

TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA TIỂU ĐƠN VỊ P66 CỦA ENZYME PHIÊN MÃ NGƯỢC CỦA VIRUS HIV-1

Phan Trọng Hoàng¹, Ngô Văn Trường², Lê Văn Sơn¹, Lê Trần Bình¹, Chu Hoàng Hà¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Đại học Bách khoa Đà Nẵng

TÓM TẮT

Enzyme phiên mã ngược của virus gây suy giảm miễn dịch ở người dạng 1 (the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: HIV-1 RT) được cấu tạo từ hai tiểu đơn vị riêng biệt có kích thước 66 và 51 kDa, viết tắt là p66 và p51. Enzyme này được dịch mã và đóng gói trong các thể virus và được sinh ra từ polyprotein tiền chất gap-pol (Pro160gap-pol). Các protease của hạt HIV sẽ thủy phân polyprotein tiền chất gap-pol này ở các vị trí khác nhau để sinh ra hai tiểu đơn vị p66, p51. Tiểu đơn vị p66 có chứa vùng DNA polymerase và vùng RNase H. Để biểu hiện tiểu đơn vị này trong *E. coli* (thiếu hệ protease của HIV), chúng tôi tiến hành phân lập vùng gen mã hóa cho p66 dài 1680 bp với cặp môi đặc hiệu HIV P66-NdeI-F, HIV RT66-SalI-R, tách dòng bằng vector pCR2.1 (pCR-HIV RT-p66) và đọc trình tự nucleotide. Tiểu đơn vị p66 được gắn vào vector biểu hiện pET21a(+) (Novagen) và được biểu hiện trong chủng *E. coli* rosetta-gamiTM (DE3) có hỗ trợ các bộ ba mã hiếm dưới sự cảm ứng của IPTG. Điều kiện tối ưu để biểu hiện dư thừa p66 trong *E. coli*: nồng độ IPTG là 1 mM, nhiệt độ cảm ứng là 30°C trong thời gian 5 h.

Từ khóa: Enzyme phiên mã ngược, tiểu đơn vị p51, tiểu đơn vị p66, vector biểu hiện, vector tách dòng, virus gây suy giảm miễn dịch ở người dạng 1

MỞ ĐẦU

Enzyme phiên mã ngược của HIV-1 (Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase) có khả năng tổng hợp cDNA từ sợi RNA hệ gen của virus HIV.

HIV-1 RT là một enzyme đa chức năng có 3 hoạt tính chính: (1) tổng hợp sợi (-)DNA từ RNA; tổng hợp sợi (+)DNA dưới tác dụng của DNA polymerase phụ thuộc DNA và hoạt tính ribonuclease H (Dufour *et al.*, 1998). HIV-1 RT đóng vai trò trung tâm trong quá trình nhân lên của virus nên đây là đối tượng chính được nghiên cứu để tìm ra liệu pháp chống HIV. Ở Mỹ hiện nay có 07 chất ức chế enzyme RT đã được đăng ký là thuốc trị bệnh HIV (Huang *et al.*, 2000).

HIV-1 RT là enzyme dị hợp được cấu tạo từ hai chuỗi polypeptide riêng biệt có kích thước tương ứng là 66 và 51 kDa. Tiểu đơn vị p66 có hai vùng hoạt tính là DNA polymerase và RNase H. Vùng DNA polymerase có 04 phân vùng chức năng finger (F), palm (P), thumb (T), connection (C) và RNase H (R). Trong khi đó, tiểu đơn vị p51 không có hoạt tính RNase và được sinh ra từ tiểu đơn vị p66 dưới sự

phân cắt của protease ở virus HIV (Dufour *et al.*, 1998).

HIV-1 RT được biểu hiện ở dạng protein tái tổ hợp với các hệ thống vật chủ khác nhau như nấm men, *E. coli*... Ba dạng cấu trúc cũng đã được tinh sạch và định tính: dạng dị hợp p66/p51, p66/p66 và p51/p51. Tiểu đơn vị p66 và p51 có sự liên kết rất chặt (hằng số liên kết- $K_a = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), trong khi đó dạng p66/p66 liên kết yếu hơn nhiều ($K_a = 2 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) còn ở dạng p51/p51 thì không được phát hiện (Becerra *et al.*, 1991). Thimmig và đồng tác giả (1993) cho rằng chỉ cấu trúc dị hợp p66/p51 là có hoạt tính enzyme phiên mã ngược. Bằng cách đặt bộ ba kết thúc ngay phía trước vị trí cắt của protease ở HIV, Bathurst và đồng tác giả (1990) đã biểu hiện và tinh sạch thành công hai tiểu đơn vị p66, p51 của enzyme HIV-1 RT trong nấm men. Tuy nhiên, lượng protein tái tổ hợp thu được không nhiều. Thimmig và đồng tác giả (1993); Hou và đồng tác giả (2003) cũng đã biểu hiện và tinh sạch thành công cấu trúc dị hợp từ p66/p51 dưới dạng protein tái tổ hợp ở *E. coli* (Muller *et al.*, 1989).

Tất cả các retrovirus đều có enzyme phiên mã ngược, nhưng đa số các enzyme phiên mã ngược được thương mại hiện nay có nguồn gốc từ hai loại

retrovirus: (1) Moloney murine leukemia virus (MMLV) có một chuỗi polypeptide; (2) Avian myeloblastosis virus (AMV) gồm hai chuỗi polypeptide. Tuy nhiên, enzyme phiên mã ngược có nguồn gốc từ hai loại virus trên có nhiệt độ hoạt động tương đối thấp (37 - 42°C). Trong khi đó, HIV-1 RT lại có những đặc điểm nổi trội hơn như chịu được nhiệt độ cao hơn (hoạt động tối ưu là 50°C), hiệu suất tổng hợp cDNA cao và rất thích hợp phiên mã các đoạn gen có thành phần G/C cao.

Enzyme phiên mã ngược đóng vai trò là enzyme chìa khóa trong phản ứng reverse transcript-PCR (RT-PCR), có khả năng tổng hợp sợi cDNA từ RNA. Do vậy, enzyme này rất có ý nghĩa trong nghiên cứu sinh học phân tử nói chung và trong chẩn đoán các bệnh virus có hệ gen là RNA nói riêng. Enzyme phiên mã ngược của virus HIV-1 với các ưu điểm vượt trội đã được chúng tôi lựa chọn để biểu hiện trong *E. coli* với mục đích chủ động nguồn enzyme cho nghiên cứu sinh học phân tử và tạo bộ kit chẩn đoán bệnh virus.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu máu nhiễm bệnh HIV-1 được thu thập tại

Bệnh viện Bạch Mai-Hà Nội.

Vector biểu hiện, tế bào biểu hiện chủng Rosetta-gamiTM (DE3) có bổ sung 6 bộ ba mã hiếm (Novagen). Unstained protein MW marker, pageRuler prestained protein ladder, genRuler 1kb DNA ladder và Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fermentas). Kháng thể đơn dòng: monoclonal anti-histidine-alkaline phosphatase (Sigma) và cơ chất BCIP (Bio Rad).

Phương pháp

Thiết kế môi

Tiểu đơn vị p66 của HIV-1 RT được sinh ra từ chuỗi polypeptide Gap-Pol có kích thước khoảng 160 kDa (Jonckheere *et al.*, 1994; Tachedjian *et al.*, 2003). Hệ enzyme protease của virus HIV-1 sẽ cắt tiền chất trên ở ngay sau vị trí Leu-540 tạo ra chuỗi polypeptide có kích thước 66 kDa, gọi là tiểu đơn vị p66 (Mizrahi *et al.*, 1989; Bathurst *et al.*, 1990). Các cặp môi được thiết kế để nhân gen mã hóa cho tiểu đơn vị này nằm ngay phía trước điểm cắt của protease. Do đoạn gen mã hóa cho tiểu đơn vị p66 dài 1860 bp nên chúng tôi tiến hành thiết kế thêm một môi ngược ở vị trí 986 - 1016 của gen và một môi xuôi ở vị trí 728 - 747 (Bảng 1).

Bảng 1. Các đoạn môi dùng trong PCR (Vị trí nucleotide được gạch chân là điểm nhận biết của enzyme hạn chế).

Tên môi	Vị trí bắt cặp của môi	Trình tự của môi
HIV P66- <i>Nde</i> I -F 1-25	1 - 25	5'- agcatatgcccattagtcctattgamactgtac -3'
HIV-MR-1016	986 - 1016	5'- gtccattggtcctgccctgtt -3'
HIV- MF-728	728 - 747	5'- agcctatagaactgccaga -3'
HIV RT66- <i>Sall</i> -R	1658 - 1680	5'- aggtcgactagacycttyctgattccwgactgact -3'

Thiết kế vector biểu hiện và biểu hiện tiểu đơn vị p66 trong *E. coli*

Vector tách dòng pCR2.1 mang gen mã hóa cho tiểu đơn vị p66 được cắt bằng enzyme *Nde*I và *Sall* để thu lấy đoạn gen mong muốn, sau đó gắn vào vector pET21(a+) đã được xử lý cùng enzyme. Sản phẩm gắn kết được biến nạp vào chủng DH5α, chọn các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pET-HIV-1 RT p66 bằng phương pháp colony-PCR và cắt bằng *Nde*I/ *Sall*.

Vector tái tổ hợp pET-HIV-1 RT p66 được biến

nạp vào chủng biểu hiện rosetta-gamiTM. Nuôi qua đêm 1 khuẩn lạc trong 2 ml môi trường LB chứa các kháng sinh thích hợp, hoạt hóa ở 37°C trong khoảng 3 h tới khi OD₆₀₀ đạt 0,6, bổ sung IPTG 1 mM, lắc ở các điều kiện khác nhau để khảo sát.

Sau khi cảm ứng, ly tâm dịch khuẩn 8000 vòng/phút trong 5 phút thu tế bào khuẩn, hòa tan tế bào trong đệm PBS, tiếp tục siêu âm, ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút, thu protein tan trong đệm, phần cặn được hòa tan lại trong đệm có chứa urea, điện di trên gel polyacrylamide để kiểm tra tính tan.

Phân tích Western blot

Tế bào biểu hiện sau khi cảm ứng bằng IPTG được hòa tan trong dung dịch đệm (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,2% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol), biến tính ở 95°C trong 10 phút, sau đó phân tách trên gel polyacrylamide 12,6%. Sau điện di, protein được thấm chuyển lên màng nitrocellulose, màng được ủ với đệm block (5% sữa không béo trong đệm phosphate buffered saline-PBS) trong 1 h. Tiếp tục ủ màng với đệm PBS chứa kháng thể antihistidine và 5% sữa không béo trong vòng 2 h. Sau khi rửa bỏ các thành phần bám không mong muốn, kháng thể bám đặc hiệu với 6 histidine có gắn với enzyme alkaline phosphatase được phát hiện bằng cơ chất BCIP/NBT theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (Sigma).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng, phân tích trình tự nucleotide và amino acid gen mã hóa tiểu đơn vị p66 của enzyme phiên mã ngược ở virus HIV-1

Tách dòng gen mã hóa tiểu đơn vị HIV-1 RT p66

Khi thực hiện phản ứng RT-PCR với cặp mồi HIV P66-*Nde*I-F và HIV-MR-1016, đoạn DNA ở đầu 5' sẽ được nhân lên với kích thước 1016 bp. Thôi gel lấy phân đoạn DNA này để phục vụ ghép nối thành gen mã hóa enzyme HIV-1 RT p66 sau này. Tương tự, sử dụng cặp mồi HIV P66-*Sall*-R và HIV-MF-728 trong RT-PCR sẽ nhân được phân đoạn DNA ở đầu 3' có kích thước 952 bp. Như vậy, 288 nucleotide cuối của phân đoạn DNA đầu 5' và 288 nucleotide đầu của phân đoạn đầu 3' là giống nhau. Dựa vào đoạn giống nhau này, bằng phản ứng PCR ghép hai phân đoạn với nhau tạo thành đoạn

gen mã hóa tiểu đơn vị HIV-1 RT p66. Phản ứng PCR này sử dụng cặp mồi HIV P66-*Nde*I-F/HIV RT66-*Sall*-R và hai phân đoạn DNA trên làm khuôn sẽ tạo được gen HIV-1 RT p66 có kích thước 1680 bp. Kết quả cho thấy, đoạn gen được nhân lên có kích thước phù hợp với đoạn gen đã dự đoán trước (1680 bp).

Đoạn gen sau khi ghép nối được gắn vào vector pCR2.1 để tách dòng và đọc trình tự. Sản phẩm gắn kết giữa vector pCR2.1 và gen HIV-1 RT p66 được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α. Chọn các khuẩn lạc trắng, nuôi và tách DNA plasmid để cắt bằng *Eco*RI. Các plasmid tái tổ hợp khi cắt bằng *Eco*RI đều cho hai băng một băng có kích thước khoảng 3900 bp bằng với kích thước của vector pCR2.1, băng còn lại có kích thước 1680 bp bằng kích thước của gen HIV-1 RT p66.

Phân tích trình tự nucleotide và amino acid của tiểu đơn vị p66

Phân tích trình tự nucleotide

Trình tự nucleotide của gen HIV-1 RT p66 được đọc trình tự bằng máy phân tích tự động ABI 3100 Genetic Analyzer tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học. Khi phân tích trình tự nucleotide của HIV-1 RT p66 chúng tôi thu được đoạn gen có kích thước là 1680 bp đúng như kích thước dự đoán ban đầu. Trình tự nucleotide của tiểu đơn vị HIV-1 RT p66 được so sánh với trình tự nucleotide của 6 gen tương ứng trên ngân hàng gen có mức độ tương đồng cao nhất. Bảng 2 cho thấy HIV-1 RT p66 tách dòng ở Việt Nam không giống 100% với các trình tự nucleotide trên ngân hàng gen. Trình tự này có độ tương đồng cao nhất với trình tự nucleotide của gen có số hiệu trên ngân hàng NCBI AY008714, là 96,8%.

Bảng 2. Mức độ tương đồng nucleotide của HIV-1 RT p66 tách dòng ở Việt Nam và trên ngân hàng gen.

	1	2	3	4	5	6	7		
1	100	98.6	99.1	98.8	98.6	99.5	95.7	1	AB052995
2		100	98.8	98.8	98.6	98.8	96.2	2	AB220946
3			100	98.9	98.8	99.3	95.7	3	AB220947
4				100	99.8	98.9	96.8	4	AY008714
5					100	98.8	96.8	5	AY008718
6						100	95.9	6	AY713425
7							100	7	HIV-1 RT p66
	1	2	3	4	5	6	7		

Phân tích trình tự amino acid

Sử dụng phần mềm DNASTar để dịch mã đoạn gen HIV-1 RT p66 nói trên thành trình tự amino acid (560 aa). Trình tự amino acid của HIV-1 RT p66 tách dòng ở Việt Nam không tương đồng 100% với các tiểu đơn vị p66 công bố trên ngân hàng NCBI. Mức độ tương đồng cao nhất về trình tự amino acid của HIV-1 RT p66 ở Việt Nam với AY008714, AY008718 là 96,8%.

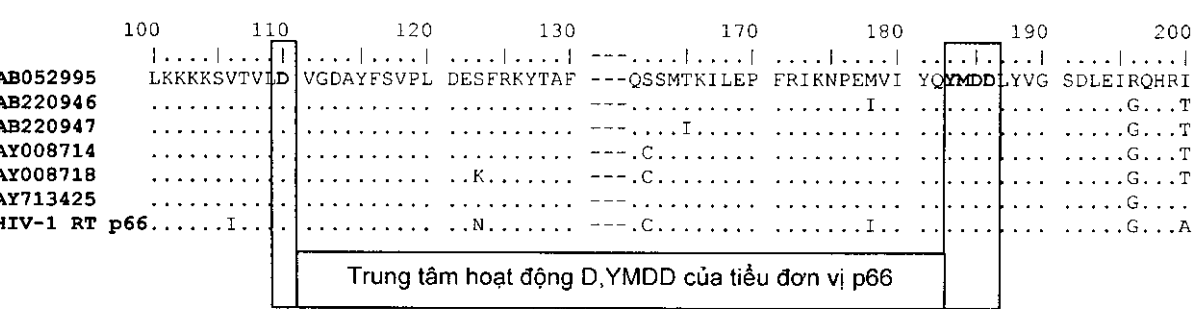
Để tìm hiểu gen mã hóa cho tiểu đơn vị HIV-1 RT p66 khi được biểu hiện trong *E. coli* có hoạt tính polymerase hay không, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự amino acid ở khu vực trung tâm hoạt động của enzyme phiên mã ngược.

Enzyme phiên mã ngược của các retrovirus thường có trình tự YXDD rất bảo thủ vì trình tự này là trung tâm hoạt động của hoạt tính polymerase ở

virus và tế bào (Hughes, 2001; Kamer *et al.*, 1984). Ở virus HIV-1 trình tự của trung tâm hoạt động là YMDD và chúng thuộc phân vùng chức năng palm (P), trong đó amino acid Y183 và M184 có chức năng vận chuyển deoxynucleoside triphosphate (dNTP) vào vùng hoạt động của tiểu đơn vị p66. Nếu đột biến ở hai vị trí amino acid này sẽ làm giảm đáng kể đến chức năng polymerase (Gotte *et al.*, 2000; Hizi *et al.*, 1988). Vị trí đặc biệt của vùng hoạt động YMDD là amino-acid aspartate (D185 và D186), cùng với D110 tạo lên một bộ ba xúc tác cho hoạt tính polymerase. Mulky và đồng tác giả (2004) khi gây đột biến D185, D186 thành N185 và N186 ở tiểu đơn vị p66 cho thấy chức năng polymerase của enzyme phiên mã ngược gần như mất hoạt tính. Đối chiếu trình tự amino acid của gen HIV-1 RT p66 đã tách dòng được, chúng tôi thấy các vị trí amino acid trong trung tâm hoạt động không bị thay đổi (Hình 1).

Bảng 3. Mức độ tương đồng amino acid của HIV-1 RT p66 tách dòng ở Việt Nam và trên ngân hàng gen.

	1	2	3	4	5	6	7		
1	100	98.8	99.0	98.5	97.7	99.2	96.0	1	AB052995
2		100	98.8	98.7	98.1	99.1	96.1	2	AB220946
3			100	98.5	97.9	99.0	96.2	3	AB220947
4				100	99.3	98.8	96.8	4	AY008714
5					100	98.1	96.4	5	AY008718
6						100	96.1	6	AY713425
7							100	7	HIV-1 RT p66
	1	2	3	4	5	6	7		



Hình 1. Trung tâm hoạt động của tiểu đơn vị HIV-1 RT p66. AB052995, AB220946, AB220947, AY008714, AY008718, AY713425: số hiệu của các trình tự amino acid trên ngân hàng gen NCBI; HIV-1 RT p66: trình tự amino acid của tiểu đơn vị p66 được phân lập ở Việt Nam.

Biểu hiện gen mã hóa tiểu đơn vị p66 của enzyme phiên mã ngược ở virus HIV-1 trong *E. coli*

Thiết kế vector biểu hiện

Khi thiết kế môi, cặp môi HIV P66-*Nde*I-F và HIV RT66-*Sal*I-R cần có đủ các điều kiện sau: môi xuôi HIV P66-*Nde*I-F chứa điểm cắt của enzyme *Nde*I, đồng thời cung cấp luôn cho đoạn gen HIV-1 RT p66 mã mở đầu ATG ngay trước bộ ba đầu tiên của gen HIV-1 RT p66. Môi xuôi cũng chứa điểm nhận biết của enzyme *Sal*I. Như vậy, đoạn gen HIV RT p66 trong vector pCR2.1 có đủ các điều kiện thuận lợi như: có mã mở đầu, thông khung đọc từ mã mở đầu, và được giới hạn bởi hai vị trí cắt duy nhất là *Nde*I và *Sal*I. Vector tái tổ hợp pCR HIV-1 RT p66 được cắt bằng *Nde*I, *Sal*I, thu đoạn DNA dài 1680 bp và gắn vào vector pET21(a+) đã được mở vòng bằng *Nde*I và *Sal*I để tạo vector tái tổ hợp pET21(a+)HIV RT p66.

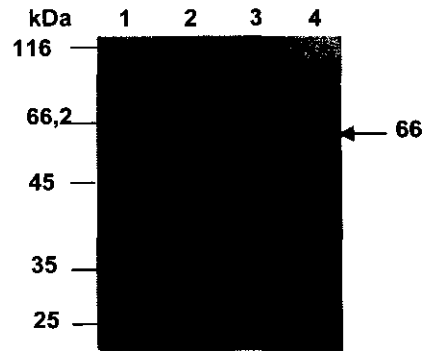
Biến nạp sản phẩm gắn vào chủng *E. coli* DH5α và tiến hành chọn dòng tái tổ hợp. Kết quả cho thấy, tất cả 5 dòng khuẩn đều mang vector tái tổ hợp pET21(a+)HIV-1 RT p66 vì colony-PCR đều dương tính với băng DNA có kích thước 1680 bp khi sử dụng cặp môi HIV P66-*Nde*I-F và HIV RT66-*Sal*I-R. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong khâu gắn gen HIV-1 RT p66 vào vector biểu hiện pET21(a+).

Biểu hiện HIV-1 RT p66 trong chủng Rosetta gamiTM

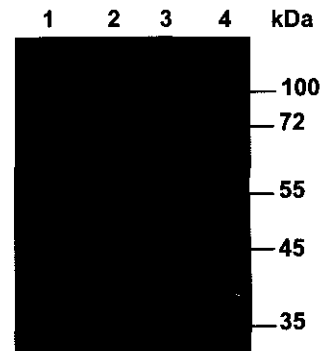
Gen mã hóa cho enzyme phiên mã ngược có tần số xuất hiện của 6 bộ ba mã hiếm (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) là 16,7% do vậy để biểu hiện dư thừa thành công tiểu đơn vị này chúng tôi sử dụng chủng biểu hiện Rosetta-gamiTM vì đây là chủng *E. coli* được thiết kế mã hóa cho 6 mã bộ ba hiếm nêu trên. Các dòng khuẩn *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET21(a+)HIV-1 RT p66 được biểu hiện dưới điều kiện: OD₆₀₀ = 0,6; IPTG là 0,5; 1 mM và ở nhiệt độ 37°C trong 3 h. Sau khi nuôi cấy, tế bào được thu lại và xử lý để kiểm tra protein tổng số.

Kết quả hình 2 cho thấy protein đích đã được biểu hiện. Chủng khuẩn mang vector tái tổ hợp khi cảm ứng với IPTG (giếng 3 và 4) đều xuất hiện băng protein có kích thước khoảng 66 kDa đúng với dự đoán, trong khi đó chủng khuẩn không mang vector tái tổ hợp (giếng số 2) không thấy xuất hiện băng protein này. Tuy nhiên, để có thể tinh sạch và thu được lượng lớn protein đích cần tìm hiểu điều kiện tối ưu cho quá trình biểu hiện. Khi thiết kế vector

biểu hiện, 6 histidine được gắn với protein đích ở phía đầu carboxyl. Dựa vào đặc tính này tiến hành kiểm tra protein đích bằng western blot với kháng thể đơn dòng đặc hiệu với 6 histidine. Hình 3 cho thấy protein đích và đối chứng dương đều có phản ứng dương tính rất đặc hiệu với antihistidine (giếng 1 và 2).



Hình 2. Protein tổng số của chủng *E. coli* mang pET21(a+)HIV-1 RT p66. 1: Thang protein chuẩn; 2: đối chứng âm; 3, 4: *E. coli* cảm ứng bằng IPTG 0,5 mM và 1 mM.



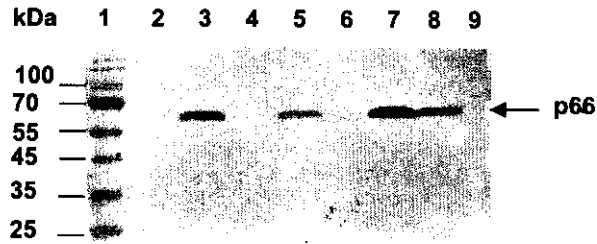
Hình 3. Phân tích Western blot giữa protein đích với kháng thể antihistidine. 1: protein HIV-1 RT p66; 2: Đối chứng dương với antihistidine; 4: đối chứng âm (Rosetta-gamiTM không mang vector biểu hiện); 3: thang protein chuẩn.

Tối ưu điều kiện biểu hiện

Có rất nhiều các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng biểu hiện của protein trong tế bào *E. coli*. Tuy nhiên, các yếu tố như nồng độ IPTG, nhiệt độ nuôi cấy lúc cảm ứng, và thời gian cảm ứng là quan trọng hơn cả. Khi cảm ứng bằng IPTG nồng độ 1 mM và lắc ở nhiệt độ khác nhau (22, 28, 30, và 37°C) sau 5 h, protein

đích đều được biểu hiện nhưng ở nhiệt độ 30°C lượng protein đích được biểu hiện là nhiều hơn cả (Hình 4, giếng số 7). Vì vậy, nhiệt độ này được lựa chọn để nuôi cấy cho việc chuẩn các điều kiện khác.

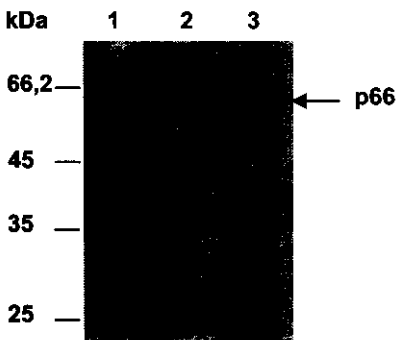
Sau khi khảo sát 3 yếu tố trên, chúng tôi chọn điều kiện tối ưu để biểu hiện protein đích là IPTG 1 mM, nhiệt độ cảm ứng là 30°C (Hình 4) trong 5 h cảm ứng.



Hình 4. Phân tích Western blot để khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự biểu hiện của tiểu đơn vị HIV-RT p66. 1: Thang protein chuẩn, 2, 4, 6, 9: đối chứng âm; 3, 5, 7, 8: *E. coli* cảm ứng ở nhiệt độ 22, 28, 30 và 37°C.

Khảo sát tính tan của tiểu đơn vị HIV-1 RT p66

Vì HIV RT p66 đóng vai trò là một enzyme phiên mã ngược nên hoạt tính của tiểu đơn vị này sau khi tinh sạch là mối quan tâm hàng đầu trong quá trình sắc ký. Hoạt tính của enzyme biểu hiện trong *E. coli* có được duy trì tốt hay không lại phụ thuộc rất nhiều vào trạng thái tồn tại của chúng trong tế bào như dạng tan hay dạng thể vùi.



Hình 5. Kiểm tra tính tan của HIV-1 RT p66. 1: Pha cặn; 2: Thang protein chuẩn; 3: Pha lỏng.

Hình 5 cho thấy protein tái tổ hợp HIV-1 RT p66 khi biểu hiện trong *E. coli* tồn tại ở dạng tan (giếng 3). Đây là điều kiện thuận lợi cho quá trình tinh sạch vì protein sau khi tinh sạch sẽ giữ được phần lớn hoạt tính của enzyme.

KẾT LUẬN

Tách dòng thành công gen mã hóa cho tiểu đơn vị p66 của enzyme phiên mã ngược của virus HIV-1. Trình tự amino acid trong trung tâm hoạt động Y183, D184, D185, M186 và D110 của tiểu đơn vị này không bị thay đổi.

Biểu hiện thành công tiểu đơn vị p66 của enzyme phiên mã ngược trong chủng vi khuẩn *rossetta gami*TM ở điều kiện tối ưu: nồng độ IPTG là 1mM, nhiệt độ cảm ứng 30°C trong thời gian 5 h. Protein này tồn tại ở dạng tan lên rất thuận lợi cho quá trình giữ hoạt tính của enzyme sau khi tinh sạch.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu cơ bản với mã số 614406 giai đoạn 2006 - 2008.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bathurst IC, Moen LK, Lujan MA, Gibson HL, Feucht P H, Pichuantes S, Craik C S, Santi DV, Barr PJ (1990) Characterization of the human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase enzyme produced in yeast. *Biochem Bioph Res Co* 171: 589-595.
- Becerra SP, Kumar A, Lewis MS, Widen SG, Abbotts J, Karawya EM, Hughes SH, Shiloach J, Wilson SH, Lewis MS (1991) Protein-Protein Interactions of HIV-1 Reverse Transcriptase: Implication of Central and C-terminal Regions in Subunit Binding. *Biochemistry* 30: 1707-1719.

Dufour E, Dirani-Diab ER, Boulme F, Fournier M, Nevinsky G, Litvak TL, Litvak S, Andreola LM (1998) p66/p51 and p51/p51 recombinant forms of reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 Interactions with primer tRNA^{Lys}3, initiation of cDNA synthesis, and effect of inhibitors. *Eur J Biochem* 251: 487-495.

Gotte M, Arion D, Parniak MA, Wainberg MA (2000) The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *J Virol* 74: 3579-3585.

Hizi A, McGill C, Hughes SH (1988) Expression of soluble, enzymatically active, human immunodeficiency virus reverse transcriptase in *Escherichia coli* and analysis of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1218-1222.

Hou WE, Prasad R, Beard AW, Wilson HS (2003) High-level expression and purification of untagged and histidine-tagged HIV-1 reverse transcriptase. *Protein Expr Purif* 34: 75-86.

Huang H, Harrison CS, Verdine LG (2000) Trapping of a catalytic HIV reverse transcriptase template:primer complex through a disulfide bond. *Chem Biol* 7: 355-364.

Hughes SH (2001) Molecular matchmaking: NNRTIs can enhance the dimerization of HIV type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6991-6992.

Jonckheere H, Taymans JM, Balzarini J, Velazquez S, Camarasa MJ, Desmyter J, Clercq ED, Anne J (1994) Resistance of HIV-1 reverse transcriptase against [2',

5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)] (TSAO) derivatives is determined by the mutation Glu138-Lys on the p51 subunit. *J Biol Chem* 269: 25255-25258.

Kamer G, Argos P (1984) Primary structural comparison of RNAVOL-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucl Acids Res* 12: 7269-7282.

Mizrahi V, Lazarus GM, Miles LM, Meyers CA, Debouck C (1989) Recombinant HIV-1 reverse transcriptase: purification, primary structure, and polymerase/ribonuclease H activities. *Arch Biochem Biophys* 273: 347-358.

Mulky A, Sarafianos GS, Arnold E, Wu X, Kappes CJ (2004) Subunit-Specific Analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase In Vivo. *J Virol* 78: 7089-7096.

Muller B, Restle T, Weiss S, Gautel M, Sczakiel SG, Goody SR (1989) Co-expression of the Subunits of the Heterodimer of HIV-1 Reverse Transcriptase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264: 13975-13978.

Tachedjian G, Aronson EH, Santos de los M, Seehra J, McCoy MJ, Goff PS (2003) Role of residues in the tryptophan repeat motif for HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J Mol Biol* 326: 381-396.

Thimmig LR, McHenry SC (1993) Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of a functionally and structurally asymmetric dimeric polymerase. *J Biol Chem* 268: 16526-16536.

CLONING AND EXPRESSION OF GENE ENCODING SUBUNIT P66 OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE

Phan Trong Hoang¹, Ngo Van Truong², Le Van Son¹, Le Tran Binh¹, Chu Hoang Ha^{1*}

¹Institute of Biotechnology

²Danang University of Technology

SUMMARY

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) is a heterodimer comprised of two structurally distinct subunits (p51 and p66). RT is translated and assembled into virions as part of a precursor Gag-Pol polyprotein (Pr160Gag-Pol). Proteolytic processing of Pr160Gag-Pol by the pol-encoded protease (PR) generates the heterodimeric RT enzyme (p51/p66). The p66 subunit contains the DNA polymerase and RNase H domains. To express subunit p66 in *E. coli* without using HIV the proteolytic processing protease, we isolated 1680 bp p66 coding region with specific primers: HIV P66-NdeI-F, HIV RT66-SalI-R. This fragment was cloned into pCR2.1 vector and sequenced. P66

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562368; Fax: 84-4-8363144; E-mail: chuhongha@ibt.ac.vn

coding gene is inserted into pET21a(+) (Novagen) and expressed in rosetta-gami™ strain (DE3) codon plus RP under inducing of IPTG. Optimized overexpression of subunit HIV1 RT-p66 in *E. coli* is that final concentration of IPTG was 1 mM and incubation was continued at 30°C for 5h.

Keyword: *Cloning vector, expression vector, HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1), reverse transcriptase-RT, subunit p66, subunit p51*

coding gene is inserted into pET21a(+) (Novagen) and expressed in rosetta-gami™ strain (DE3) codon plus RP under inducing of IPTG. Optimized overexpression of subunit HIV1 RT-p66 in *E. coli* is that final concentration of IPTG was 1 mM and incubation was continued at 30°C for 5h.

Keyword: *Cloning vector, expression vector, HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1), reverse transcriptase-RT, subunit p66, subunit p51*