

BIỂU HIỆN PROTEIN GP41 CỦA VIRUS HIV PHÂN TYPE CRF01_AE TRONG *E. COLI* VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ KHÁNG HIV TRONG HUYẾT THANH BỆNH NHÂN BẰNG WESTERN BLOT VÀ ELISA

Bạch Thị Như Quỳnh¹, Vũ Thị Hiền¹, Hà Thị Thu¹, Nguyễn Thị Hoa¹, Lê Phương Hằng¹, Nguyễn Thanh Tùng¹, Nguyễn Xuân Bắc², Đồng Văn Quyền¹, Lê Văn Phùng³, Đinh Duy Kháng¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Đại học Dược, Hà Nội

³Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và Sinh phẩm y tế

TÓM TẮT

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả biểu hiện protein GP41 của virus HIV phân type CRF01_AE ở vi khuẩn *E. coli* chủng BL21 (DE3) và ứng dụng GP41 tái tổ hợp để phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân bằng Western blot và ELISA. Gen mã hóa vùng ngoại bào (extracellular domain) của protein GP41 được khuếch đại bằng phương pháp PCR, gắn vào vector biểu hiện pET32a+. Các dòng vector tái tổ hợp mang gen gp41 được chọn lọc bằng cắt kiểm tra với các enzyme cắt hạn chế và xác định trình tự. Theo thiết kế, GP41 tái tổ hợp được gắn với 6 Histidine và Theoredoxin (Trx) ở đầu N có khối lượng phân tử khoảng 37 kDa. GP41 tái tổ hợp biểu hiện ở dạng hòa tan với hiệu suất cao nhất (20 mg/l môi trường nuôi cấy) ở điều kiện 30°C và 0,5 mM IPTG. Protein tái tổ hợp được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực ProBond Nickel-Clelating Resin, sau đó protein tinh sạch được sử dụng để phát hiện kháng thể kháng HIV tự nhiên trong huyết thanh bệnh nhân bằng Western blot và ELISA. Kết quả Western blot cho thấy GP41 tái tổ hợp phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng lại chúng trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm HIV, đặc biệt phản ứng với kháng thể kháng HIV phân type CRF01_AE mạnh hơn so với kháng thể kháng HIV phân type B. Điều này gợi ý sự cần thiết phải phát triển các kit chẩn đoán HIV trên cơ sở các kháng nguyên có nguồn gốc từ các phân type đang lưu hành trong nước.

Từ khóa: HIV-1 subtype CRF01_AE, gp41, kit chẩn đoán HIV, Western blot, ELISA

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong những nước thuộc khu vực Đông Nam Á phát hiện trường hợp nhiễm HIV muộn hơn so với các châu lục khác trên thế giới nhưng lại nhanh chóng trở thành nước có tỷ lệ nhiễm HIV cao trong khu vực. Theo thống kê của Bộ Y tế (Số: 1991 /BYT-AIDS ngày 6 tháng 4 năm 2010), năm 2009 toàn quốc báo cáo xét nghiệm phát hiện 15.713 trường hợp nhiễm HIV, 5.785 bệnh nhân AIDS và 2.017 trường hợp tử vong do AIDS. HIV là loại virus có sự biến đổi di truyền rất lớn, chúng có khả năng biến đổi nhanh chóng và kháng lại các loại thuốc điều trị. Cho đến nay vaccine phòng chống HIV vẫn còn đang trong giai đoạn thử nghiệm và chưa mang lại những hiệu quả rõ rệt. Do đó việc chẩn đoán, phát hiện sớm nguồn lây nhiễm là biện pháp cấp thiết và hiệu quả nhất để kiểm soát và hạn chế sự lây nhiễm HIV trong cộng đồng.

HIV thường được phát hiện một cách gián tiếp thông qua kháng thể đặc hiệu kháng lại kháng nguyên của virus có trong huyết thanh bệnh nhân

(Gurtler, 1996). Trong quy trình chuẩn, để xác nhận một mẫu là dương tính với HIV thì phải trải qua hai lần kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA với kết quả dương tính và khẳng định lại bằng kỹ thuật Western blot, một kỹ thuật có độ đặc hiệu cao hơn. P24, GP41, GP120 là 3 kháng nguyên quan trọng của virus HIV, các kit chẩn đoán HIV trên thị trường hiện nay đều phát triển trên cơ sở các kháng nguyên này.

GP41 có bản chất glycoprotein được mã hóa bởi gen vỏ *env*, có kích thước 1080 bp (Buzon, 2010). Kháng nguyên *env* gp41 có cấu trúc gồm 3 vùng: vùng bộc lộ trên bề mặt virus, vùng bám màng và vùng nằm sâu bên trong virus. Kháng thể kháng GP41 tồn tại trong suốt cuộc đời người nhiễm HIV và là một trong những dấu ấn quan trọng trong chẩn đoán HIV (Dharma *et al.*, 1999). Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã biểu hiện và ứng dụng GP120 (Bạch Thị Như Quỳnh *et al.*, 2010) và P24 (Đồng Văn Quyền *et al.*, 2008) tái tổ hợp để phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân. Trong công trình này chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa vùng kháng

nguyên GP41 bọc lộ trên bề mặt virus HIV phân type CRF01_AE - phân type lưu hành chủ yếu tại Việt Nam, tinh chế GP41 tái tổ hợp và thử nghiệm khả năng phát hiện kháng thể kháng HIV tự nhiên trong các mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật Western blot và ELISA.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các mẫu máu của bệnh nhân nhiễm HIV được cung cấp bởi Viện Vệ sinh phòng dịch quân đội, Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp Hải Phòng. Gen gp41 được phòng Vi sinh vật phân tử tách dòng, lưu giữ và trình tự gen đã được đăng ký trong ngân hàng gen quốc tế với mã số FN600552. Plasmid mang gen gp41 này sẽ được sử dụng làm khuôn để khuếch đại vùng gen mã hóa phần kháng nguyên GP42 bọc lộ trên bề mặt virus (được viết tắt là gen gp41) để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Các hóa chất dùng cho nghiên cứu được cung cấp từ các hãng Bio Rad, Invitrogen, New England Biolabs, Sigma (Mỹ), Fermentas, Merck (Đức), các enzyme hạn chế *Bam*HI và *Xho*I (New England Biolabs, Mỹ).

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa gp41

Vùng gen gp41 được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng plasmid mang gen gp41 do chúng tôi tách dòng trước đây làm khuôn. Cặp môi dùng trong nghiên cứu có trình tự như sau: GP41K1: 5'-TACGGATCCGGAGCAGCAGGAAGC-3', GP41K2: 5'-GATCTCGAGTTTATATACCATA CCAATTTG-3' Cặp môi này được gắn thêm trình tự nhận biết của enzyme giới hạn (chữ được gạch chân) *Bam*HI và *Xho*I. Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình: 94°C/3 phút, 30 chu kỳ (94°C/1 phút, 55°C/50 giây, 72°C/1 phút), tiếp theo là 1 chu kỳ ở 72°C/8 phút. Sản phẩm PCR (đoạn gen gp41) sau đó được gắn vào vector biểu hiện pET32a+ tại hai vị trí của enzyme giới hạn *Bam*HI và *Xho*I để tạo vector tái tổ hợp pET32⁺. Với việc thiết kế này, GP41 tái tổ hợp sẽ được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp (fusion) có gắn thêm 6 Histidin và Theoredoxin ở đầu N (6His-Trx-GP41).

Biểu hiện GP41 tái tổ hợp

Vector tái tổ hợp rpET-gp41 được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21 (DE3), cấy trải trên môi

trường LB có bổ sung kháng sinh ampicillin. Nhặt một khuẩn lạc riêng rẽ, nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin (100 µg/ml) qua đêm, sau đó cấy chuyển 1% sang môi trường mới, tiếp tục nuôi lắc ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6 - 1 thì cảm ứng bằng IPTG với nồng độ cuối cùng là 0,5 mM. Để tối ưu điều kiện biểu hiện GP41, chúng tôi tiến hành biểu hiện ở các nhiệt độ khác nhau (37°C, 30°C và 25°C) trong thời gian từ 2 - 4 h trên máy lắc tốc độ 200 vòng/phút sau cảm ứng với IPTG. Ly tâm thu tế bào và hòa tế bào lại trong đệm phá tế bào. Tế bào sau đó được phá bằng siêu âm trong 10 phút. Ly tâm tách riêng pha nổi, pha cận được hòa lại trong cùng thể tích đệm phá tế bào ban đầu. Protein tái tổ hợp ở cả pha nổi và pha cận được kiểm tra bằng điện di trên gel SDS-PAGE 12,5% để xác định trạng thái biểu hiện của protein tái tổ hợp.

Tinh sạch GP41 tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) dưới điều kiện không biến tính theo qui trình do hãng sản xuất cung cấp và kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide. Nồng độ protein tái tổ hợp sau khi tinh chế được xác định bằng phương pháp Bradford.

Phương pháp Western Blot

Protein GP41 tinh sạch được phân tách trên gel polyacrylamide 12,5%, sau đó chuyển sang màng PVDF. Phủ màng qua đêm ở 4°C bằng sữa tách bơ (skim milk) 5% pha trong đệm PBS. Rửa màng 3 lần bằng TTBS và TBS, mỗi lần 5 phút. Ủ màng với huyết thanh bệnh nhân dương tính với HIV được pha loãng 500 lần trong skim milk 1% trong điều kiện lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 h. Rửa màng 3 lần bằng TTBS và TBS, mỗi lần 5 phút. Tiếp theo màng được ủ với kháng thể cộng hợp kháng IgG người gắn HRP (horse-radish peroxidase) pha loãng 10.000 lần trong skim milk 1% trong điều kiện lắc ở nhiệt độ phòng trong 1 h. Rửa màng 3 lần bằng TTBS và TBS, mỗi lần 5 phút. Cuối cùng màng được hiện màu trong dung dịch chất hiện màu (5 ml methanol + 15 mg 4-chloronaphthol pha trong 25 ml TBS + 15 µl H₂O₂ 30%) trong thời gian 10 phút và đọc kết quả.

Phương pháp ELISA

GP41 tái tổ hợp được gắn bản trên phiến nhựa vi lượng 96 giếng ở các nồng độ khác nhau trong đệm bicarbonate, pH 9,5 trong vòng 16 h tại 4°C. Tấm nhựa sau đó được phủ với 2% casein pha trong dung dịch PBS có chứa 0,05% Tween ở 37°C trong 2 h sau

đó làm khô và bảo quản ở 4°C trong túi nilon hàn kín. Mẫu huyết thanh được pha loãng 100 lần sau đó nhỏ vào các giếng trên phiến nhựa vi lượng đã được chuẩn bị trên, ủ trong vòng 1 h ở 37°C. Rửa phiến nhựa 6 lần bằng dung dịch rửa bản. Đưa vào mỗi giếng 100 µL kháng thể cộng hợp kháng IgG người. Ủ tiếp ở 37°C trong 1 h. Rửa tấm nhựa 6 lần bằng dung dịch rửa bản. Đưa vào mỗi giếng 100 µL cơ chất TMB (tetramethyl benzidine). Dừng phản ứng bằng cách bổ sung 50 µL H₂SO₄ 1 N. Kết quả phản ứng được đọc trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa protein GP41

Sau khi khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu GP41K1 và GP41K2, sản phẩm PCR (gp41) được kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả cho thấy, đoạn gen mã hóa protein GP41 đã được nhân lên một cách đặc hiệu, chỉ tạo ra một băng DNA duy nhất, không có sản phẩm phụ với kích thước khoảng 500 bp đúng như theo tính toán lý thuyết. Đoạn gen này sau đó được thiết kế vào vector biểu hiện pET32a+ như trình bày ở phần trên. Trình tự đoạn gen mã hóa GP41 và khung đọc mở của gen trong vector pET32a+ được phân tích bằng cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI và *Xho*I và xác định trình tự. Chúng tôi đã chọn được 2 dòng plasmid tái tổ hợp mang gen gp41 được gắn đúng khung đọc trong vector biểu hiện. Để khẳng định một cách chính xác, đoạn gen gắn trong vector tái tổ hợp này được tiến hành xác định trình tự và dịch mã sang protein. Kết quả cho thấy trình tự gen mã hóa kháng nguyên GP41 sau khi gắn vào vector biểu hiện hoàn toàn trùng khớp với trình tự gen đã được chúng tôi công bố trên ngân hàng gen quốc tế trước đây với mã số FN600552 (Le *et al.*, 2009), và dịch mã ra protein hoàn toàn thông suốt không tạo mã kết thúc trong gen (kết quả không trình bày ở đây). Vector tái tổ hợp này được dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Tối ưu hóa điều kiện biểu hiện và xác định trạng thái GP41 tái tổ hợp

Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất và trạng thái biểu hiện của protein tái tổ hợp trong các hệ thống biểu hiện. Đối với hệ thống biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*, nhiệt độ nuôi cấy, nồng độ chất cảm ứng IPTG là 2 trong những yếu tố tác động nhiều nhất đến sự biểu hiện của protein tái tổ hợp. Vì vậy, trước khi biểu hiện lượng lớn, chúng tôi tiến hành thăm dò

tìm nhiệt độ biểu hiện và nồng độ IPTG thích hợp. IPTG được khảo sát ở dải nồng độ từ 0,05 đến 1 mM. Kết quả (Hình 1) cho thấy, sau khi cảm ứng bằng IPTG dòng tái tổ hợp đã tổng hợp một lượng lớn protein có kích thước khoảng 37 kDa, đúng với kích thước dự đoán của GP41 tái tổ hợp. Hàm lượng protein được tổng hợp không phụ thuộc nhiều vào nồng độ IPTG cảm ứng (Hình 1). Trong các nồng độ IPTG mà chúng tôi khảo sát, GP41 được biểu hiện tốt nhất khi chúng được cảm ứng với 0,5 mM IPTG.

Tiếp theo, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ và trạng thái biểu hiện của protein tái tổ hợp. Kết quả điện di kiểm tra protein tổng số trên gel polyacrylamide (Hình 1B) cho thấy, ở nhiệt độ 30°C, 90% protein tái tổ hợp được biểu hiện ở dạng hòa tan. Trong khi đó khi tăng nhiệt độ biểu hiện lên 37°C, kết quả hoàn toàn ngược lại, 90% protein tái tổ hợp biểu hiện ra ở dạng thể vùi (Hình 2). Như vậy nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến trạng thái biểu hiện của protein tái tổ hợp. Kết quả này có thể được giải thích như sau, ở nhiệt độ 37°C vi khuẩn sinh trưởng rất mạnh do đó protein được tổng hợp nhanh trong hệ thống tế bào vật chủ và không được gấp nếp (folding) để tạo thành protein có cấu trúc đúng với cấu trúc tự nhiên, dẫn đến các protein biểu hiện ra sẽ tập trung lại thành dạng thể vùi (inclusion body). Từ kết quả này, chúng tôi đã chọn điều kiện biểu hiện GP41 ở 30°C, nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0,5 mM.

Tinh chế GP41 tái tổ hợp

Như trình bày ở trên, GP41 tái tổ hợp có gắn với 6 histidine ở đầu N vì vậy có thể được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Nickel-Chelating Resin. Sau khi phá tế bào bằng siêu âm, protein tái tổ hợp ở pha hòa tan được đưa lên cột sắc ký ái lực ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen). Các protein bám không đặc hiệu được loại bỏ bằng cách rửa cột nhiều lần với đệm rửa có nồng độ imidazole tăng dần (20 - 100 mM). Qua khảo sát chúng tôi thấy, ở nồng độ imidazole trong đệm rửa là 80 mM, hầu hết các protein tạp nhiễm bị đẩy ra khỏi cột, trong khi đó GP41 vẫn bám đặc hiệu. Khi tăng lên 100 mM, thì ngoài protein tạp nhiễm một phần protein GP41 cũng bị đẩy ra khỏi cột, do đó chúng tôi lựa chọn nồng độ imidazole trong đệm rửa là 40 mM (kết quả không nêu ở đây). Sau cùng protein bám đặc hiệu (GP41) được đẩy ra khỏi cột bằng đệm đẩy (elution buffer) có chứa 400 mM Imidazole. Chúng tôi cũng đã khảo sát một số nồng độ imidazole trong thành phần đệm đẩy (200, 300 và 400 mM). Kết quả kiểm tra trên gel SDS-PAGE cho thấy, mặc dù khi tăng nồng độ

imidazole trong đệm rửa lên 100 mM một phần GP41 bị đẩy ra khỏi cột, tuy nhiên khi đẩy ra khỏi cột thì ở nồng độ 300 mM chúng tôi nhận thấy vẫn còn một phần GP41 bám trên cột, phải ở khoảng 10

15 phút sau khi bổ sung đệm đẩy lên cột và tăng thể tích đệm đẩy thì mới thu được toàn bộ GP41 tái tổ hợp. Điều này làm giảm nồng độ GP41 tái tổ hợp sau tinh chế và phải mất thêm bước cô đặc protein rất mất thời gian và có thể ảnh hưởng đến hoạt tính của protein tái tổ hợp. Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ imidazole trong đệm đẩy là 400 mM, nồng độ không quá cao để tích kiệm imidazole nhưng cũng đủ để đẩy toàn bộ GP41 tái tổ hợp ra khỏi cột (kết quả không nêu ở đây). Các phân đoạn protein sau khi tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide (Hình 3). Kết quả cho thấy GP41 tái tổ hợp sau tinh sạch có độ tinh sạch cao thể hiện bởi một băng protein đậm nét trên gel, không có các băng protein tạp nhiễm, có thể phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kiểm tra khả năng phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân bằng Western blot

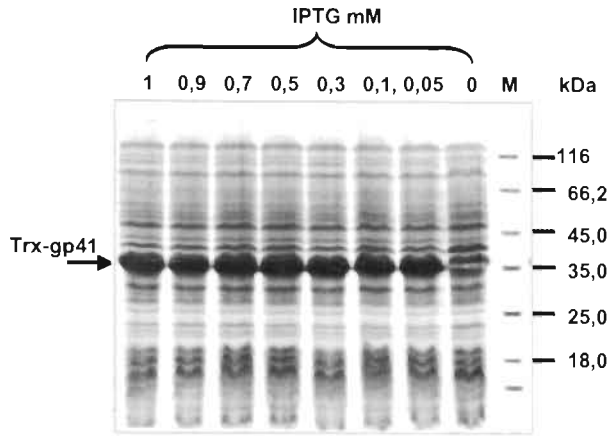
GP41 tinh sạch được kiểm tra tính kháng nguyên thông qua phản ứng giữa kháng nguyên với kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm HIV theo mô tả trong công trình trước đây (Kenealy, 1987). Theo kết quả nghiên cứu dịch tễ học phân tử của các chủng HIV lưu hành tại Việt Nam của chúng tôi (Bạch Thị Như Quỳnh *et al.*, 2009) và của các tác giả khác (Lan *et al.*, 2003, Liao *et al.*, 2009), phân type CRF01_AE là phân type chủ yếu đang lưu hành tại Việt Nam chiếm trên 97%, phân type B chiếm khoảng 2 - 3%. Trong khi đó, tại châu Âu, Bắc Mỹ và hầu hết các nước trên thế giới thì phân type CRF01_AE lại là phân type chiếm một tỷ lệ rất nhỏ (2-3%). Do đó chúng tôi đặt ra giả thuyết liệu các kit chẩn đoán có nguồn gốc từ nước ngoài có đặc hiệu cho các phân type virus HIV đang lưu hành ở Việt Nam hay không? Để trả lời cho câu hỏi này bước đầu chúng tôi thăm dò khả năng phản ứng giữa kháng nguyên GP41 tái tổ hợp vừa được tạo ra (phân lập từ phân type CRF01_AE) với kháng thể kháng lại chúng có nguồn gốc từ 2 phân type khác nhau là HIV phân type CRF01_AE và phân type B. Kết quả Western blot cho thấy, GP41 tái tổ hợp phản ứng mạnh, đặc hiệu với kháng thể kháng HIV phân type CRF01_AE, thể hiện bởi băng phản ứng đậm trên màng phản ứng (Hình 4A). Kết quả này cũng cho thấy GP41 tái tổ hợp vẫn phản ứng với kháng thể kháng HIV phân type B (Hình 4B), tuy nhiên mức độ phản ứng yếu hơn so với phản ứng của GP41 tái

tổ hợp với kháng thể có nguồn gốc từ phân type CRF01_AE. GP41 tái tổ hợp hoàn toàn không phản ứng với các mẫu huyết thanh lấy từ các bệnh nhân âm tính với HIV (Hình 4C). Kết quả này cho thấy GP41 tái tổ hợp biểu hiện ở vi khuẩn vẫn giữ được đặc tính kháng nguyên của chúng và phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng HIV trong các mẫu huyết thanh bệnh nhân HIV. Kết quả này cũng tương tự đối với kháng nguyên p24 (Bạch Thị Như Quỳnh *et al.*, 2010), đồng thời cho thấy việc sử dụng các kit chẩn đoán HIV phù hợp và đặc hiệu cho mỗi phân type là thực sự quan trọng và cần thiết.

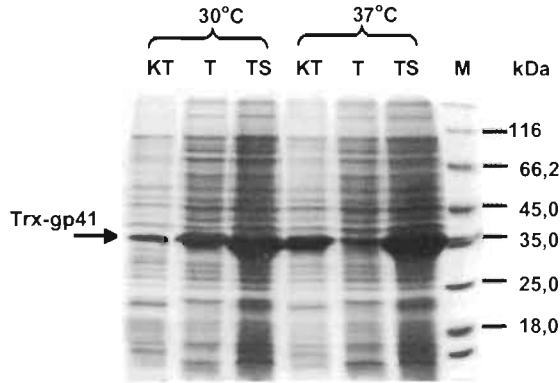
Kiểm tra khả năng phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân bằng ELISA

Như đã trình bày ở trên, trong chẩn đoán HIV Western blot là phản ứng để khẳng định kết quả của các xét nghiệm khác, dựa vào kết quả của xét nghiệm này người ta mới có thể kết luận là bệnh nhân đó âm tính hay dương tính với HIV. Tuy nhiên kỹ thuật này đòi hỏi thời gian lâu, và không thể cùng lúc sàng lọc với số lượng lớn các mẫu cần xét nghiệm. Vì vậy song song với việc kiểm tra phản ứng giữa GP41 tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV bằng Western blot, chúng tôi tiến hành thử nghiệm với kỹ thuật ELISA. Kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA được trình bày ở bảng 1. Tổng số 60 mẫu máu đã được xét nghiệm chẩn đoán tại các trung tâm và bệnh viện trong nước bằng các kit chẩn đoán HIV nhập từ nước ngoài, 13 mẫu được xác định là âm tính và 47 mẫu được xác định là dương tính với HIV. Sử dụng bộ kit ELISA do chúng tôi sản xuất (kit ELISA IBT) để xét nghiệm các mẫu trên chúng tôi thu được kết quả là 46 dương tính và 14 mẫu âm tính. Trong đó có 1 mẫu (VT6) theo chẩn đoán của các bộ kit nước ngoài là mẫu âm tính, nhưng với bộ kit ELISA IBT thì lại cho kết quả dương tính. Mẫu huyết thanh 10166i0 và BM64, kết quả xét nghiệm bằng kit của nước ngoài là dương tính nhưng kết quả xét nghiệm bằng kit ELISA IBT lại cho kết quả âm tính. Tất cả các mẫu huyết thanh còn lại cho kết quả hoàn toàn trùng khớp với kết quả xét nghiệm sử dụng bộ kit của nước ngoài. Cần có thêm các thí nghiệm và phân tích để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của bộ kit ELISA do chúng tôi tạo ra, tuy nhiên các kết quả trên hứa hẹn bộ kit chẩn đoán HIV tạo ra từ nguồn nguyên liệu là các kháng nguyên có nguồn gốc từ các phân type HIV lưu hành tại Việt Nam có thể thay thế các kit nhập ngoại cùng loại.

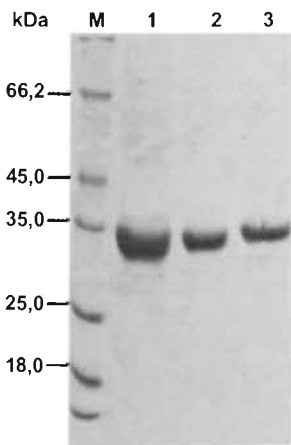
Để kiểm tra tính ổn định của kit ELISA IBT, chúng tôi đã theo dõi trong thời gian 3 tháng và tiến hành làm xét nghiệm lại với 60 mẫu huyết thanh trên. Kết quả xét nghiệm hoàn toàn không có sự thay đổi so với ban đầu.



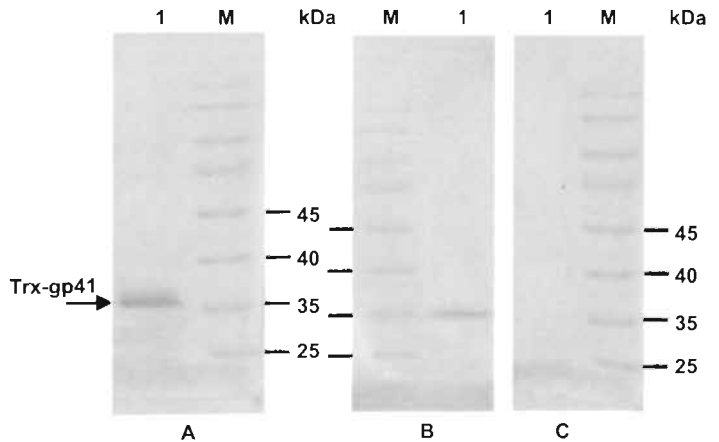
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ IPTG (mM) lên khả năng sinh tổng hợp Trx-gp41.



Hình 2. Xác định trạng thái tồn tại của protein tái tổ hợp chùng mang gen gp41. M: thang protein chuẩn, KT: protein pha không tan, T: protein pha tan, TS: protein tổng số.



Hình 3. Sản phẩm tinh sạch Trx-gp41 tái tổ hợp bằng cột sắc ký ái lực. M: thang protein chuẩn; ĐC1, 2, 3: sản phẩm tinh sạch ở các phân đoạn khác nhau.



Hình 4. Kiểm tra phản ứng giữa Trx-gp41 tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV từ các mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng Western blot. A: huyết thanh dương tính với HIV-1/ CRF01_AE, B: huyết thanh dương tính với HIV-1/B, C: huyết thanh âm tính với HIV-1, M: Thang protein chuẩn (Fermentas), 1: Protein tái tổ hợp GP41.

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm HIV bằng kỹ thuật ELISA sử dụng kháng nguyên GP41 tái tổ hợp.

STT	Mẫu	Kit ELISA IBT	Kit ELISA Nhập ngoại	STT	Mẫu	Kit ELISA IBT	Kit ELISA Nhập ngoại
1	VT1	+	+	31	MS507/81	+	+
2	VT2	+	+	32	MS107/12	+	+
3	10117	+	+	33	MS42	+	+
4	102203	+	+	34	MS308/152	+	+
5	102204	+	+	35	MS06		
6	VT20			36	MS1208/175	+	+
7	101263	+	+	37	MS95		
8	102202	+	+	38	MS907/125	+	+
9	101942	+	+	39	MS107/13	+	+
10	101620		+	40	MS407/50	+	+
11	102040	+	+	41	MS80		
12	VT3	+	+	42	MS708/164	+	+
13	VT4			43	MS67	+	+
14	VT5			44	MS50		
15	VT6	+		45	MS61		
16	1884	+	+	46	MS107/21	+	+
17	100625	+	+	47	MS209/181	+	+
18	100057	+	+	48	BM1	+	+
19	101660		+	49	BM2	+	+
20	VT13	+		50	BM64		+
21	101847	+	+	51	BM79	+	+
22	VT8	+	+	52	BM110		
23	VT9	+	+	53	BM313		
24	VT10	+	+	54	BM76	+	+
25	VT11	+	+	55	BM86	+	+
26	VT12	+	+	56	BM704	+	+
27	1161	+	+	57	BM345		
28	1183	+	+	58	BM96	+	+
29	1608	+	+	59	BM116	+	+
30	1531	+	+	60	BM450	+	+

KẾT LUẬN

Gen mã hóa protein GP41 từ phân type CRF01_AE của virus HIV đã được biểu hiện và tinh sạch thành công. GP41 tinh sạch vẫn giữ được tính kháng nguyên và phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng HIV tự nhiên trong huyết thanh bệnh nhân. Thử nghiệm ban đầu cho thấy kit ELISA do chúng tôi phát triển trên cơ sở kháng nguyên GP41 tái tổ hợp có độ đặc hiệu cao. Hiện chúng tôi đang tiếp tục theo dõi và

tối ưu hóa các điều kiện phản ứng để hoàn thiện và đưa bộ kit chẩn đoán HIV vào sử dụng.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bằng kinh phí đề tài: “Nghiên cứu tạo bộ sinh phẩm chẩn đoán HIV có độ nhạy và độ đặc hiệu cao” do Bộ Khoa học và Công nghệ chủ trì. Công trình được thực hiện tại phòng Vi sinh vật phân tử và Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bạch Thị Như Quỳnh, Lê Phương Hằng, Nguyễn Thị Hoa, Hà Thị Thu, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Phương, Trần Minh Đức, Nguyễn Thanh Tùng, Đồng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng (2011) Biểu hiện gen mã hóa protein GP120 phân typ CRF01_AE và ứng dụng protein tái tổ hợp phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* (đã nhận đăng).

Bạch Thị Như Quỳnh, Nguyễn Thị Hoa, Lê Phương Hằng, Nguyễn Thị Phương, Trần Minh Đức, Đồng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng (2010) Tách dòng, biểu hiện gen mã hóa protein p24 của HIV-1 phân type A/E và ứng dụng protein tái tổ hợp phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân. *Kỷ yếu hội nghị Sinh học phân tử và hóa sinh y học toàn quốc lần thứ 2*: 155-159.

Bạch Thị Như Quỳnh, Lê Phương Hằng, Hoàng Thị Thanh Huyền, Lê Huy Tuấn, Đinh Duy Kháng (2009) Xác định phân typ HIV lưu hành tại một số địa phương ở Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam* 360 (2): 41-48.

Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, Weissenhorn W (2010) Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog* 6(5): 120-125.

Đồng Văn Quyền, Hoàng Anh, Bạch Thị Như Quỳnh, Phạm Minh Tuấn, Nguyễn Thanh Tùng, Lê Thị Tâm, Đinh Duy Kháng (2008) Tách dòng và biểu hiện gen p24 từ

chủng HIV lưu hành ở Việt Nam và nghiên cứu phản ứng của protein tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(1): 27-34.

Dharma DS, Dean H, Morry F, Peter H, Marilyn H (1999) *International training programme in diagnostic virology* The Crawford, Australia.

Gurtler L (1996) Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet* 348: 176-179.

Kenealy W, Reed D, Cybulski R, Tribe D, Taylor P, Stevens C, Matthews T, Petteway S (1987) Analysis of human serum antibodies to human immunodeficiency virus (HIV) using recombinant ENV and GAG antigens. *AIDS Res Human Retrovir* (3): 95-105.

Lan NT, Recordon-Pinson P, Hung PV, Uyen NT, Lien TT, Tien HT, Garrigue I, Schrive MH, Pellegrin I, Lafon ME, Aboulker JP, Barré-Sinoussi F, Fleury HJ (2003) HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 Study. Large predominance of CRF01_AE and presence of major resistance mutations to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retrovir* 19(10): 925-928.

Liao H, Tee KK, Hase S, Uenishi R, Li XJ, Kusagawa S, Thang PH, Hien NT, Pybus OG, Takebe Y (2009) Phylodynamic analysis of the dissemination of HIV-1 CRF01_AE in Vietnam. *Virology* 391(1):51-6.

EXPRESSION OF HIV-1 SUBTYPE CRF01_AE GP41 PROTEIN IN *E. COLI* AND ITS APPLICATION FOR DETECTION OF ANTI-HIV ANTIBODY IN PATIENT'S SERA BY WESTERN BLOT AND ELISA

Bach Thi Nhu Quynh¹, Vu Thi Hien¹, Ha Thi Thu¹, Nguyen Thi Hoa¹, Le Phuong Hang¹, Nguyen Thanh Tung¹, Nguyen Xuan Bac², Dong Van Quyen¹, Le Van Phung³, Dinh Duy Khang^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²Hanoi University of Pharmacy

³National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

SUMMARY

In this paper we report the results on expression and purification of envelop GP41 protein of HIV-1 subtype CRF01_AE and its application for detection of anti-HIV antibody in patient's sera by Western blot and ELISA. A gene region coding for extracellular domain of GP41 protein was amplified by PCR, inserted into pET32a+ expression vector. The recombinant plasmid carrying gp41 gene were selected by restriction enzyme analysis and confirmed by DNA sequencing. As designed, the recombinant GP41 protein was fused to a 6 histidines and Theoredoxin (Trx) at its N-terminal and has a molecular mass of approximately 37 kDa (6His-Trx-GP41). Recombinant GP41 was expressed as soluble form at 30°C and 0.5 mM IPTG with the expression yield of 20 mg/l culture medium. The recombinant protein was purified by affinity chromatography using ProBond Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) under native condition, and was then used to detect anti-HIV antibody in patient's sera by Western blot and ELISA. The Western blot results showed that recombinant GP41

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37563386; E-mail: khang_vspt@yahoo.com

reacted specifically with the antibody in HIV patient's sera, especially it reacted more strongly with antibodies against HIV subtype CRF01_AE than that of HIV-1 subtype B. This data suggests the importance of development of HIV diagnostic kits base on antigens derived from subtypes circulating in the country.

Keywords: *HIV-1 subtype CRF01_AE, gp41, diagnostic kit, Western blot, ELISA*