

Nghiên cứu tạo DNA macroarrays phát hiện nhanh tính kháng thuốc ở vi rút viêm gan B

Development of DNA macroarrays for rapid detection of drug resistance in Hepatitis B virus

Là Thị Quỳnh Như, Phạm Tiến Dũng, Lê Quang Hòa*

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội – Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

Đến Tòa soạn: 29-5-2018; chấp nhận đăng: 18-01-2019

Tóm tắt

DNA macroarrays với 7 mẫu dò kiểu dại và 12 mẫu dò kiểu đột biến đã được thiết kế thành công để phát hiện các kiểu đột biến r1L180M và r1M204V/I, vốn liên quan đến tính kháng Lamivudine; r1A181T/V và r1N236T, vốn liên quan đến tính kháng Adefovir; r1L180M, r1M204V/I, r1T184S/G; r1S202I và r1M250V/I, vốn liên quan đến tính kháng Entecavir ở vi rút viêm gan B (HBV). Để quá trình lai có thể được thực hiện trong ống eppendorf 2 ml, các điều kiện lai đã được tối ưu hóa bao gồm: nhiệt độ lai là 54°C, tốc độ lắc 600 vòng/phút, lượng sản phẩm PCR sử dụng là 20 µl. Với điều kiện lai tối ưu này, 12 đột biến kháng thuốc đều được phát hiện chính xác và không xảy ra hiện tượng dương tính giả do lai chéo. Ưu điểm chủ yếu của quy trình phân tích mới này là nhanh và chỉ yêu cầu các thiết bị đơn giản.

Từ khóa: DNA macroarrays, kháng thuốc, viêm gan B, đột biến, phân tích nhanh

Abstract

DNA macroarrays containing 7 wild-type probes and 12 mutant-type probes were successfully developed to detect common mutations associated with the resistance of Hepatitis B virus (HBV) to Lamivudine (LAM), Adefovir (ADV) and Entecavir (ETV). These mutations include r1L180M and r1M204V/I, associated with LAM resistance; r1A181T/V and r1N236T, associated with ADV resistance; r1L180M, r1M204V/I, r1T184S/G, r1S202I and r1M250V/I, associated with ETV resistance. The optimal conditions for DNA macroarray hybridization in 2-ml eppendorf tubes were: hybridization temperature of 54°C, rotation speed of 600 rpm, amount of PCR product of 20 µl. Under these optimal conditions, all target mutations were accurately detected by DNA macroarrays without false positive problems due to cross-hybridization. The main advantages of this new method, based on DNA macroarrays for detection of drug resistance in HBV, are rapidity and simplicity (no special equipment required).

Keywords: DNA macroarrays, drug resistance, Hepatitis B virus, mutations, rapid detection

1. Đặt vấn đề

Viêm gan B là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở gan do vi rút HBV (Hepatitis B virus) gây ra. Theo một nghiên cứu của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), trong năm 2015, có đến hơn 250 triệu ca mắc viêm gan B mãn tính trên toàn thế giới [1]. Việt Nam là một trong những quốc gia có gánh nặng về bệnh viêm gan B mãn tính trầm trọng nhất trên thế giới với khoảng 8,6 triệu ca [2]. Nếu không được điều trị đúng cách, bệnh viêm gan B mãn tính là nguyên nhân chính gây xơ gan và ung thư gan. Trong năm 2015, HBV là nguyên nhân của gần 900000 ca tử vong trên toàn thế giới [1].

Thuộc họ *Hepadnaviridae* với nhiều đặc tính tương tự một số loại retrovirus, HBV có hệ gen là một phân tử DNA dạng vòng, xoắn kép không hoàn

chỉnh với kích thước khoảng 3,2 kb [3]. Hệ gen này bao gồm 4 khung đọc mở xếp chồng lên nhau mã hóa các kháng nguyên bề mặt, kháng nguyên lõi, kháng nguyên e, protein X và một DNA polymerase có cả hai hoạt tính DNA-dependent DNA polymerase và RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase) để phục vụ quá trình tái bản DNA của vi rút thông qua pgRNA (pregenomic RNA) [3]. Do tần suất sao chép sai của hoạt tính reverse transcriptase là cao (10^{-7} trên mỗi nucleotide trong một ngày) nên ở mỗi bệnh nhân tồn tại một quần thể các loại vi rút có hệ gen liên quan đến nhau nhưng không giống nhau hoàn toàn [4]. Ước tính mỗi ngày có khoảng 10^7 sao chép lỗi trong quá trình tái bản của HBV trong cơ thể người bệnh và một số các biến thể này có thể trở thành các chủng đột biến chiếm đa số dưới tác dụng của áp lực chọn lọc [4].

Hiện nay, để điều trị bệnh viêm gan B mãn tính, có thể sử dụng liệu pháp điều trị bằng chất tương tự nucleoside/nucleotide (NA) hoặc liệu pháp IFN α (cụ

* Địa chỉ liên hệ: Tel.. (+84) 912.361.276

Email. hoa.lequang@hust.edu.vn

thể PegIFN α). Ưu điểm chính của liệu pháp sử dụng PegIFN α là cho phép kích hoạt hệ thống miễn dịch của người bệnh nhằm kiểm soát sự nhân lên của vi rút ngay cả khi đã ngừng sử dụng thuốc. Tuy nhiên, liệu pháp này có nhiều điểm hạn chế như tỷ lệ đáp ứng thuốc thấp, gây nhiều hiệu ứng phụ và có giá thành cao [5]. Do vậy, ở nước ta hiện nay, NA được sử dụng chủ yếu để điều trị bệnh viêm gan B mãn tính do khả năng đáp ứng thuốc rất tốt của liệu pháp này. Tuy nhiên, hạn chế chủ yếu của liệu pháp này là nguy cơ xuất hiện các đột biến kháng thuốc sau một thời gian sử dụng. Cho đến nay, nhiều đột biến kháng NA đã được phát hiện bao gồm: rL180M, rM204V/I liên quan đến tính kháng Lamivudine; rA181T/V, rN236T liên quan đến tính kháng Adefovir, rL180M, rM204V/I, rT184S/G; rS202I; rM250V/I liên quan đến tính kháng Entecavir [6].

Để phát hiện tính kháng thuốc NA ở HBV, hai loại phương pháp thường được sử dụng hiện nay là phương pháp giải trình tự và phương pháp lai ngược (reverse hybridization) dựa trên sinh phẩm thương mại INNO-LiPA. Hạn chế chủ yếu của của phương pháp giải trình tự là yêu cầu trang thiết bị đặc thù và kỹ năng phân tích tin sinh học kết quả giải trình tự. Mặt khác, giải trình tự không cho phép phát hiện các đột biến mới xuất hiện với tần số thấp trong quần thể HBV [7]. Bộ sinh phẩm thương mại INNO-LiPA cho phép giải trình tự được các hạn chế trên nhưng vẫn có mức giá sinh phẩm và thiết bị cao. Cũng có ưu điểm là phát hiện được nhiều đột biến trong cùng một phép thử, DNA microarrays còn giúp giảm giá thành của phép phân tích đặc biệt khi số lượng đột biến cần phát hiện là lớn [8]. Mục tiêu của nghiên cứu này là phát hiện DNA microarrays cho phép phát hiện các đột biến thường gặp liên quan đến tính kháng Lamivudine, Adefovir và Entecavir với các thiết bị đơn giản, phù hợp với điều kiện Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Plasmid chứa vùng gen kiểu đại và các oligonucleotide kiểu đột biến gắn biotin

Vùng gen kiểu đại được khuếch đại từ mẫu DNA thể gen của HBV bằng PCR với cặp mồi Inno-HBV-F (5'-CGTGGTGGACTTCTCAATTTC-3'); và Inno-HBR (5'-AGAAAGCCCTTGAAGT-TGGCGA-3'), sau đó được tách dòng vào vectơ pJET1.2 rồi được giải trình tự để kiểm tra tính tương hợp với các mẫu dò kiểu đại được thiết kế. Để kiểm tra khả năng phát hiện các kiểu đột biến, 12 oligonucleotide có trình tự bắt cặp bổ sung với các mẫu dò kiểu đột biến được tổng hợp hóa học và được đánh dấu biotin ở đầu 3'.

2.2. PCR bắt đối

Để tạo DNA kiểu đại lai với DNA microarrays, kỹ thuật PCR bắt đối được sử dụng với thể tích phân

ứng là 50 μ l bao gồm các thành phần: 50 hoặc 1000 phần trăm plasmid DNA kiểu đại và 25 μ l GoTaq Q Colorless Master Mix 2X; 2,5 pmol mỗi mẫu Inno-HBV-F; 50 pmol mỗi ngược Inno-HBR-Biotin (trình tự như ở trên nhưng được biến đổi biotin ở đầu 5'). Chương trình nhiệt của phản ứng như sau: 95 $^{\circ}$ C, 3 phút; 50 chu kỳ (95 $^{\circ}$ C, 30 giây; 53 $^{\circ}$ C, 30 giây; 72 $^{\circ}$ C, 50 giây); 72 $^{\circ}$ C, 2 phút.

2.3. Cố định mẫu dò lên màng nylon

Màng Amersham Hybond-N (GE Healthcare) được cắt thành các mảnh nhỏ kích thước 2,0 \times 1,2 cm và được chia đều thành 3 cột \times 5 hàng tương đương với 15 điểm cố định. Sau đó, dùng pipet để chấm 0,2 μ l các mẫu dò lên từng vị trí (Hình 1). Bảy mẫu dò kiểu đại được trộn với nhau để đạt nồng độ cuối của mỗi mẫu dò là 5 μ M trước khi được chấm lên vị trí số 1 trên màng. Các mẫu dò kiểu đột biến được pha loãng trong đệm TE về nồng độ 10 μ M và được chấm riêng rẽ lên 12 vị trí khác nhau trên màng. Oligonucleotide (T) $_{20}$ gắn biotin ở đầu 3' (2 μ M) được chấm lên màng ở 2 vị trí còn lại để làm kiểm chứng. Sau khi chấm mẫu, màng được sấy ở 80 $^{\circ}$ C trong 2 tiếng để cố định mẫu dò và bảo quản ở nhiệt độ phòng trong túi nhôm hàn kín có gói hút ẩm.

2.4. Phương pháp lai và hiển thị kết quả

Quy trình lai bao gồm các bước sau: màng được lai sơ bộ trong 30 phút trong ống eppendorf 2 ml chứa 1,2 ml dung dịch đệm lai SSPE 5X (0,75M NaCl; 50 mM NaH $_2$ PO $_4$, 5mM EDTA, pH 7,4) được bổ sung thêm 0,1% SDS trên thiết bị ThermoMixer (Eppendorf) ở nhiệt độ lai là 54 $^{\circ}$ C. Sau đó, dịch tiễn lai được thay thế bằng 1,2 ml đệm lai mới. Sản phẩm PCR bắt đối (20 μ l) hoặc các oligonucleotide gắn biotin được biến tính ở 95 $^{\circ}$ C trong 5 phút trước khi được bổ sung vào ống lai. Quá trình lai diễn ra trong 1 giờ với tốc độ lắc là 600 vòng/phút. Tiếp theo, màng lai được rửa hai lần ở nhiệt độ lai là 54 $^{\circ}$ C, mỗi lần 15 phút bằng 2 ml đệm lai mới. Sau đó, các màng lai được chuyển vào cốc hiện màu chứa 10 ml dung dịch blocking (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20, 1% Blocking Reagent (Roche)) và lắc 300 vòng/phút trên ThermoMixer. Sau 30 phút blocking, bổ sung 3 μ l cộng hợp Streptavidin Alkaline Phosphatase (Promega) và tiếp tục ủ lắc trong 30 phút. Sau đó, các màng được rửa 3 lần (mỗi lần 10 phút) bằng 20 ml đệm TBS (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20) trước khi được hiện màu bằng cơ chất NBT/BCIP (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng hiện màu được dừng bằng dung dịch EDTA 100 mM. Để tối ưu hóa quy trình lai, các thông số sau đã được biến đổi: nhiệt độ lai từ 52 đến 56 $^{\circ}$ C, tốc độ lắc từ 0 đến 900 vòng/phút, lượng sản phẩm PCR sử dụng trong phản ứng lai từ 5 đến 50 μ l.

2.5. Phương pháp tin sinh học

Trình tự gen kiểu dại và kiểu đột biến được lấy từ ngân hàng GenBank Tm được tính bằng phần mềm trực tuyến tại <http://biophysics.idtdna.com/>.

3. Kết quả và thảo luận

Một quy trình phân tích hoàn chỉnh tính kháng thuốc của HBV từ mẫu huyết thanh, huyết tương của người bệnh dựa trên kỹ thuật DNA macroarrays sẽ bao gồm 3 giai đoạn chính sau: (i) tách chiết DNA vi rút từ mẫu bệnh phẩm; (ii) khuếch đại vùng gen đích bằng kỹ thuật PCR bất đối; (iii) lai sản phẩm PCR với màng DNA macroarrays được cố định các mẫu dò phát hiện các kiểu đột biến liên quan đến tính kháng thuốc của HBV. Trong bài báo này, chúng tôi tập trung trình bày các kết quả nghiên cứu liên quan đến việc tạo màng DNA macroarrays và tối ưu hóa các điều kiện của phản ứng lai phân tử vốn là giai đoạn quyết định tính chính xác của quy trình phân tích.

3.1. Thiết kế mẫu dò

Cũng giống như các phương pháp dựa trên phản ứng lai phân tử khác, mẫu dò trong kỹ thuật DNA macroarrays có vai trò trung tâm quyết định độ đặc hiệu, độ nhạy của quy trình phân tích. Trong nghiên cứu này, chiến lược thiết kế các mẫu dò ngắn (độ dài: 13-19 nucleotide) đã được sử dụng. So với mẫu dò dài, chiến lược này có 2 ưu điểm sau: (i) hạn chế phải thiết kế nhiều biến thể mẫu dò cho các đột biến đồng nghĩa; (ii) sai khác một nucleotide sẽ ảnh hưởng lớn hơn đến độ bền của sản phẩm lai không đặc hiệu. Bên cạnh đó, để hạn chế số lượng mẫu dò phải thiết kế, trình tự các mẫu dò được thiết kế theo các kiểu gen B và C vốn là các kiểu gen phổ biến nhất tại Việt Nam hiện nay [9]. Để đảm bảo khả năng lai đồng đều, các mẫu dò được thiết kế sao cho Tm của chúng dao động trong khoảng từ 55 đến 60°C với các thông số nồng độ mẫu dò và trình tự đích đều là 0,2 μ M và nồng độ Na⁺, K⁺ là 800 mM vốn là nồng độ Na⁺ của dung dịch 5X SSPE được dùng trong quá trình lai). Cuối cùng, với mỗi đột biến cần phát hiện, chúng tôi đều thiết kế thêm các mẫu dò kiểu dại tương ứng. Điều này giúp hạn chế phản ứng chéo của DNA kiểu dại của HBV với mẫu dò kiểu đột biến do vậy giúp đảm bảo độ đặc hiệu của quy trình phân tích. Để đảm bảo khả năng cố định của các mẫu dò trên màng nylon, đuôi poly(T)₂₀ được thêm vào đầu 5' của mỗi trình tự mẫu dò. Kết quả thiết kế các mẫu dò kiểu dại và mẫu dò kiểu đột biến để phát hiện các đột biến rT180M, rA181T/V, rT184S/G; rS2021; rM204V/I; rN236T; rM250V/I liên quan đến tính kháng Lamivudine, Adefovir và Entecavir được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2. Tổng cộng có 7 mẫu dò kiểu dại và 12 mẫu dò kiểu đột biến đã được thiết kế. Tm bất cặp đúng của 19 mẫu dò này là dao động trong khoảng từ 55,3

đến 60,1°C. Các sai khác về Tm (Δ Tm) giữa phản ứng lai đặc hiệu và phản ứng lai chéo của các mẫu dò kiểu dại là dao động trong khoảng từ 4,3 đến 15,7°C. Trong khi đó, đối với các mẫu dò kiểu đột biến, các giá trị này biến thiên trong khoảng từ 5,7 đến 22,7°C. Giá trị Δ Tm càng lớn thì phản ứng lai càng đặc hiệu và càng dễ lựa chọn nhiệt độ lai phù hợp với tất cả các mẫu dò.

3.2. Tối ưu điều kiện lai trong ống eppendorf 2 ml

Quy trình lai DNA macroarrays thường được thực hiện trong các lò lai chuyên dụng, có giá thành cao mà không phải bất cứ phòng thí nghiệm tại Việt Nam cũng được trang bị. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu điều kiện lai để có thể thực hiện quá trình lai trong ống eppendorf 2 ml trên các bề ổn nhiệt khô. Để có thể vừa được ống eppendorf 2 ml, chúng tôi đã thiết kế màng DNA macroarrays có kích thước 1,2 cm x 2,0 cm với 15 điểm cố định các mẫu dò được chia làm 3 cột (Hình 1). Do tổng số lượng mẫu dò là 19 và mục đích của nghiên cứu là phát hiện các kiểu đột biến nên toàn bộ các mẫu dò kiểu dại đã được trộn theo cùng tỷ lệ số mol thành một hỗn hợp duy nhất để cố định lên màng tại vị trí số 1. Bên cạnh đó, để kiểm tra quá trình hiển thị tín hiệu lai và xác định vị trí các mẫu dò, oligonucleotide (T)₂₀ gắn biotin ở đầu 3' đã được cố định tại 2 vị trí bất đối xứng CT trên màng (Hình 1). Các mẫu dò kiểu đột biến được cố định vào 12 vị trí còn lại.

3.2.1. Tối ưu nhiệt độ lai

Nhiệt độ lai có ảnh hưởng quyết định đến độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng lai. Nhiệt độ lai thấp sẽ làm giảm độ đặc hiệu trong khi nhiệt độ lai quá cao sẽ giảm cường độ tín hiệu lai. Như đã nói ở trên, mục tiêu của nghiên cứu này là phát hiện các dạng đột biến nên cần loại bỏ các phản ứng lai chéo của DNA HBV kiểu dại với các mẫu dò kiểu đột biến. Các kết quả lai của mẫu DNA HBV kiểu dại với màng DNA macroarrays ở các nhiệt độ 52, 54 và 56°C cho thấy ở tất cả các nhiệt độ lai thử nghiệm, vị trí mẫu dò kiểu dại đều cho tín hiệu rõ có thể quan sát bằng mắt thường (Hình 1). Tuy nhiên, nhiệt độ lai càng cao thì cường độ tín hiệu càng giảm. Ở nhiệt độ lai 52°C, xuất hiện tín hiệu lai không đặc hiệu tại các vị trí mẫu dò 180L-M, 181A-T, 184T-S1, 202S-I, 204M-V, 204M-I, 236N-T, 250M-V và 250M-I Ở các nhiệt độ lai 54 và 56°C, hiện tượng lai chéo này được loại bỏ triệt để. Từ đây, chúng tôi đã lựa chọn 54°C là nhiệt độ lai cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Tối ưu tốc độ lắc

Trong các lò lai phân tử truyền thống, các ống lai được quay tròn một cách liên tục giúp các phân tử DNA trong dung dịch được phân bố đều trên màng mặc dù dịch lai không ngập hết màng. Điều này giúp

giảm thể tích của phản ứng lại, tăng nồng độ của DNA đích kết quả là giúp tăng độ nhạy. Ở trong nghiên cứu này, thể tích của phản ứng lại thực hiện trong ống eppendorf 2 ml đã được giảm xuống chỉ còn 1,2 ml để đảm bảo màng luôn nằm trong dung dịch lại. Câu hỏi được đặt ra ở đây là liệu có cần thực hiện quá trình đảo trộn nữa hay không. Để trả lời câu hỏi này, chúng tôi đã thử nghiệm phản ứng lại trong các điều kiện không khuấy trộn và có khuấy trộn trên máy ổn nhiệt có lắc ThermoMixer (Eppendorf) ở các tốc độ 0, 300, 600 và 900 vòng/phút. Kết quả lại (Hình 2) cho thấy cường độ tín hiệu lại đạt mức cao nhất khi tốc độ lắc là 600 vòng/phút. Ở tốc độ 900 vòng/phút, cường độ tín hiệu lại bị giảm có thể là do tác động phối hợp của tác động cơ học và nhiệt độ lại cao đã làm giảm hiệu quả của phản ứng lại.

3.2.3. Tối ưu lượng sản phẩm PCR sử dụng trong phản ứng lại

Để giảm chi phí cho bước khuếch đại vùng gen đích bằng PCR nhưng vẫn đảm bảo độ nhạy của phản ứng lại, lượng sản phẩm PCR sử dụng trong một phản ứng lại đã được tối ưu hóa. Một cách cụ thể, 6 phản ứng PCR với nồng độ khuôn ở mức cận ngưỡng là 50 phiên bản/phản ứng đã được thực hiện và sản phẩm của các phản ứng này được trộn lại thành một hỗn hợp duy nhất để sử dụng trong các phản ứng lại với các thể tích sản phẩm PCR dao động từ 5 đến 50 μ l. Kết quả lại (Hình 3) cho thấy lượng sản phẩm PCR sử dụng càng nhiều thì cường độ tín hiệu lại thu được càng mạnh và không xuất hiện phản ứng lại chéo ngay cả khi sử dụng 50 μ l sản phẩm PCR. Tuy nhiên, giữa hai thể tích 20 và 50 μ l sản phẩm PCR được sử dụng, sự gia tăng cường độ tín hiệu là không đáng kể. Do vậy, lượng sản phẩm PCR sử dụng trong phản ứng lại cho các thí nghiệm tiếp theo được cố định ở mức 20 μ l.

Bảng 1. Trình tự và đặc tính nhiệt động học của các mẫu dò kiểu đại

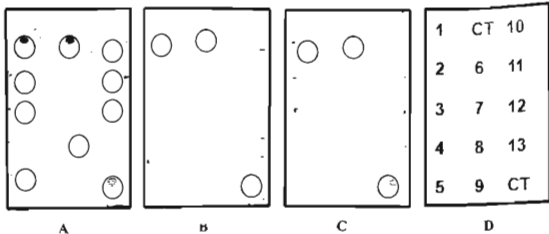
STT	Tên mẫu dò	Trình tự mẫu dò (5'-3')	Tm bắt cặp đúng (°C)	Tm bắt cặp với các kiểu đột biến (°C)	ΔT_m (°C)
1	180L	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGCTCA	60,1	46,6	13,5
2	181A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGCTCAGT	59,7	44,0 - 49,3	10,4 - 15,7
3	184T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGCTCAGT	57,2	41,5 - 50,8	6,4 - 15,7
4	202S	TTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTTTCAGTTATATGG	55,7	49,2	6,5
5	204M	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGCTCAGT	55,9	47,3 - 49,9	6,0 - 8,6
6	236N	TTTTTTTTTTTTTTTTTTACATTTGACCCCTAA	55,3	51,0	4,3
7	250M	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTTTCATGGGATAT	56,5	47,9 - 48,3	8,2 - 8,6

Chú thích: Trình tự mẫu dò được viết hoa; đuôi poly(T)₂₀ viết thường; các vị trí xảy ra đột biến được gạch chân

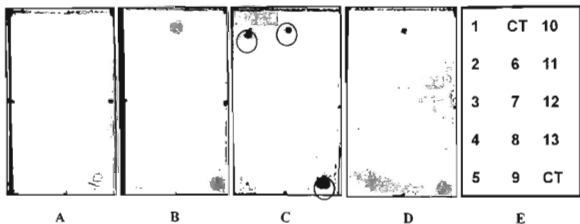
Bảng 2. Trình tự và đặc tính nhiệt động học của các mẫu dò kiểu đột biến

STT	Tên mẫu dò	Trình tự mẫu dò	Tm bắt cặp đúng (°C)	Tm bắt cặp với kiểu đại (°C)	ΔT_m (°C)
1	180L-M	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGCTCA	57,3	51,6	5,7
2	181A-T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGACTCAGTT	59,9	49,8	10,1
3	181A-V	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGTTTCAGTT	57,9	51,1	6,8
4	184T-S1	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGCTCAGT	58,0	49,4	8,6
5	184T-S2	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGCTCAGT	57,2	51,2	6,0
6	184T-G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGNAGTGC	57,2	34,5	22,7
7	202S-I	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTTCATTTATATGG	57,3	50,1	7,2
8	204M-V	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGTTCAGTT	57,1	48,7	8,4
9	204M-I	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGGTTCAGTT	56,0	43,7	12,3
10	236N-T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTACATTTGACCCCTAA	58,0	44,2	13,8
11	250M-V	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTTTCATGGGATAT	59,6	52,2	7,4
12	250M-I	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTTTCATGGGATATA	55,4	48,2	7,2

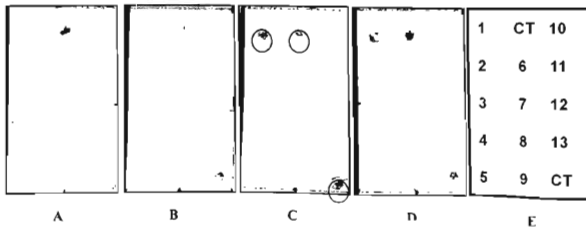
Chú thích: Trình tự mẫu dò được viết hoa; đuôi poly(T)₂₀ viết thường; các vị trí xảy ra đột biến được gạch chân



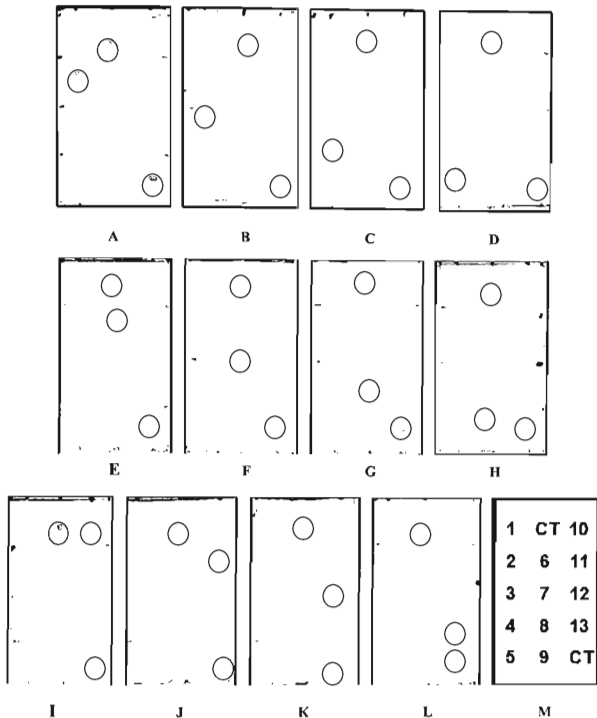
Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ đặc hiệu của phản ứng lai giữa DNA HBV kiểu đại với các mẫu dò. A: 52°C; B: 54°C; C: 56°C; D: vị trí các mẫu dò, 1: hỗn hợp mẫu dò kiểu đại; 2: 180L-M; 3: 181A-T; 4: 181A-V; 5: 184T-S1; 6: 184T-S2; 7: 184T-G; 8: 202S-I; 9: 204M-V; 10: 204M-I; 11: 236N-T; 12: 250M-V; 13: 250M-I; CT: (T)₂₀-Biotin.



Hình 2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến cường độ tín hiệu của phản ứng lai giữa DNA HBV kiểu đại với các mẫu dò. A: 0 vòng/phút; B: 300 vòng/phút; C: 600 vòng/phút; D: 900 vòng/phút; E: vị trí các mẫu dò như ở Hình 1.



Hình 3. Ảnh hưởng của lượng sản phẩm PCR sử dụng đến cường độ tín hiệu của phản ứng lai giữa DNA HBV kiểu đại với các mẫu dò. A: 5 µl; B: 10 µl; C: 20 µl; D: 50 µl; E: vị trí các mẫu dò như ở Hình 1.



Hình 4. Độ đặc hiệu của phản ứng lai giữa DNA của các kiểu đột biến với các mẫu dò. A: 180L-M; B: 181A-T; C: 181A-V; D: 184T-S1; E: 184T-S2; F: 184T-G; G: 202S-I; H: 204M-V; I: 204M-I; J: 236N-T; K: 250M-V; L: 250M-I; M: vị trí các mẫu dò như ở Hình 1

3.3. Xác định độ đặc hiệu của DNA macroarrays phát hiện các kiểu đột biến liên quan đến tính kháng thuốc của HBV

Các kết quả nghiên cứu trình bày ở trên đã cho thấy quy trình lai DNA macroarrays cho phép phát hiện chính xác kiểu đại của HBV tại tất cả các vị trí có thể xảy ra đột biến kháng thuốc. Câu hỏi được đặt ra ở đây là liệu quy trình lai đã được tối ưu này có

cho phép phát hiện các đột biến liên quan đến tính kháng thuốc hay không. Để trả lời câu hỏi này, chúng tôi đã sử dụng các oligonucleotide được biến đổi biotin ở đầu 3' và có trình tự bắt cặp bổ sung với các mẫu dò kiểu đột biến cần phát hiện để thực hiện phản ứng lai với DNA macroarrays trong điều kiện lai đã được xây dựng. Các kết quả lai (Hình 4) cho thấy các tín hiệu lai thu nhận được đều có tính đặc hiệu cao và hoàn toàn không xảy ra phản ứng lai chéo giữa DNA

đích với mẫu dò kiểu dại và các mẫu dò kiểu đột biến khác. Cường độ tín hiệu thu nhận được ở các mẫu dò khá đồng đều, hoàn toàn có thể quan sát được bằng mắt thường. Các kết quả thử nghiệm độ nhạy của quy trình PCR kết hợp với lai (không được trình bày ở đây) cho thấy ngưỡng phát hiện của các mẫu dò kiểu dại và kiểu đột biến là nằm trong khoảng từ 5-50 phiên bản/phản ứng PCR, hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu phát hiện tính kháng thuốc của HBV trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế được bộ mẫu dò cho phép phát hiện được các kiểu đột biến liên quan đến tính kháng thuốc Lamivudine, Adefovir và Entecavir của HBV. Các điều kiện lai trong ống eppendorf 2 ml cũng đã được tối ưu giúp đơn giản hóa được quy trình phân tích. Ưu điểm của quy trình phân tích đã xây dựng là thời gian phân tích nhanh, không yêu cầu thiết bị phức tạp và đây là hệ thống phân tích mới có thể được bổ sung thêm các mẫu dò phát hiện các kiểu đột biến mới nếu cần.

Lời cảm ơn

Tập thể tác giả trân trọng cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo đã cấp kinh phí thực hiện nghiên cứu này (mã số đề tài B2015-01-109).

Tài liệu tham khảo

[1] WHO, Global hepatitis report (2017).

- [2] <http://www.wpro.who.int/vietnam/topics/hepatitis/factsheet/vi/>
- [3] T.J. Liang, Hepatitis B: The Virus and Disease, Hepatology. 49 (2009) 13-21.
- [4] S. Locarnini, Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis, J Hepatol. 39 (2003) 124-132.
- [5] European Association for the Study of the Liver, EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection, J Hepatol. 67 (2017) 370-398.
- [6] J. Fan, Y. Zhang, H. Xiong, Y. Wang, X. Guo, Nucleotide analogue-resistant mutations in hepatitis B viral genomes found in hepatitis B patients. J Gen Virol. 96 (2015) 663-670.
- [7] T. Shaw, A. Bartholomeusz, S. Locarnini, HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation, J Hepatol. 44 (2006) 593-606.
- [8] Y.P. Yang, N. Corley, J. Garcia-Heras, Reverse dot-blot hybridization as an improved tool for the molecular diagnosis of point mutations in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency, Mol Diagn. 6 (2001) 193-199.
- [9] T.T.T. Bui, T.T. Tran, M.N. Nghiem, P. Rahman, T.T.T. Tran, M.N.H. Dinh, M.H. Le, V.V.C. Nguyen, G. Thwaites, M. Rahman, Molecular characterization of hepatitis B virus in Vietnam, BMC Infect Dis. 17 (2017) 601.