

BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA PROTEIN GP120 CỦA HIV-1 PHÂN TYPE CRF01_AE VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ KHÁNG HIV TRONG HUYẾT THANH BỆNH NHÂN

Bạch Thị Như Quỳnh¹, Lê Phương Hằng¹, Nguyễn Thị Phương¹, Vũ Thị Hiền¹, Đồng Văn Quyền¹, Nguyễn Quang Anh^{1,2}, Lê Văn Phụng³, Đinh Duy Khánh³

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Trung học phổ thông Cao Bá Quát, Hà Nội

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

TÓM TẮT

Protein vỏ GP120 của HIV là kháng nguyên rất quan trọng đối với đáp ứng miễn dịch, được nghiên cứu rộng rãi trong sản xuất vaccine, chế tạo kit chẩn đoán và liệu pháp điều trị HIV. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa vùng ngoại bào của GP120 gọi tắt là *gp120* được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu, thiết kế dựa trên trình tự gen *env* do chúng tôi tách dòng và công bố trên ngân hàng gen quốc tế trước đây với mã số FM162179 chứa vị trí nhận biết của enzyme hạn chế *Bam*HI và *Xho*I ở đầu 5' tương ứng của mỗi xuôi và mỗi ngược. Sản phẩm PCR (đoạn gen *gp120*) sau đó được gắn vào vector biểu hiện pET32a+ tại vị trí của 2 enzyme *Bam*HI và *Xho*I để tạo vector tái tổ hợp pET-gp120. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21 Star™ (DE3), các dòng tế bào mang pET-gp120 được chọn lọc bằng nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung Amp. Gen mã hóa GP120 biểu hiện mạnh nhất ở điều kiện cảm ứng 1 mM IPTG, 37°C trong thời gian 3 h. GP120 tái tổ hợp biểu hiện ở thể vùi dưới dạng protein dung hợp (fusion protein) có gần 6 Histidine và Thioredoxin ở đầu N (6xHis-Thioredoxin-GP120), với khối lượng phân tử khoảng 36 kDa. Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin dưới điều kiện không biến tính. Kết quả Western blot và ngưng kết hạt Latex cho thấy, protein GP120 tái tổ hợp phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng HIV tự nhiên trong huyết thanh bệnh nhân HIV.

Từ khóa: chẩn đoán, Dot blot, *gp120*, HIV, ngưng kết hạt latex, Western blot

MỞ ĐẦU

AIDS là đại dịch mang tính toàn cầu, đe dọa sự phát triển của nhân loại do HIV (Human Immunodeficiency Virus) gây ra. HIV thuộc họ *Retroviridae* và thuộc nhóm *Lentivirus*. Khi HIV xâm nhập vào cơ thể làm suy giảm hệ thống miễn dịch, cơ thể suy kiệt dần và dẫn tới tử vong do mắc phải những bệnh nhiễm trùng cơ hội (Angus, Robin, 1999; Nguyễn Trần Hiền, 1995). Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và chương trình phối hợp của Liên Hợp Quốc về phòng chống HIV/AIDS, kể từ khi phát hiện bệnh vào tháng 6/1981 cho tới nay, căn bệnh AIDS đã cướp đi mạng sống của 25 triệu người trên thế giới và trở thành một trong những căn bệnh có tỷ lệ tử vong cao nhất trong lịch sử nhân loại. Việt Nam hiện đang được xếp vào danh sách các nước có tỷ lệ nhiễm HIV cao trên thế giới, cũng như trong khu vực (Bộ Y tế, 2010; UNAIDS, 2010).

Hiện nay, việc nghiên cứu thuốc và vaccine phòng chống HIV vẫn chưa nhận được các kết quả

như mong đợi nên việc dự phòng chỉ có thể thực hiện bằng cách ngăn chặn các con đường lây truyền của virus. Do đó, việc chẩn đoán sớm các trường hợp nhiễm HIV là hết sức quan trọng, góp phần ngăn chặn các hành vi nguy cơ làm lan truyền HIV/AIDS trong cộng đồng. Chính vì vậy, việc nghiên cứu tạo ra các protein tái tổ hợp có tính đặc hiệu cao để ứng dụng tạo kit chẩn đoán HIV đã được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm. Đặc biệt, GP120 là một protein vỏ của HIV, có vai trò rất quan trọng trong đáp ứng miễn dịch và là một trong 3 protein (GP41, GP120 và P24) được sử dụng để tạo kit chẩn đoán. GP120 có bản chất là glycoprotein với khối lượng phân tử khoảng 120 kDa, có chức năng chính là liên kết với thụ thể CD4 trên các tế bào người, trợ giúp cho quá trình gắn hạt virus lên tế bào chủ. Đồng thời, sự liên kết của phức hợp GP120-CD4 với thụ thể chemokine sẽ tạo ra các thay đổi hình dáng trong GP41 gây ra sự hình thành phân tử hoạt động dung hợp để tấn công màng tế bào, bắt đầu cho quá trình gây nhiễm của HIV (Capon, Ward, 1991; Chersi *et al.*, 2000; Rogier, 2004).

Bài báo này trình bày kết quả biểu hiện, tinh sạch vùng GP120 bọc lộ trên bề mặt virus HIV phân typ CRF01_AE lưu hành tại Việt Nam và nghiên cứu khả năng sử dụng protein này để phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân, nhằm mục đích tạo kit chẩn đoán HIV bằng các kỹ thuật Western blot, dot blot và ngưng kết hạt latex.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vector pCR2.1 (Invitrogen, Mỹ) được dùng để tách dòng gen *gp120* mã hóa cho vùng GP120 bọc lộ trên bề mặt virus. Vector pET32a(+) (Invitrogen, Mỹ) được dùng làm vector biểu hiện protein tái tổ hợp. Gen *env* đã được tách dòng trong vector pCR2.1 và trình tự được đăng ký trong ngân hàng gen quốc tế với mã số FM162179 (Bach *et al.*, 2008).

Chủng *E. coli* DH5α (Invitrogen, Mỹ) dùng để tách dòng và chủng tế bào *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Mỹ) được dùng làm tế bào chủ để biểu hiện gen đích.

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 giới hạn *Bam*HI và *Xho*I (New England Biolabs, Mỹ), kit gắn hạt Latex (Bangs laboratories Inc., Mỹ).

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện

Plasmid chứa gen mã hóa protein vỏ được tạo dòng và lưu giữ tại phòng Vi sinh vật phân tử (Bach *et al.*, 2008) được sử dụng làm khuôn để khuếch đại gen *gp120* bằng cặp mồi GP120FQ và GP120RQ có gắn thêm trình tự nhận biết của *Bam*HI ở mỗi xuôi và trình tự nhận biết của *Xho*I ở mỗi ngược.

GP120FQ: 5'- TGC GGA TCC GTT CCT
BamHI

CGC TGG AGA GAT G -3';

GP120RQ: 5'- ACT CAC GAG TTA GGT
XhoI

TAC CTT TGG GCA AG -3'.

Sản phẩm PCR được tạo dòng vào vector pCR2.1 (Invitrogen) và kiểm tra lại trình tự (ABI 3100 Avant Genetic Analyzer). Đoạn gen *gp120* được cắt ra khỏi vector tách dòng bằng *Bam*HI và

*Xho*I và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) đã xử lý bằng *Bam*HI và *Xho*I. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5α, sau đó dòng plasmid tái tổ hợp được chọn lọc dựa vào cắt bằng *Bam*HI và *Xho*I.

Vector pET32a(+) tái tổ hợp mang đoạn gen *gp120* được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21 Star™ (DE3). Protein tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường LB lỏng có bổ sung Amp và cảm ứng bằng IPTG với nồng độ cuối cùng là 1 mM. Protein tái tổ hợp được thu nhận sau 3 h nuôi cấy cảm ứng ở 37°C và kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide (Laemmli, 1970).

Tinh chế protein tái tổ hợp bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin

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.

Western Blot

Protein GP120 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 (skin milk) 5% pha trong đệm TBS. Rửa màng 3 lần bằng TTBS mỗi lần 5 phút. Màng được ủ với kháng thể có trong huyết thanh bệnh nhân dương tính với HIV pha loãng 500 lần trong skin milk 1%, lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 h. Rửa màng 3 lần bằng TTBS mỗi lần 5 phút. Tiếp theo màng được ủ với cộng hợp HRP kháng IgG người pha loãng 10.000 lần trong skin milk 1%, lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 h. Rửa màng 3 lần bằng TTBS mỗi lần 5 phút và 3 lần bằng TBS. Cuối cùng ủ màng trong dung dịch chất hiển màu (5ml methanol + 15mg chất hiển màu pha trong 25 ml TBS + 15μl H₂O₂ 30%) trong thời gian 10 phút và đọc kết quả.

Ngưng kết hạt latex

Phản ứng ngưng kết hạt latex được tiến hành như đã mô tả trước đây (Chu Hoàng Hà *et al.*, 2007). Nhỏ 10 μl huyền dịch hạt latex gắn GP120 lên lam kính sạch, sau đó nhỏ 40 μl huyết thanh cần xét nghiệm vào, khuấy đều bằng đầu tip. Để ở nhiệt độ phòng 5 - 10 phút, quan sát sự ngưng kết. Nếu mẫu huyết thanh xét nghiệm dương tính với HIV thì kháng thể kháng HIV trong huyết thanh sẽ phản ứng với kháng nguyên GP120 tái tổ hợp gắn trên hạt

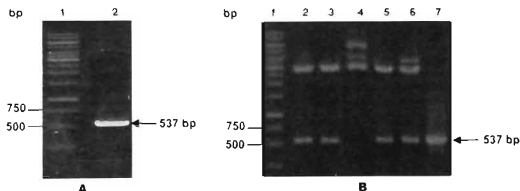
latex tạo phức hợp hạt latex-kháng nguyên-kháng thể và gây hiện tượng ngưng kết có thể dễ dàng quan sát bằng mắt thường. Ngược lại, nếu mẫu huyết thanh xét nghiệm âm tính với HIV thì sẽ không xuất hiện sự lắng tủa của phức hợp.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện pET-gp120

Gen mã hóa vùng protein GP120 bọc lộ trên bề mặt virus được khuếch đại từ vector pCR2.1 mang gen *env* do chúng tôi tách dòng trước đây (Bạch Thị Như Quỳnh *et al.*, 2008) bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi GP120FQ và GP120RQ. Sử dụng chương trình dự đoán vị trí glycosyl hóa NetOGlyc-3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), chúng tôi nhận thấy đây là vùng có nhiều vị trí acid amin được glycosyl hóa. Li và đồng tác giả (2009) đã chứng minh được rằng, quá trình glycosyl hóa GP120 không chỉ giúp GP120 tạo cấu trúc hoàn

chỉnh mà còn ảnh hưởng rất lớn đến tính sinh miễn dịch của kháng nguyên này. Kết quả điện di gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR được nhân lên rất đặc hiệu, kích thước phân tử phù hợp với tính toán lý thuyết (537 bp) (Hình 1A). Sản phẩm PCR được tinh sạch, gắn vào vector pCR2.1 tạo vector tái tổ hợp đồng trung gian và xác định trình tự. Kết quả cho thấy trình tự gen *gp120* không bị sai lệch so với trình tự gốc và dịch mã thông suốt, không tạo mã kết thúc trong gen (kết quả không trình bày ở đây). Sau đó, gen *gp120* được cắt ra khỏi vector tách dòng bằng hai enzyme *Bam*HI và *Xho*I và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) tại vị trí 2 enzyme tương ứng để tạo thành vector tái tổ hợp pET-gp120. Các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen *gp120* (pET-gp120) được chọn lọc bằng cách cắt kiểm tra plasmid với *Bam*HI và *Xho*I. Kết quả (Hình 1B) cho thấy: các dòng plasmid ở đường chạy số 2, 3, 5 và 6 mang gen *gp120*. Plasmid tái tổ hợp này sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21 Star™ (DE3) để biểu hiện gen.



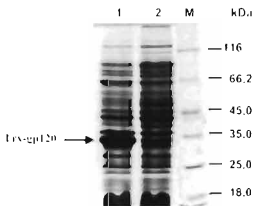
Hình 1. Thiết kế vector biểu hiện repET-gp120. A. Phân tích sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *gp120* trên gel agarose 1%. 1: thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas); 2: sản phẩm PCR (*gp120*). B. Phân tích sản phẩm cắt các dòng plasmid tái tổ hợp (pET-gp120) bằng enzyme cắt hạn chế. 1: thang DNA chuẩn 1 kb; 2-6: các dòng plasmid 1-5 cắt bằng *Bam*HI và *Xho*I; 7: đối chứng (đoạn gen *gp120*).

Biểu hiện protein tái tổ hợp GP120

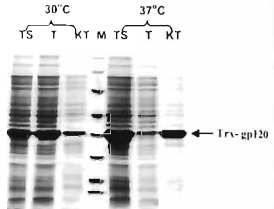
Chủng *E. coli* BL21 Star™ (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-gp120 được dùng để biểu hiện protein GP120 (Hình 2). Để tìm điều kiện biểu hiện tối ưu nhất, chúng tôi đã thử thay đổi các nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng IPTG, thời gian biểu hiện sau cảm ứng. Chúng tôi lựa chọn các nhiệt độ 37, 30 và 25°C để kiểm tra. Kết quả cho thấy, protein tái tổ hợp biểu hiện ở dạng thể vùi ở 37°C. Tại 30°C và 25°C, protein thu được ở pha nổi nhiều hơn pha cặn. Điều đó có nghĩa là protein thu được ở dạng hòa tan. Tuy nhiên hàm lượng protein tái tổ hợp ở 25°C thấp hơn nhiều so với 30°C (Hình 3). Do đó chúng tôi sẽ lựa

chọn nhiệt độ để nuôi chủng tái tổ hợp mang gen *gp120* là 30°C.

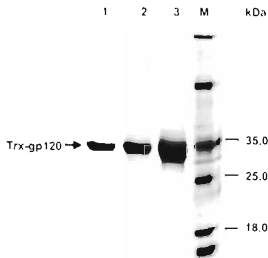
Nồng độ IPTG ảnh hưởng khá nhiều đến mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp (các kết quả này không trình bày ở đây). Từ các kết quả thử nghiệm, chúng tôi chọn điều kiện biểu hiện GP120 ở 30°C, 0,1 mM chất cảm ứng IPTG và thu mẫu 3 h sau khi cảm ứng. Tế bào sau khi cảm ứng IPTG được thu lại bằng ly tâm và xử lý để kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp bằng điện di trên gel SDS-PAGE 12,5%. Kết quả cho thấy, GP120 được biểu hiện dưới dạng hòa tan có kích thước khoảng 37 kDa như tính toán lý thuyết (Hình 3).



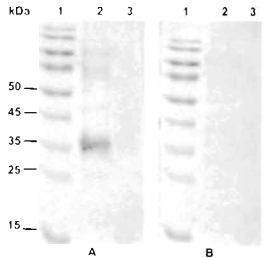
Hình 2. Biểu hiện Protein tại tổ hợp trong *E. coli* BL21 Star™ (DE3) DC1 protein tổng số (được cảm ứng với IPTG), DC2 protein tổng số (khi không cảm ứng với IPTG), M thang protein chuẩn



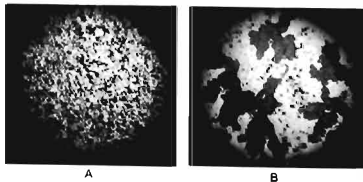
Hình 3. Xác định trạng thái hòa tan của protein tại tổ hợp chung mang gen *gp120*. TS Protein tổng số, T Protein thuộc pha tan, KT Protein thuộc pha không tan, M thang protein chuẩn



Hình 4. Phân tích protein của các phân đoạn trong quá trình tinh chế GP120 trên gel SDS-PAGE M Thang protein chuẩn (Fermentas). 1-3 Các phân đoạn đẩy ra khỏi cột sau khi tinh chế



Hình 5. Khả năng liên kết miễn dịch giữa protein tái tổ hợp với kháng thể có trong huyết thanh bệnh nhân bằng Western blot **A** Huyết thanh dương tính với HIV **B** Huyết thanh âm tính với HIV 1 Thang protein chuẩn (Fermentas), 2 GP120, 3 Thioedoxin



Hình 6. Ảnh chụp dưới kính hiển vi sự ngưng kết của phức hợp kháng nguyên-kháng thể sau khi trộn kháng thể kháng HIV tự nhiên trong huyết thanh bệnh nhân HIV với GP120 tái tổ hợp gắn trên bề mặt hạt latex **A:** Mẫu huyết thanh âm tính với HIV; **B** Mẫu huyết thanh dương tính với HIV.

Tính chất protein tái tổ hợp GP120

Do protein tái tổ hợp GP120 được thiết kế gắn thêm một đoạn trình tự gồm 6 histidine ở đầu N và một đoạn trình tự 6 histidine ở đầu C, vì thế chúng tôi lựa chọn phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp bằng cột sắc ký ái lực ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen). Sau khi rửa cột để loại bỏ các protein tạp nhiễm bám không đặc hiệu, protein tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột bằng 250 mM Imidazole, các phân đoạn đẩy ra khỏi cột được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12.5% trong điều kiện biến tính có SDS (Hình 3). Kết quả điện di cho thấy GP120 tái tổ hợp có độ tinh sạch cao, có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu khả năng phản ứng của GP120 tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân HIV bằng Western blot

Để có thể sử dụng GP120 tái tổ hợp làm nguyên liệu cho việc phát triển bộ kit chẩn đoán HIV, trước tiên phải kiểm tra xem liệu sau khi biểu hiện và làm hồi tính protein tái tổ hợp có thể nhận biết được kháng thể kháng lại HIV tự nhiên hay không. Chúng tôi đã kiểm tra mức độ phản ứng của GP120 tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV tự nhiên trong huyết thanh bệnh nhân HIV bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả cho thấy protein tái tổ hợp GP120 phản ứng rất đặc hiệu với kháng thể kháng HIV tự nhiên trong huyết thanh bệnh nhân HIV dương tính và hoàn toàn không phản ứng với huyết thanh bệnh nhân HIV âm tính (Hình 5).

Như trình bày ở trên, GP120 tái tổ hợp được biểu hiện dưới dạng dung hợp có gắn thêm protein Thioredoxin ở đầu N, vì vậy chúng tôi sử dụng protein Thioredoxin làm đối chứng để xác định tính đặc hiệu của phản ứng kháng nguyên - kháng thể giữa GP120 tái tổ hợp và kháng thể kháng HIV tự nhiên. Kết quả nghiên cứu cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp Thioredoxin hoàn toàn không phản ứng với kháng thể trong các mẫu huyết thanh xét nghiệm (Hình 5). Kết quả này nói lên rằng sau khi tinh chế GP120 tái tổ hợp vẫn bảo tồn nguyên vẹn được tính kháng nguyên và phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng lại chúng trong các mẫu huyết thanh bệnh nhân HIV.

Nghiên cứu khả năng phản ứng của GP120 tái tổ hợp với kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân HIV bằng kỹ thuật ngưng kết hạt latex

Western blot là một trong các xét nghiệm quan trọng dùng để khẳng định xem bệnh nhân xét nghiệm

là dương tính hay âm tính với HIV. Tuy nhiên, trong chẩn đoán sàng lọc HIV, người ta không thể sử dụng kit Western blot vì giá thành kit này vẫn còn cao, thao tác phức tạp, tốn nhiều thời gian và công sức. Với mục tiêu là chế tạo bộ kit chẩn đoán sàng lọc nhanh HIV, thao tác đơn giản với giá thành rẻ, chúng tôi nghiên cứu ứng dụng protein GP120 tái tổ hợp tinh chế để chế tạo kit chẩn đoán HIV bằng kỹ thuật ngưng kết hạt latex. Trước đó, chúng tôi đã ứng dụng thành công kỹ thuật này để chẩn đoán HBV trên cơ sở kháng nguyên lõi (HBcAg) của virus viêm gan B (Chu Hoàng Hà *et al.*, 2007). Kết quả phản ứng ngưng kết hạt latex cho thấy, với mẫu huyết thanh HIV dương tính, khi bổ sung hạt latex gắn GP120 tái tổ hợp, GP120 phản ứng với kháng thể kháng HIV trong huyết thanh tạo thành phức hợp hạt latex - kháng nguyên - kháng thể và gây ra hiện tượng ngưng kết có thể dễ dàng quan sát bằng mắt thường (Hình 6B). Trong khi đó hiện tượng ngưng kết hoàn toàn không xảy ra khi sử dụng mẫu huyết thanh bệnh nhân HIV âm tính (Hình 6A).

Kết quả này cho thấy GP120 tái tổ hợp sau khi gắn vào hạt latex phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng HIV tự nhiên trong huyết thanh bệnh nhân. Đây là cơ sở quan trọng cho việc chế tạo thành công bộ kit sàng lọc nhanh HIV.

KẾT LUẬN

Gen mã hóa vùng GP120 bọc lõi trên bề mặt virus HIV đã được biểu hiện và tinh chế thành công trong tế bào *E. coli* BL21 Star™ (DE3) dưới dạng dung hợp với Thioredoxin và 6 Histidine. Protein tái tổ hợp tinh sạch phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng HIV tự nhiên trong các mẫu huyết thanh bệnh nhân HIV. Nghiên cứu này là tiền đề quan trọng trong việc phát triển bộ kit chẩn đoán HIV nhanh, nhạy, đặc hiệu bằng các kỹ thuật Western blot, ngưng kết hạt Latex trên cơ sở kháng nguyên có nguồn gốc từ các phân tử HIV đang lưu hành tại Việt Nam.

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, được thực hiện tại Phòng Vi sinh vật phân tử và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Angus GD, Robin AW (1999) *HIV and the new viruses*.

Academic Press, San Diego.

Bach TNQ, Phạm MT, Nguyễn TT, Lê TT, Đông VQ, Đinh DK (2008) Cloning and expression of the gene coding for GP120 protein from HIV infected patient, Genbank, *FM162179*.

Bộ Y tế (2010) *Điều tra cơ bản thực trạng chăm sóc, tư vấn, hỗ trợ người nhiễm HIV/AIDS và các hoạt động phòng chống HIV dựa vào cộng đồng ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Capon DJ, Ward RH (1991) The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 9: 649-678

Chersi A, Pugliese O, Federico A, Viora M (2000) Short synthetic peptides derived from viral proteins compete with HIV gp120 for the binding to CD4 receptors. *Vir Immunol* 13(4): 547-554

Chu Hoàng Hà, Phạm Minh Tuấn, Đồng Văn Quyền, Phan Trọng Hoàng, Lê Trần Bình, Đinh Duy Kháng (2007) Nghiên cứu tạo hạt latex gắn HBcAg để phát hiện kháng

thể kháng HBcAg trong huyết thanh bệnh nhân viêm B. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(3): 285-290.

Nguyễn Trần Hiền (1995) *Các phương thức lây truyền HIV và giám sát dịch tễ học nhiễm HIV. Nhiễm HIV/AIDS: Y học cơ sở, lâm sàng và phòng chống*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Rogier WS (2004) *The HIV-1 envelope glycoprotein folding, function and vaccine design*. Universiteit Amsterdam, Amsterdam.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 680-685.

Li H, Xu CF, Blais S, Wan Q, Zhang HT, Landry SJ, C'E (2009) Proximal glycans outside of the epitope regulate the presentation of HIV-1 envelope gp120 to epitopes. *J Immunol* 182(10): 6369-6378.

UNAIDS (2010). *Cập nhật tình hình dịch AIDS: Báo độc biết về HIV/AIDS: tháng 12 năm 2009*.

EXPRESSION OF THE EXTRACELLULAR REGION OF HIV-1 ENVELOP GP GLYCOPROTEIN FROM HIV-1 SUBTYPE CRF01_AE AND ITS APPLICATION FOR DETECTION OF ANTI-HIV ANTIBODY IN PATIENT'S SERA

Bach Thị Như Quỳnh¹, Lê Phương Hằng¹, Nguyễn Thị Phương¹, Vũ Thị Hiền¹, Đông Văn Quỳnh¹, Nguyễn Quang Anh^{1,2}, Lê Văn Phụng³, Đinh Duy Kháng^{1,*}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Cao Bá Quát high school, Hanoi

³National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

SUMMARY

The highly immunogenic GP120 envelope protein has been extensively studied for development of vaccine, diagnostic kit as well as HIV therapy. Herein, gene encoding extracellular region of GP120 protein was amplified by PCR using specific primers designed based on *env* gene sequence previously cloned in our laboratory and registered in Genbank with accession number FM162179, containing *Bam*HI and *Xho*I restriction sites at the 5' of the forward and reverse primers, respectively. The amplified DNA fragment (*gp120*) was subcloned into pCR2.1 vector, sequenced and then inserted into pET32a(+) expression vector at *Bam*HI and *Xho*I sites to yield recombinant vector pET-gp120. The pET-gp120 was then transformed into BL21 Star™ (DE3) *E. coli* strain for recombinant protein expression. The optimal condition for GP120 expression was at 30°C, 0.1 mM IPTG and 3 hours of induction. The recombinant GP120 was expressed in insoluble form with 6Histidine and Thioredoxin at N-terminal and has a molecular mass of approximately 37 kDa. Recombinant protein was purified by affinity column (Probond™ Nickel-Chelating Resin) under native condition. The results of Western blot and latex agglutination assays showed that the recombinant GP120 binds specifically to HIV antibody in HIV patient's sera.

Keywords: diagnostic kit, gp120, HIV-1 subtype CRF01_AE, latex agglutination, Western blot.

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