

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM CHUỖI POLYPEPTIDE NA(N1) CỦA MỘT SỐ CHỦNG VIRUS CÚM A/H5N1 GÂY BỆNH Ở GIA CẦM THU THẬP CÁC NĂM 2004 - 2009 TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Bích Nga¹, Lương Thị Hồng Vân², Lê Thanh Hòa¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Protein kháng nguyên neuraminidase (NA) của các chủng virus cúm A/H5N1 có đặc tính đột biến cao ở phần đầu chuỗi polypeptide (đầu -NH₂), đó cũng là một trong những đặc điểm quan trọng của virus cúm gia cầm với sự thay đổi kháng nguyên theo thời gian. Toàn bộ chuỗi nucleotide (1350 bp) và amino acid (449 aa) của gen NA (N1) ở 11 chủng cúm A/H5N1 phân lập phân lập tại các vùng/miền trong cả nước các năm 2004 - 2009 được thu nhận và phân tích so sánh. Phân tích đặc điểm amino acid của 11 chủng này với các chủng đại diện một số địa phương Việt Nam và thế giới, cho thấy, độ dài gen N1 từ năm 2003 đến nay là 1350 bp, đã có sự co ngắn lại do bị xóa đi 60 nucleotide tương ứng 20 amino acid trong gen so với các chủng từ năm 2003 trở về trước. Thành phần amino acid cũng đã có đột biến xảy ra ở một số chủng năm 2008 và 2009. Mười hai vị trí sai khác amino acid giữa các chủng so sánh đã phân định 24 chủng thành 3 nhóm chính: nhóm 2008 - 2009; nhóm 2006 - 2007 và nhóm 2004 - 2005. Như vậy, có thể gen N1 đã có hiện tượng đột biến quan trọng để tạo nên sản phẩm gen N1 có chức năng đặc hiệu cao nhất thích hợp với tính gây bệnh trên người và động vật (HPAI, highly pathogenic avian influenza) ngày càng gia tăng ở virus cúm A/H5N1.

Từ khóa: A/H5N1, đột biến, Glycosyl hóa, Neuraminidase (NA), phả hệ, virus cúm

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cúm gà (Avian Influenza - AI) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính của gia cầm do virus cúm A thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra. Protein bề mặt có vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhập tế bào của virus cúm là hemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA), trong đó neuraminidase (NA), cùng với HA, mang tính kháng nguyên và là enzyme chịu trách nhiệm phân giải thụ thể tế bào bằng cách cắt liên kết glycosid của phân tử sialic acid (N-acetylneuramic acid) giải phóng virus trong quá trình lây nhiễm (Castrucci, Kawaoka, 1993; Beigent, Cauley, 2001). Các nghiên cứu phân tử gen NA(N1) của virus cúm A/H5N1 cho thấy mức độ đột biến chủ yếu xảy ra ở phần đầu 5' liên quan đến quá trình thích ứng và gây bệnh trên nhiều đối tượng vật chủ (Matrosovich *et al.*, 1999; Takao *et al.*, 2002; Keawcharoen *et al.*, 2005). Quá trình tiến hóa biến đổi thành phần gen NA(N1) của cúm A/H5N1 trải qua nhiều đợt thêm vào rồi bớt đi nucleotide (gọi là *trượt-xóa* gen) để tạo nên NA hiện nay, đã được nghiên cứu kể cả ở một số chủng gây bệnh tại Việt Nam (Chen *et al.*, 2007; Lê Thanh Hòa *et al.*, 2008a). Biến đổi phân tử ở gen HA và NA có liên quan đến chức năng sinh học mà chúng chịu trách

nhiệm, có thể cũng liên quan tới độc lực của virus (Castrucci, Kawaoka, 1993; Keawcharoen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả phân tích về thành phần nucleotide và amino acid của phân đoạn NA (N1) ở một số chủng cúm A/H5N1 do chúng tôi phân lập các năm 2004 - 2009, trên cơ sở so sánh với một số chủng virus cúm A/H5N1 trên gia cầm tại Việt Nam và thế giới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các mẫu bệnh phẩm chứa virus cường độc cúm A/H5N1 thu nhận tại một số địa phương từ năm 2004 đến 2009. Mẫu bệnh phẩm là huyền dịch (chất thấm dịch, exudate) có chứa virus đã được vô hoạt đảm bảo an toàn sinh học.

Các chủng virus cúm A/H5N1 cung cấp chuỗi gen N1 sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê ở bảng 1. Bảng 1 bao gồm các chủng được phân thành các nhóm theo thời gian: i) Nhóm các chủng phân lập các năm 2008 - 2009 bao gồm 9 chủng, trong đó có 6 chủng do chúng tôi nghiên cứu (ký hiệu *; đánh số: 1

- 6) và 3 chủng của các tác giả khác trong Ngân hàng gen (7 - 9); ii) Nhóm các chủng phân lập các năm 2006 - 2007: gồm 8 chủng (trong đó 2 chủng của chúng tôi (đánh số 10, 11) và 6 chủng có trong Ngân hàng gen (12, 13, 14, 15, 16, 17) và iii) Nhóm các chủng phân lập các năm 2004 - 2005: gồm 9 chủng, trong đó có 5 chủng của chúng tôi (18, 19, 20, 23, 24) và 4 chủng có trong Ngân hàng gen.

Tách chiết RNA tổng số, thực hiện RT-PCR và thu nhận chuỗi gen N1

RNA tổng số trong đó có hệ gen của virus được tách chiết trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm, sử dụng bộ hóa chất QIAamp viral RNA kit (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm RT-PCR (QIAGEN) được sử dụng để nhân đoạn gen N1. Phản ứng RT-PCR được sử dụng với cặp mồi:

NIF: 5'- ATGAATCCAAATCAGAAGATAATAAC -3';

NIR: 5'- CTACTTGTCAATGGTGAATGGC -3'

Thực hiện phản ứng RT-PCR, thu nhận toàn bộ chuỗi gen N1 với chu trình nhiệt: 42°C trong 60 phút; 95°C trong 10 phút; 35 chu kỳ (94°C trong 1 phút; 48°C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút); 72°C trong 10 phút. Điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR trên thạch agarose 1%. Sản phẩm RT-PCR của toàn bộ gen N1 có độ dài khoảng 1,4 kb được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm AccuPrep™ PCR Purification Kit của hãng Bioneer (Hàn Quốc) và được gắn vào vector tách dòng pCR2.1 (Invitrogen), chuyển nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5- α để nhân dòng. Tách dòng, chọn lọc và tách DNA tái tổ hợp bằng bộ AccuPrep Plasmid Extraction Kit (Bioneer, Hàn Quốc), cắt DNA plasmid kiểm tra sản phẩm bằng enzym giới hạn *EcoRI*. Sản phẩm DNA plasmid đúng tiêu chuẩn được giải trình tự trên máy tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzers (Mỹ) có tại Viện Công nghệ sinh học hoặc gửi đi giải trình tự ở nước ngoài.

Xử lý chuỗi gen và phân tích số liệu

Toàn bộ trình tự các chuỗi gen N1 của các chủng đã được thu nhận và xử lý bằng các phần mềm của máy tính Macintosh (biên tập bằng chương trình SeqEd1.03; so sánh bằng AssemblyLIGN1.9c và xác định thành phần gen bằng hệ chương trình MacVector8.2). Kết quả các chuỗi trong nghiên cứu được so sánh với các chuỗi gen N1 có trong Ngân hàng gen (GenBank) bằng chương trình GENEDOC2.5 (Nicholas, Nicholas, 1997). Thành phần nucleotide và amino acid được thu nhận sử

dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn, bacterial code). Xây dựng cây phả hệ được thực hiện bằng chương trình MEGA4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Giải trình tự và lưu giữ chuỗi gen N1 các chủng virus cúm gia cầm A/H5N1 các năm 2004 - 2009

Sau khi thực hiện phản ứng RT-PCR từ các mẫu đã được tách RNA tổng số, tách dòng, giải trình tự, phân tích số liệu, chúng tôi thu nhận được toàn bộ chuỗi gen N1 có độ dài là 1350 bp mã hóa cho 449 amino acid của 11 chủng thu nhận qua các năm 2004

2009 (Bảng 1). Toàn bộ đoạn DNA của gen N1 (1350 bp) của các chủng nghiên cứu đã được lưu giữ trong plasmid, với mục đích ngoài việc sử dụng giải trình tự, còn phục vụ thu thập quỹ gen cúm A/H5N1 tại Việt Nam. Một số chuỗi đã được sử dụng truy cập Ngân hàng gen để thu thập các chuỗi gen N1 của một số chủng gây bệnh ở gia cầm theo các năm đã được đăng ký để phân tích đặc tính sinh học phân tử (Bảng 1).

Kết quả so sánh đối chiếu thành phần amino acid của chuỗi gen N1

Kết quả so sánh đối chiếu chuỗi gen N1 của 24 chủng (trong đó 13 chủng thực hiện ở nghiên cứu này) được trình bày ở hình 1. Kết quả cho thấy, ngoài những sai khác có tính đơn lẻ, đã có sự sai khác và khác biệt rất rõ ràng, chủ yếu tập trung ở 80 amino acid đầu tận cùng N của protein N1 (hình 1, phần đóng khung ngang). Các chủng phân lập năm 2006 - 2007, trong đó có một số chủng xác định thuộc phân dòng Phúc Kiến có thành phần gen N1 ở phần đầu 80 amino acid này khác biệt so với các chủng phân dòng Quảng Đông (phân lập những năm 2004 - 2005 và 2008 - 2009). Các vị trí sai khác của 24 chủng gen N1 được liệt kê ở bảng 2.

So sánh các chủng của năm 2008 - 2009 với các năm 2004 - 2007 cho thấy các sai khác tập trung ở 80 amino acid đầu N của polypeptide N1, cụ thể như sau: P55L(Pro $\leftrightarrow$ L); A63V(Ala $\leftrightarrow$ Val); 2 chủng DkNA72(07) và DkNA114(07): A63I (Ala $\leftrightarrow$ Ile) đây cũng là 2 chủng đã được chúng tôi xác định thuộc phân dòng Phúc Kiến (Fujian sublineage, clade 2.3.4) xuất hiện tại Việt Nam năm 2007 (Lê Thanh Hòa *et al.*, 2008b). Amino acid tại vị trí 64 là K(Lys), vị trí 75 là N(Asp) ở tất cả các chủng, trong khi đó ở một số chủng: DkNA72(07); DkNA114(07); CkVN42(07); DkHP208(06) và

Md1455(06) là T(Thr); vị trí 65 các chủng là L(Leu), trừ chủng Dk0970(09) là F(Phe); DkDT9(07) và MdVN29(07) là I(Ile). Đặc biệt khi xem xét 80 amino acid đầu tiên của nhóm II (2006-2007) so với các chủng 2004, 2005, 2008, 2009, đa số các chủng nhóm II đã có sự thay đổi ở các vị trí T17I(Thr↔Ile); V26I(Val↔Ile); N39Q(Asp↔Glu); N75R(Asp↔Arg); V79I(Val↔Ile); Y80H(Tyr↔His)

Giữa nhóm I và nhóm II, tại vị trí K312T(Lys↔Thr), trừ 2 chủng CkDT382(09), CkKG88(08) là R(Arg); vị trí 320 có 22 chủng đều là Ser(S) trừ 4 chủng Dk0970(09) và CkVN42(07), DkHP(06) và Md1455(06) là P(Pro) và

DkNA72(07), DkNA114(07) là H(His); vị trí G414S(Gly↔Ser) và DkCM1(06) là G(Gly); vị trí S429N(Ser↔Asp); vị trí G430S(Gly↔Ser); vị trí 434 đa số các chủng là G(Gly) còn một số chủng nhóm II chủng là S(Ser).

Riêng đối với chủng Dk0970(09) là một chủng mới phân lập năm 2009 khi so sánh với các chủng phân lập trong cùng nhóm cũng có sự sai khác tại một số vị trí amino acid: F65L (Phe↔Leu); P71L (Pro↔Leu); S202N (Ser↔Asp); Y217S (Tyr↔Ser).

Trong toàn bộ các chuỗi gen N1, glycosyl hóa chỉ xảy ra ở hai vị trí amino acid 68-70 (NSS) (I) và vị trí 126-128 (NGT) (II) (Hình 1).

Bảng 1. Danh sách các chủng cúm A/H5N1 thu thập qua các năm 2004 - 2009 đã giải trình tự và các chủng thế giới cung cấp chuỗi gen N1 sử dụng để so sánh thành phần amino acid.

TT	Ký hiệu chủng	Danh pháp quốc tế	Vật chủ	Địa danh phân lập	Năm phân lập	Số đăng ký trong Ngân hàng gen
1	Dk0970*	A/DK/VN/0970/2009(H5N1)	Vịt	Sóc Trăng	2009	Đang đăng ký
2	CkDT382*	A/Ck/VN/DT382/2008(H5N1)	Gà	Đồng Tháp	2008	Đang đăng ký
3	CkDT381*	A/Ck/VN/DT381/2008(H5N1)	Gà	Đồng Tháp	2008	Đang đăng ký
4	CkTV98*	A/Ck/VN/TV98/2008(H5N1)	Gà	Trà Vinh	2008	Đang đăng ký
5	CkKG88*	A/Ck/VN/KG88/2008(H5N1)	Gà	Kiên Giang	2008	Đang đăng ký
6	DkLA11A	A/Dk/VN/11A-LA/2008(H5N1)	Vịt	Long An	2008	FJ812010
7	DkST41	A/Dk/VN/ST-41/2008(H5N1)	Vịt	Sóc Trăng	2008	FJ812006
8	DkTV7B	A/Dk/VN/7B-TV/2008(H5N1)	Vịt	Trà Vinh	2008	FJ812012
9	DkNA72*	A/Dk/VN/NA72/2007(H5N1)	Vịt	Hưng Nguyên - Nghệ An	2007	Đang đăng ký
10	DkNA114*	A/Dk/VN/NA114/2007(H5N1)	Vịt	Quỳnh Lưu - Nghệ An	2007	Đang đăng ký
11	CkVN42	A/Ck/VN/NCVD-42/2007(H5N1)	Gà	Việt Nam	2007	CY030517
12	DkDT9	A/Dk/VN/DT-9/2007(H5N1)	Vịt	Đồng Tháp	2007	FJ811999
13	MdVN29	A/Md/VN/NCVD-29/2007(H5N1)	Ngan	Việt Nam	2007	CY030440
14	DkCM1	A/Dk/VN/CM-1/2006(H5N1)	Vịt	Việt Nam	2006	FJ811997
15	DkHP208	A/Dk/VN/HP208/2006(H5N1)	Vịt	Hải Phòng	2006	GU052504
16	Md1455	A/Md/VN/1455/2006(H5N1)	Ngan	Việt Nam	2006	CY029537
17	DkAG*	A/Dk/VN/AG/2005(H5N1)	Vịt	An Giang	2005	EF057804
18	CkCaM*	A/Ck/VN/ CaM/2005(H5N1)	Gà	Cà Mau	2005	Đang đăng ký
19	CkVN11	A/Ck/VN/NCVD11/2005(H5N1)	Gà	Việt Nam	2005	CY036721
20	Md02	A/Md/VN/NCVD02/2005(H5N1)	Ngan	Việt Nam	2005	CY031629
21	CkHD1*	A/Ck/VN/HD1/2004(H5N1)	Gà	Hoài Đức - Hà Nội	2004	EF057807
22	MdGL*	A/Md/VN/GL/2004(H5N1)	Ngan	Gia Lâm - Hà Nội	2004	EF057805
23	CkVN830	A/Ck/VN/830/2004(H5N1)	Gà	Việt Nam	2004	CY033171
24	CkVN925	A/Ck/VN/925/2004(H5N1)	Gà	Việt Nam	2004	CY036705

Ghi chú: *Các chủng do chúng tôi phân lập.

	* 20	* 40	* 60	* 80	*
Dk0970(09)	MNPNQKIITIGSICMTVGIVSLMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQBQAEPISNTNPTFEKAVASAPLPAGNSFPCCPINGWAVYSKDNSIRIGS				
CkDT381(08)	.	E.	L.	L.	S.
CkDT382(08)	.	.	L.	L.	.
CkEG88(08)	.	E.	L.	L.	S.
CkTV98(08)	.	N.	G.R.	L.	.
DkLa11A(08)	.	.	L.	L.	.
DkST41(08)	I.	.	L.	L.	.
DkTV7B(08)	.	.	L.	L.	.
DkNA72(07)	: D.	I.	I.	Q.	N.V. I.
DkNa114(07)	:	I.	I.	Q.	N.V. I.
CkVN42(07)	:	I.	I.	Q.	LN.V.
DkDT9(07)F	.	A.	T.	T.	D.
MdVN29(07)	.	A.	.	.	.
DkCM1(06)F	:	.	.	.	.
DkBP208(06)	:	I.	I.	Q.	R.
Md1455(06)	:	I.	I.	Q.	R.
DkAG(05)	:	.	.	.	.
CkCaM(05)	.	.	.	.	.
CkVN11(05)	.	.	.	.	A.
Md02(05)CY	.	.	.	.	.
MdGL(04)	.	I.	.	.	.
CkHD1(04)	.P.	.	I.	.	.
CkVN830(04)	:	N.	.	.	.
CkVN925(04)	:	.	.	.	.

	100	120	140	160	180
Dk0970 (09) :	KGDVFVIREFFISCSHELECRFTFLTGALLNDKHSNGTIVKDRSPERTLMSCFVGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGTFWLTIGISGPDN				180
CkDT381 (08) :	K.....				180
CkDT382 (08) :	K.....				180
CkKG88 (08) :	K.....				180
CkTV98 (08) :					180
DkLA11A (08) :					180
DkST41 (08) :					180
DkTV7B (08) :					180
DkNA72 (07) :					180
DkNA114 (07) :					180
CkVN42 (07) :					180
DkDT9 (07) F :					180
MdVN29 (07) :					180
DkCM1 (06) F :					180
DkHP208 (06) :					180
Md1455 (06) :					180
DkAG (05) :					180
CkCaM (05) :					180
CkVN11 (05) :	S.....				180
Md02 (05) CY :					180
MdGL (04) :	I.....				180
CkBD1 (04) :					180
CkVN830 (04) :					180
CkVN925 (04) :					180

	200	*	220	*	240	260	*										
Dk0970 (09)	GAVAVLK	YNGIITD	TIKSWRS	SILRTOE	SECAVNC	VCFVTM	DGFSNGQ	AASHKI	PMEKGK	V	KSVELDA	PNYHYER	CSCYPDA	GE	I	C	270
CkDT381(08)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L.	S.	T.	.	.	270
CkDT382(08)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
CkKG88(08)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
CkTV98(08)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L.	S.	T.	.	270
DkLA11A(08) :	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G.	.	T.	.	270
DkST41(08) :	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	:	.	270
DkTV7B(08)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	:	.	270
DkNA72(07)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
DkNA114(07)	.	.	L	.	.	.	.	A.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
CkVN42(07)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
DkDT9(07) F	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
MdVN29(07)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
DkCM1(06) F	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
DkHP208(06)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
Md1455(06)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
DkAG(05)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
CkCaM(05)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
CkVN11(05)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	:	.	270
Md02(05) CY	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	:	.	270
MdGL(04)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
CkHD1(04)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	.	.	270
CkVN830(04)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T.	:	.	270
CkVN925(04)	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N.	T.	:	.	270

	280	*	300		320	*	340	*	360	
Dk0970 (09)	VCRDNWEGSNRRFWVSFNQNLKEYQIGYICSGVFGDNPFPNDGRGSSCGPVSR									360
CkDT381 (08)	S.....			R	S					360
CkDT382 (08)	S.....			R	S					360
CkKG88 (08)	S.....			R	S					360
CkTV98 (08)	S.....			R	S					360
DkLA11A (08)	S.....			R	S					360
DkST41 (08)	S.....			R	S					360
DkTV7B (08)	D.....			R	S					360
DkNA72 (07)	S.....			T	S	H			P	360
DkNA114 (07)	S.....			T	S	H			P	360
CkVN42 (07)	S.....			T	S				P	360
DkDT9 (07) F	S.....			T	S		L		P	360
MdVN29 (07) :	S.....			T	S					360
DkCM1 (06) F :	S.....			T	S					360
DkHP208 (06)	S.....			T	S		I			360
Md1455 (06)	S.....			T	S		I			360
DkAG (05)	S.....			T	S					360
CkCaM (05)	S.....			T	S			S		360
CkVN11 (05)	T.....			T	S					360
Md02 (05) CY	S.....			T	S					360
MdGL (04)	S.....			T	S					360
CkHD1 (04)	C.....			T	S			R		360
CkVN830 (04)	S.....			T	S					360
CkVN925 (04)	S.....			T	S					360

	*	380	*	400		420	*	440	
Dk0970 (09)	TETDSSFSVKQDIVAITDWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKKGT								449
CkDT381 (08)	L.....						S	SF	449
CkDT382 (08)	L.....						S	SF	449
CkKG88 (08)	L.....						S	SF	449
CkTV98 (08)	D.....						S	V.....SF	449
DkLA11A (08)	S.....						S	S.....	449
DkST41 (08)	S.....						S	S.....	449
DkTV7B (08)	S.....						S	S.....	449
DkNA72 (07)	S.....S.....V.....NS.....S.....						S	S.....	449
DkNA114 (07)	S.....S.....V.....NS.....S.....						S	S.....	449
CkVN42 (07)	S.....T.....NS.....I.....S.....						S	S.....	449
DkDT9 (07) F	R.....NS.....NS.....						S	S.....	449
MdVN29 (07)	R.....NS.....NS.....						S	S.....	449
DkCM1 (06) F	NS.....NS.....						S	S.....	449
DkHP208 (06)	N.....NS.....NS.....S.....						S	S.....	449
Md1455 (06)	N.....NS.....NS.....S.....						S	S.....	449
DkAG (05)	NS.....NS.....						S	S.....	449
CkCaM (05)	NS.....NS.....						S	S.....	449
CkVN11 (05)	NS.....NS.....						S	S.....	449
Md02 (05) CY	NS.....NS.....						S	S.....	449
MdGL (04)	NS.....NS.....						S	S.....	449
CkHD1 (04)	NS.....NS.....						S	S.....	449
CkVN830 (04)	NS.....NS.....						S	S.....	449
CkVN925 (04)	NS.....NS.....						S	S.....	449

Hình 1. So sánh đối chiếu trình tự amino acid gen N1 các chủng virus cúm gia cầm A/H5N1 thu thập qua các năm 2004 - 2009. Ghi chú: dấu (.) thể hiện sự giống nhau với amino acid của chủng Dk0970 (năm 2009). Sự sai khác thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng. Những sai khác lớn giữa các chủng được đóng khung dọc. Vị trí glycosyl hóa được đánh số La Mã (I và II) , chỉ dẫn bằng mũi tên và gạch bên dưới. Sai khác rõ ràng giữa các chủng chủ yếu tập trung ở 80 amino acid phần đầu N của protein N1 (phần đóng khung ngang).

Phân tích mối quan hệ của các chủng virus cúm A/H5N1 từ năm 2004 2009 với các chủng của Việt Nam đã đăng ký trong Ngân hàng gen

Bằng chương trình MEGA4.1 sử dụng thành phần amino acid của N1 chúng tôi xây dựng cây phả hệ của các chủng nghiên cứu với các chủng có trong Ngân hàng gen. Kết quả được thể hiện trên hình 2. Kết quả hình 2 cho thấy, trong số 11 chủng chúng tôi nghiên cứu hầu hết các chủng (9 chủng là CkDT381(08); CkKG88(08); CkTV98(08);

Dk0970(09); CkDT382(08); CkCaM(05); DkAG(05); CkHD1(04); MdGL(04)) thuộc clade 1, kể cả các chủng mới phân lập 2008-2009; không có chủng nào thuộc clade 2.3.2; nhưng có 2 chủng thuộc phân -đòng Phúc Kiển (DkNA72(07) và DkNA114(07)) nằm trong cùng nhóm với chủng CkVN42(07) thuộc clade 2.3.4 (Nguyễn *et al*, 2008) (Hình 2).

Điều này cho thấy các chủng thuộc clade 1 vẫn còn tồn tại kể từ khi xâm nhập vào Việt Nam và chủ

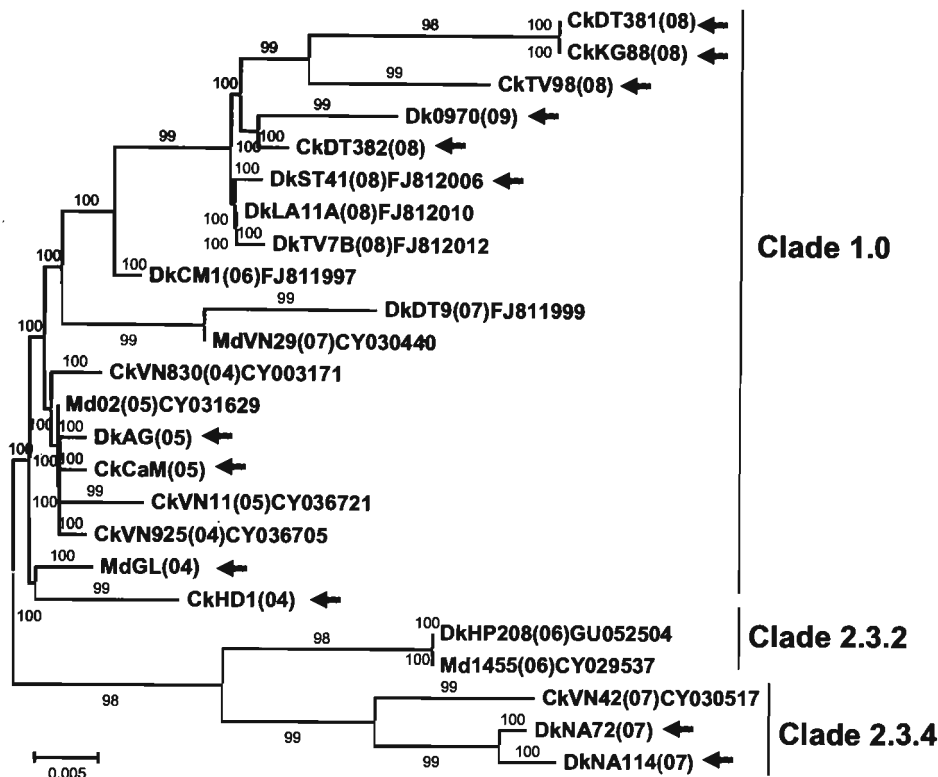
yếu gây bệnh cúm gia cầm ở vùng đồng bằng sông Cửu Long.

Như vậy các chủng cúm A/H5N1 từ khi xuất hiện tại Việt Nam đến nay không có đột biến lớn khác biệt, không giống như N1 đột biến “trượt-xóa” (slippage mutation) gen của các chủng ở giai đoạn 1996 - 1997 và 1997 - 2003 (Lê Thanh Hòa et al., 2008a), mà các đột biến chủ yếu là đột biến “điểm”

(point-mutation) vẫn tập trung vào một dòng gen N1 đã tiến hóa. Gen N1 do mang đặc tính đột biến qua các thời kỳ trong đó đặc tính nổi bật đó là đột biến trượt-xóa gen theo thời gian để tạo nên các dòng gen riêng biệt, các kết quả phân tích trong bài báo này cũng hoàn toàn phù hợp với nhận xét của các tác giả đã công bố trước đây (Chen et al., 2007; Lê Thanh Hòa et al., 2008a).

Bảng 2. Liệt kê các vị trí amino acid có sai khác lớn của polypeptide N1 giữa các chủng các năm 2004 - 2009.

Nhóm	Tên chủng	Năm phân lập	Các vị trí amino acid sai khác											
			55	63	64	75	79	80	312	320	414	429	430	434
NHÓM I (2008-2009)	1. Dk0970*	2009	P	A	K	N	V	T	K	P	G	S	G	G
	2. CkDT382*	2008	P	A	K	N	V	T	R	S	G	S	G	G
	3. CkDT388*	2008	P	A	K	N	V	T	K	S	G	S	G	G
	4. CkTV98*	2008	P	A	K	N	V	T	K	S	G	S	G	G
	5. CkKG88*	2008	P	A	K	N	V	T	R	S	G	S	G	G
	6. DkLA11A	2008	P	A	K	N	V	T	K	S	G	S	G	G
	7. DkST41	2008	P	A	K	N	V	T	K	S	G	S	G	G
	8. DkTV7B	2008	P	A	K	N	V	T	K	S	G	S	G	G
NHÓM II (2006-2007)	9. DkNA72*	2007	L	I	T	R	I	H	T	H	S	N	S	S
	10. DkNA114*	2007	L	I	T	R	I	H	T	H	S	N	S	S
	11. CkVN42	2007	L	V	T	R	I	H	T	P	S	N	S	S
	12. DkDT9	2007	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	13. MdVN29	2007	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	14. DkCM1	2006	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	15. DkHP208	2006	L	V	T	R	I	H	T	P	S	N	S	S
	16. Md1455	2006	L	V	T	R	I	H	T	P	S	N	S	S
NHÓM III (2004-2005)	17. DkAG*	2005	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	18. CkCaM*	2005	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	19. CkVN11	2005	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	20. Md02	2005	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	21. CkHD1*	2004	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	22. MdGL*	2004	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	23. CkVN830	2004	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G
	24. CkVN925	2004	L	V	K	N	V	T	T	S	S	N	S	G



Hình 2. Cây phả hệ dựa trên thành phần amino acid NA (N1) của các chủng phân lập trong các năm 2004 - 2009 với một số chủng trong Ngân hàng gen, bằng chương trình MEGA4.0, hệ số tin cậy 1000 bootstrap. Các chủng nghiên cứu của chúng tôi (mũi tên chỉ dẫn ở cuối chuỗi), tập trung ở clade 1.0 và clade 2.3.4.

KẾT LUẬN

Chuỗi gen N1 của 11 chủng cúm A/H5N1 phân lập qua các năm 2004-2009, cũng như các chủng khác có trong Ngân hàng gen, có độ dài 1350 bp, mã hóa cho 449 amino acid, phù hợp với tiến hóa N1 từ 2003 đến nay. Phần đầu tận cùng N của protein. NA(N1) có biến đổi lớn hơn rất nhiều so với các phần còn lại, có xu hướng phân chia thành từng nhóm theo thời gian (2004 - 2005; 2006 - 2007; 2008 - 2009). Tuy nhiên, từ khi xuất hiện tại Việt Nam đến nay không có đột biến lớn khác biệt các dòng N1 như ở giai đoạn trước 2003, mà chủ yếu vẫn tập trung vào một dòng gen N1 đã tiến hóa.

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 giai đoạn 2008 - 2010, do

PGS. TS. Lê Thanh Hòa và ThS. (NCS) Đoàn Thị Thanh Hương làm chủ nhiệm và Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học hỗ trợ trang thiết bị thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baigent SJ, McCauley JW (2001) Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 79(1-2): 177-185.
- Castrucci MR, Kawaoka Y (1993) Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* 67: 759-764.
- Chen JM, Ma HC, Chen JW, Sun YX, Li JM, Wang ZL (2007) A preliminary panorama of the diversity of N1 subtype influenza viruses. *Virus Genes* 35(1): 33-40.
- 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.

Keawcharoen J, Amonsin A, Oraveerakul K, Wattanodom S, Papravasit T, Karnda S, Lekakul K, Pattanarangsarn R, Noppornpanth S, Fouchier RA, Osterhaus AD, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y (2005) Characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of recent influenza virus isolates from different avian species in Thailand. *Acta Virol* 49(4): 277-280.

Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Trần Bình (2008a) So sánh và phân tích đặc tính đột biến trượt xoắn gen NA(N1) theo thời gian tiến hóa của virus cúm A/H5N1 ở các chủng của Việt Nam và thế giới. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(2): 161-167

Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Trần Quang Vui, Nguyễn Mạnh Kiên, Nguyễn Xuân Vũ, Lê Trần Bình (2008b) Phát hiện biến chủng virus cúm A/H5N1 dòng Phúc Kiến gây bệnh trên gia cầm/người tại Việt Nam (pp 699-702). *Hội nghị khoa học toàn quốc lần*

thứ tư: Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh-y học và công nghiệp thực phẩm (Hà Nội, 16-17/10/2008). Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội (924 trang).

Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R (1999) The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 73(2): 1146-1155.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Nicholas KB, Nicholas HB (1997) Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.

Takao S, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayana M, Miyazaki K (2002) Neuraminidase Subtyping of Human Influenza A viruses by RT-PCR and Its Application to Clinical Isolates. *Jpn J Infect Dis* 55: 204-205.

CHARACTERIZATION OF THE NEURAMINIDASE (NA) POLYPEPTIDE OF THE AVIAN INFLUENZA VIRUS A/H5N1 STRAINS IN POULTRY COLLECTED DURING 2004 - 2009 IN VIETNAM

Nguyen Thi Bích Nga¹, Luong Thi Hong Van², Le Thanh Hoa^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²College of Sciences, Thai Nguyen University

SUMMARY

Antigenic polypeptide neuraminidase (NA) of the avian influenza virus A/H5N1 strains possess a highly variable property at the -NH₂ terminal, and this is one of the antigenic variation during evolution. The entire nucleotide sequence (1350 bp) of the neuraminidase (NA) coding for 449 deduced amino acids from 11 A/H5N1 strains isolated in different regions of Vietnam were obtained for comparative analysis. The obtained results revealed that the NA nucleotide sequence for 11 A/H5N1 strains in this study is 1350 bp in length remaining unchanged since 2003; this was resulted by deletion of 60 nucleotides (20 amino acids) from the fragment of strains isolated prior 2003 (1410 bp NA (N1) gene translated for a peptide of 469 amino acids). There were some drift mutations observed in amino acids sequence of NA derived from the strains collected in 2008 and 2009. Based on twelve major variation sites in NA sequences, 24 strains were clarified to three groups: group I: 2008 - 2009; group II: 2006-2007 and group III: 2004 - 2005. Possibly the NA has evolution time by time to possess several important variations that involved in its pathogenicity in order to easily invade, exist and replicate in humans and animals (HPAI, highly pathogenic avian influenza).

Key words: A/H5N1, Avian influenza virus, Glycosylation, Neuraminidase (NA), Mutation, Phylogeny.

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