	99	99	99	99	99	99	99	99	98	98	98	97	97	98	98	97	98
2	99	■	100	99	99	99	100	99	99	99	99	99	98	98	98	98	98	98
3	99	100	■	99	99	99	100	99	99	99	99	99	98	98	98	98	98	98
4	99	99	99	■	99	99	99	99	99	99	99	99	98	98	98	98	98	98
5	99	99	99	99	■	99	99	99	99	99	99	99	98	98	98	98	98	98
6	99	100	100	99	99	■	99	99	99	99	99	99	98	98	98	98	98	98
7	99	100	100	99	99	100	■	99	99	99	99	99	98	98	98	98	98	98
8	99	99	99	99	100	99	99	■	99	99	99	99	98	98	98	98	98	98
9	99	99	99	99	100	99	99	100	■	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10	99	99	99	99	99	99	99	99	99	■	99	99	98	98	99	98	98	98
11	98	99	99	99	99	99	99	99	99	99	■	99	98	98	99	99	98	99
12	98	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	■	98	98	99	98	98	99
13	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	■	98	99	99	98	99
14	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	98	■	98	98	98	98
15	98	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	98	■	99	99	99
16	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	99	99	■	99	99
17	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	98	98	98	98	99	99	■	99
18	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	98	99	99	99	■

Ghi chú: Các số 1 - 18 theo thứ tự các chủng liệt kê ở bảng 1; phần đóng khung là các chủng 2 - 9 phân lập năm 2004.

Bảng 4. Tỷ lệ tương đồng (%) nucleotide (trên đường chéo) và amino acid (dưới đường chéo) của gen PB1-F2 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng so sánh.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	■	99	99	99	99	99	99	99	99	98	98	99	99	99	99	99	99	99
2	98	■	100	100	100	100	100	100	100	99	99	99	98	99	99	99	99	98
3	98	100	■	100	100	100	100	100	100	99	99	99	98	99	99	99	99	98
4	98	100	100	■	100	100	100	100	100	99	99	99	98	99	99	99	99	98
5	98	100	100	100	■	100	100	100	100	99	99	99	98	99	99	99	99	98
6	98	100	100	100	100	■	100	100	100	99	99	99	98	99	99	99	99	98
7	98	100	100	100	100	100	■	100	100	99	99	99	98	99	99	99	99	98
8	98	100	100	100	100	100	100	■	100	99	99	99	98	99	99	99	99	98
9	98	100	100	100	100	100	100	100	■	99	99	99	98	99	99	99	99	98
10	96	97	97	97	97	97	97	97	97	■	99	99	98	99	99	99	99	98
11	96	97	97	97	97	97	97	97	97	97	■	99	98	99	99	99	99	98
12	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	■	99	100	99	99	99	99
13	97	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	97	■	99	99	99	99	99
14	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	100	97	■	99	99	99	99
15	98	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	98	■	100	100	99
16	98	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	98	100	■	100	99
17	98	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	98	100	100	■	99
18	97	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	97	97	97	98	98	98	■

Ghi chú: Các số 1 - 18 theo thứ tự các chủng liệt kê ở bảng 1; phần đóng khung là các chủng 2 - 9 phân lập năm 2004.

Gen PB1-F2 có sai khác nucleotide ở hai vị trí 131 (A>G) và 266 (T>C) so với hầu hết các chủng khác của Việt Nam (không trình bày ở đây). Đối với chuỗi polypeptide, PB1-F2 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 chỉ có một amino acid sai khác so với các chủng phân lập từ gia cầm vùng đồng bằng sông Cửu Long qua các năm 2005 - 2007 ở vị trí 89 (I89T) (Hình 2); sai khác một amino acid so với các chủng A-Dk-VN-7-07(CY029597), A-Ck-VN-15-07(CY029613), A-Dk-VN-1233-05(CY029525) và A-Dk-VN-1231-05 (CY029517) ở các vị trí lần lượt là 6 (D6A), 21 (R21G), 33 (P33S), và 70 (G70E) (Hình 2). Một điều cần xem xét là loại amino acid ở vị trí 66, liên quan đến cường độ gây bệnh, nếu thay đổi từ asparagine (N) thành serine (S) (Conenello *et al.*, 2007). Asparagine (N) ở vị trí 66 trong protein PB1-F2 được cho là có vai trò chủ yếu trong quá trình gây bệnh của virus cúm A/H5N1 cũng đã được phát hiện trong thành phần amino acid của protein PB1-F2 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 và không có sự biến đổi amino acid N>S ở vị trí này trong tất cả các chủng A/H5N1 phân lập qua các năm 2004 - 2007 của Việt Nam (Hình 2, phần đồng khung).

Hoạt tính enzyme polymerase của virus A/H5N1 được tăng cường bởi sự có mặt của proline (P) ở vị trí 13 trong protein PB1 (Gabriel *et al.*, 2005). Chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005, cũng như các chủng phân lập từ gia cầm vùng đồng bằng sông Cửu Long các năm 2004 - 2007 đều có loại amino acid này ở vị trí 13. Mặt khác, amino acid tyrosin (Y) ở vị trí 436 trong protein PB1 có liên quan đến khả năng gây bệnh của virus A/H5N1 (Hulse-Post *et al.*, 2007) cũng phát hiện không biến đổi ở các chủng vùng đồng bằng sông Cửu Long.

So sánh tỷ lệ đồng nhất nucleotide và tương đồng amino acid của PB1 và PB1-F2 giữa chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng A/H5N1 vùng đồng bằng sông Cửu Long

Kết quả phân tích giữa chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng được lựa chọn để so sánh cho thấy, các chủng biểu hiện mức độ đồng nhất (identity) về nucleotide và tương đồng (homology) amino acid được chia làm 2 nhóm rõ rệt: nhóm các chủng phân lập năm 2004 (số 2 - 9) và nhóm các chủng phân lập năm 2005 - 2007 (chủng số 1 và 10 - 18).

- Đối với gen PB1: Các chủng năm 2004 có mức độ tương đồng cao, 99 - 100% (nucleotide và amino acid) (Bảng 3), chứng tỏ, cho đến 2004, sau hơn 1

năm virus cúm A/H5N1 xâm nhập vào đồng bằng sông Cửu Long, tuy đã có đột biến ở gen PB1, nhưng mức độ còn thấp (sai khác 1 - 2%). Các chủng phân lập về sau (2005 - 2007), đã có sự phân hóa sâu sắc hơn, mức độ tương đồng dao động lớn hơn (97 - 99% về nucleotide và 98 - 99% về amino acid) (Bảng 3).

- Đối với protein PB1-F2: Tỷ lệ tương đồng dao động lớn, về nucleotide (98 - 100%) và về amino acid (96 - 100%), tuy nhiên, ở các chủng phân lập năm 2004, chưa có sai khác trong gen PB1-F2, tất cả 8 chủng có mức độ tương đồng 100% (Bảng 4, phần đồng khung). Những chủng phân lập về sau (2005 - 2007), sự sai khác nucleotide và amino acid càng lớn, đặc biệt một số chủng mức độ tương đồng amino acid chỉ đạt 96% (Bảng 4). Mặc dù vậy, khi phân tích các gen khác và toàn bộ hệ gen, các chủng cúm A/H5N1 tại đồng bằng sông Cửu Long (2004 - 2007), kể cả chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005, vẫn chưa có những biến đổi lớn, qua phân tích phả hệ và kháng nguyên, chúng vẫn thuộc phân nhóm clade 1.0 (Nguyen *et al.*, 2008; Trần Quang Vui *et al.*, 2008).

KẾT LUẬN

Từ các kết quả phân tích trên đây, chúng tôi kết luận: i) Độ dài của gen PB1 chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 là 2274 bp, không biến đổi so với các chủng thuộc phân dòng Quảng Đông; ii) Gen PB1 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 có 11 nucleotide và 5 amino acid sai khác so với các chủng A/H5N1 phân lập từ gia cầm vùng đồng bằng sông Cửu Long các năm 2004 - 2007; iii) Gen PB1-F2, lồng vào trong chuỗi nucleotide của gen PB1 từ vị trí 95 đến 367, bao gồm 90 amino acid; iv) Thành phần nucleotide và amino acid giữa chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng A/H5N1 vùng đồng bằng sông Cửu Long có mức độ tương đồng 97 - 98% (nucleotide) và 98 - 99% (amino acid) đối với gen PB1; 98 - 99% (nucleotide) và 96 - 98% (amino acid) đối với protein PB1-F2; v) Tất cả 18 chủng phân lập tại đồng bằng sông Cửu Long cùng clade 1.0, vẫn thuộc phân dòng Quảng Đông.

Lời cảm ơn: Chúng tôi cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ cấp kinh phí cho Nhiệm vụ Nghị định thư Việt Nam - Thái Lan về nghiên cứu sinh học phân tử cúm A/H5N1 tại Việt Nam do PGS. TS. Lê Thanh Hòa làm chủ nhiệm và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học hỗ trợ trang thiết bị để thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW (2001) A novel influenza A virus mitochondrial Protein that induces cell death. *Nat Med* 7: 1306-1312.
- Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P (2007) A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* 3: 1414-1421.
- Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J (2005) The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18590-18595.
- Hulse-Post DJ, Franks J, Boyd K, Salomon R, Hoffmann E, Yen HL, Webby RJ, Walker D, Nguyen TD, Webster RG (2007) Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. *J Virol* 81: 8515-8524.
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG (1989) Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63: 4603-4608.
- Lê Thanh Hòa, Đinh Duy Kháng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Trần Bình (2008) Virus cúm A/H5N1: Vấn đề dịch tễ học, tiến hóa, hình thành genotype và tương đồng kháng nguyên - miễn dịch - vaccine. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4A): 529-553.
- Murphy BR, Webster RG (1996) Orthomyxoviruses. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.) *Fields Virology* 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 1397-1445.
- Nguyen TD, Nguyen TV, Vijaykrishna D, Webster RG, Guan Y, Peiris MJS, Smith GJD (2008) Multiple Sublineages of Influenza A Virus (H5N1), Vietnam, 2005 - 2007. *Emerg Infect Dis* 14(4): 632-636.
- Trần Quang Vui, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Thanh Hòa (2008) Nghiên cứu biến đổi thành phần gen H5 của virus cúm A/H5N1 phân lập từ gà Hậu Giang so sánh với các chủng của Việt Nam và vùng Đông Nam Á (2005 - 2008). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 6(6): 562-569.
- Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P (2005) Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 1(1): e4.

THE PB1 AND PB1-F2 GENES OF THE INFLUENZA VIRUS A/H5N1 STRAIN (A/CK/VIETNAM/HG4/2005) AND ITS COMPARATIVE ANALYSIS WITH THOSE ISOLATED DURING 2004 - 2007 IN THE MEKONG DELTA REGION

Tran Quang Vui¹, Nguyen Thi Bich Nga², Doan Thi Thanh Huong², Nguyen Ba Hien³, Le Thanh Hoa^{2*}

¹College of Agriculture and Forestry, Hue University

²Institute of Biotechnology

³Hanoi University of Agriculture

SUMMARY

The entire PB1 gene of an avian influenza isolate collected from a chicken in Hau Giang province (designated as A/Ck/Vietnam/HG4/2005) was obtained, completely sequenced, and analyzed for identity/homology with those strains available during 2004 - 2007 in the Mekong Delta region. As results, the entire PB1 gene obtained from the A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) strain is 2274 bp, encoding for the PB1 polypeptide of 757 amino acids. The 2274 bp is the size of all the avian influenza A/H5N1 strains belonging to the Guangdong sublineage, invariable since the formation of the clade 1.0 (1997). PB1 has 11 nucleotide and 5 amino acid variations in comparison to those isolated in the Mekong Delta region during 2004 - 2007. The PB1-F2, enclaved in the PB1 nucleotide frame from nucleotide 95 to 367, coding 90 amino acids. Asparagin amino acid (N) at the 66th site in the PB1-F2 is unchanged in all the strains isolated in the Mekong Delta region during 2004 - 2007 so far in this study. The identity of the PB1 gene of A/Ck/Vietnam/HG4/2005 is 97% for nucleotide at the lowest and 100% at the highest level; the homology is varied 98 - 99% for amino acid (protein PB1) and 96 - 98% (protein PB1-F2). All 18 strains isolated in the Mekong Delta region belong to clade 1.0 of the Guangdong sublineage.

Keywords: Avian influenza A/H5N1, composition of nucleotide/amino acids, identity/homology, PB1, PB1-F2

* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37567297; E-mail: imibtvn2@gmail.com