

Nghiên cứu chế tạo mẫu chuẩn RNA bền với nucleases dùng trong định lượng virút viêm gan C

Nguyễn Minh Tuấn^{1,2}, Nguyễn Thị Lệ Thủy¹, Thượng Thị Thu Thủy¹, Nguyễn Ngọc Lệ³, Nguyễn Mạnh Kiên³, Lê Quang Trí³, Nguyễn Bảo Toàn⁴, Tatyana Ilinichna⁵, Phạm Thị Kim Trâm¹, Nguyễn Hoàng Chương⁶, Nguyễn Đăng Quân^{1*}

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Bách khoa TP Hồ Chí Minh

³Bệnh viện Quân y 7A

⁴Trung tâm Y khoa MEDIC, TP Hồ Chí Minh

⁵Đại học Sechenov, Liên bang Nga

⁶Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 31/3/2021; ngày chuyển phản biện 8/4/2021; ngày nhận phản biện 18/5/2021; ngày chấp nhận đăng 25/5/2021

Tóm tắt:

Chứng dương (hay mẫu chuẩn) là thành phần không thể thiếu trong các xét nghiệm sinh học phân tử ứng dụng trong định lượng axit nucleic mục tiêu. Mẫu chuẩn thường được sử dụng phổ biến nhất là plasmid DNA, cDNA hay RNA trần với đặc tính kém bền và dễ bị phân hủy bởi các enzyme phân cắt axit nucleic tồn tại trong môi trường, vì vậy có thể ảnh hưởng tới độ chính xác của kết quả định lượng. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả thiết kế và tạo mẫu chuẩn có bản chất là một vùng trình tự RNA của virút viêm gan C (HCV) được đóng gói trong protein vỏ của thực khuẩn thể MS2 bằng công nghệ thiết kế armored RNA. Vùng trình tự không mã hóa 5'UTR của HCV được khuếch đại và tạo dòng vào plasmid BH20. Armored RNA HCV (AR-HCV) được cảm ứng biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) bằng bổ sung chất cảm ứng IPTG. AR-HCV được thu nhận bằng siêu ly tâm tỷ trọng sucrose, tinh sạch bằng cột sắc ký lọc gel Superdex 75 và được xác định nồng độ, đánh giá sự hình thành cấu trúc đóng gói virút bằng quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả đánh giá độ bền khi xử lý với đồng thời 2 enzyme DNase và RNase cho thấy AR-HCV có khả năng kháng các nucleases. Ngoài ra, AR-HCV duy trì được tính ổn định ở các điều kiện và thời gian bảo quản khác nhau. Khắc phục được hạn chế của các loại chất chuẩn khác, AR-HCV có thể bổ sung trực tiếp vào mẫu, giúp kiểm soát và đảm bảo độ chính xác của toàn bộ quy trình định lượng HCV.

Từ khóa: armored RNA, HCV, kháng nucleases, thực khuẩn thể MS2.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Viêm gan C là một bệnh lây nhiễm gây ra bởi virút viêm gan C (HCV - hepatitis C virus). Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) năm 2015, trên toàn thế giới có khoảng 71 triệu người nhiễm HCV mạn tính, xấp xỉ 399.000 người tử vong do viêm gan C, chủ yếu do xơ gan và ung thư tế bào gan [1]. Ở Việt Nam, tỷ lệ nhiễm viêm gan C vào khoảng 1-2,9% dân số [2]. Hiện nay, chưa có vaccine phòng ngừa HCV hiệu quả nên chẩn đoán chính xác và điều trị là phương pháp duy nhất giúp loại bỏ HCV và ngăn ngừa sự lây truyền HCV trong cộng đồng [3]. Trong điều trị bệnh viêm gan C, lượng HCV trong máu là một yếu tố quan trọng cần được xác định để đưa ra phác đồ điều trị, thời gian điều trị và tiên lượng đáp ứng thuốc điều trị. Phương pháp chủ yếu để định lượng HCV trong máu hiện nay là real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), hay còn gọi là quantitative PCR (qPCR).

Phương pháp real-time PCR sử dụng DNA hoặc RNA

làm mẫu chuẩn để xác định tải lượng virút có trong mẫu xét nghiệm. Việc sử dụng các DNA và RNA trần có nhược điểm là chúng dễ bị phân hủy trong môi trường có chứa các enzyme phân huỷ nuclease (bao gồm DNase và RNase), dẫn đến sai lệch trong kết quả định lượng [4]. Ngoài ra, việc sử dụng mẫu chuẩn là cDNA, RNA hay plasmid trong các bộ kit thương mại thường không kiểm soát được độ chính xác của toàn bộ quy trình do bỏ qua hiệu suất của bước tách chiết RNA, hiệu suất phiên mã, dẫn đến kết quả định lượng có thể sai lệch so với thực tế. Công nghệ armored RNA (hay armored DNA) ra đời giúp khắc phục nhược điểm này. Armored RNA là một thể giống virút bao gồm trình tự RNA của tác nhân cần định lượng được đóng gói trong protein vỏ của thực khuẩn thể (bacteriophage). Chính vì thế armored RNA có thể kháng lại sự phân hủy bởi nuclease có trong môi trường, giúp đảm bảo độ chính xác của xét nghiệm [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện tạo mẫu chuẩn HCV dùng trong định lượng HCV bằng công nghệ armored RNA.

*Tác giả liên hệ: Email: ndquan.snn@tphcm.gov.vn

Preparation of nuclease-resistant RNA standard for hepatitis C virus quantification

Minh Tuan Nguyen^{1,2}, Thi Le Thuy Nguyen¹,
Thi Thu Thuy Thuong¹, Ngoc Le Nguyen³,
Manh Kien Nguyen³, Quang Tri Le³, Bao Toan Nguyen⁴,
Tatyana Ilinichna⁵, Thi Kim Tram Pham¹,
Hoang Chuong Nguyen⁶, Dang Quan Nguyen^{1*}

¹Biotechnology Centre of Ho Chi Minh city

²Ho Chi Minh city University of Technology

³7A Military Hospital

⁴MEDIC Medical Centre, Ho Chi Minh city

⁵Sechenov University, Russia

⁶University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh city

Received 31 March 2021; accepted 25 May 2021

Abstract:

Positive control (or standard) is an indispensable ingredient in molecular biology assays widely used for the quantification of nucleic acid. The commonly used standards are plasmid DNA, cDNA, or naked RNA, which are unstable and easily degraded by nucleases in the surrounding environment; this might affect the accuracy of quantitative results. In this study, the authors designed and created a positive control for the hepatitis C virus (HCV) quantification based on armored RNA technology. The 5'UTR non-encoding sequence of HCV was cloned into the BH20 plasmid. Armored RNA HCV (AR-HCV) was induced for expression in the *E. coli* BL21 (DE3) by the addition of an IPTG inducer. AR-HCV was collected by sucrose density gradient ultracentrifugation followed by gel filtration chromatography using Superdex 75 column. Created AR-HCV was determined the concentration and examined the formation of pseudo viral particles by transmission electron microscopy (TEM). Stability assessment of AR-HCV to DNase and RNase treatment simultaneously has demonstrated its ability to resist these nucleases. Moreover, AR-HCV is stable over time and storage conditions. Strikingly, AR-HCV can be directly added to the specimen, allowing better and more accurate control of the whole quantitative procedure of HCV.

Keywords: armored RNA, HCV, MS2 phage, nuclease resistance.

Classification number: 3.5

Đối tượng và phương pháp

Thiết kế môi và mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho HCV

Trình tự bộ gen HCV của 24 chủng đại diện cho các genotype, subtype khác nhau (bảng 2) được tham khảo và tải về từ cơ sở dữ liệu HCV (<https://hcv.lanl.gov/content/index>) và Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Vùng trình tự nucleotide bảo tồn giữa các genotype được lựa chọn bằng phần mềm BLAST. Trên vùng trình tự bảo tồn (vùng 5'UTR), môi và mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho HCV được thiết kế bằng phần mềm Primer-BLAST. Cặp môi dùng cho định lượng AR-HCV (môi HCV-F và HCV-R) có khả năng khuếch đại đoạn trình tự có kích thước 237-240 bp, tùy theo genotype. Cặp môi để thiết kế AR-HCV (môi 5'UTRHindIII-F và 5'UTRHindIII-R) có trình tự tương tự như môi HCV-F và HCV-R, có gắn thêm trình tự của enzyme cắt giới hạn HindIII và 3 nucleotide phía trước ở đầu 5' trên mỗi môi, tạo sản phẩm khuếch đại có chiều dài 255 bp. Các đoạn oligonucleotide đã thiết kế được kiểm tra các đặc tính kỹ thuật bằng phần mềm AmplifX để đảm bảo hoạt động tốt cho khuếch đại trình tự mục tiêu. Cuối cùng, các oligonucleotide này được kiểm tra tính đặc hiệu lý thuyết bằng phần mềm Primer-BLAST để đảm bảo chúng chỉ bắt cặp đặc hiệu vào bộ gen HCV trên vùng gen đã thiết kế. Các môi và mẫu dò đã thiết kế được đặt tổng hợp bởi Công ty IDT. Trình tự môi và mẫu dò thiết kế được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi và mẫu dò thiết kế dùng trong nghiên cứu.

Môi/Mẫu dò	Trình tự (5'-3')
HCV-F	CACGCAGAAAGCGYCTAGCCATG
HCV-R	CCCTATCAGGCAGTACCACAAGGC
5'UTRHindIII-F	TTTAAGCTTCACGCAGAAAGCGYCTAGCCATG
5'UTRHindIII-R	GCAAAGCTTCCCTATCAGGCAGTACCACAAGGC
HCV probe	FAM 5'-TAGCCGAGTAGYGTGGGTCGCGAAAGGC -3' TAMRA

Khuếch đại trình tự mục tiêu, tạo plasmid tái tổ hợp pAU2-HCV để tạo mẫu chuẩn armored RNA-HCV (AR-HCV)

RNA của HCV được tách chiết từ mẫu máu của bệnh nhân dương tính HCV bằng GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Fisher Scientific). RNA sau khi tách chiết được phiên mã ngược thành cDNA bằng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) với các bước ủ lần lượt 5 phút ở 25°C, 60 phút ở 42°C và 5 phút ở 70°C. Sau đó cDNA được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Trình tự mục tiêu được khuếch đại bằng PCR với cặp môi HCV-F và HCV-R đã được thiết

kết với chu kỳ nhiệt: 2 phút ở 94°C; tiếp theo với 30 chu kỳ gồm các bước: 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 61°C, 30 giây ở 72°C; cuối cùng ổn định phản ứng kéo dài (extention) trong 5 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%) nhuộm bằng GelRed và được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rồi được cắt bằng enzyme HindIII (Thermo Fisher Scientific) ở 37°C trong 3 giờ. Sản phẩm PCR sau khi cắt được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).

Plasmid BH20 được mua từ ngân hàng chủng vi sinh vật của Bỉ (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organism - BCCM). Plasmid BH20 chuyên dụng cho thiết kế AR, mang trình tự gen A mã hóa cho protein tập hợp (assembly protein) và protein vỏ (coat) của MS2 bacteriophage giúp cho sự đóng gói tạo cấu trúc virút giả (phage-like particles - PLP); và trình tự promoter T7 kiểm soát sự biểu hiện của gen mục tiêu [6]. Plasmid BH20 được cắt bằng enzyme HindIII ở 37°C trong 3 giờ, phản ứng cắt được bổ sung thêm 0,25 U CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase, NEB) nhằm ngăn cản sự tự nối lại của plasmid bằng cách loại bỏ các nhóm phosphate ở đầu 5'. Phản ứng cắt plasmid và đoạn chèn được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%). Plasmid AU2 (là plasmid BH20 sau khi cắt loại bỏ vùng RT-PCR positive control DNA) được tinh sạch từ agarose gel bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Đoạn chèn và plasmid AU2 sau khi cắt được nối với nhau bằng T4 DNA ligase sử dụng bộ kit Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific), thực hiện trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (22°C). Plasmid tái tổ hợp (pAU2-HCV) được chuyển vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp được chọn lọc trên đĩa môi trường LB agar có bổ sung kanamycin 50 μ g/ml và được kiểm tra vùng trình tự mục tiêu HCV bằng phản ứng PCR khuẩn lạc. Plasmid tái tổ hợp sau đó được tách chiết và tinh sạch bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) từ dịch nuôi cấy khuẩn lạc tương ứng trong môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin 50 μ g/ml.

Biến nạp plasmid pAU-HCV vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) và cảm ứng sự biểu hiện AR-HCV

Plasmid tái tổ hợp pAU2-HCV (sau khi được nhân lên số lượng lớn nhờ *E. coli* DH5 α) được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) khả nạp bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào vi khuẩn sau khi biến nạp được sàng lọc và kiểm tra sự hiện diện của plasmid và đoạn chèn của trình tự mục tiêu bằng PCR và giải trình tự bằng phương pháp Sanger thực hiện trên hệ thống thiết bị giải trình tự tự động 3500 (Applied Biosystems).

Tế bào vi khuẩn sau đó được tăng sinh và cảm ứng sự biểu hiện để thu nhận armored RNA HCV (AR-HCV). Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có chứa kanamycin 50 μ g/ml ở 37°C qua đêm. 2 ml dịch nuôi cấy được cho vào 200 ml LB lỏng chứa kanamycin 50 μ g/ml rồi được nuôi cấy ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8 thì đem ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau đó, phần cặn tế bào được tái huyền phù trong 200 ml LB lỏng có bổ sung kanamycin 50 μ g/ml và Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) để cảm ứng sự biểu hiện. Điều kiện cảm ứng được khảo sát bao gồm các nồng độ IPTG 0,1, 0,5, 1 và 2 mM ở các nhiệt độ 30 và 37°C. Sau thời gian cảm ứng, dịch tế bào được đem ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần cặn được tái huyền phù trong 20 ml buffer ly giải (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM PMSF), phá màng tế bào bằng sóng siêu âm với 50% biên độ, tổng thời gian là 2 phút 30 giây. Sự biểu hiện AR-HCV được kiểm tra bằng điện di sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel (SDS-PAGE).

Tinh sạch AR-HCV

Dịch ly giải tế bào được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và thu lấy dịch nổi. AR-HCV sau đó được tinh sạch bằng siêu ly tâm gradient tỷ trọng sucrose 45% và sucrose 25%. Siêu ly tâm được tiến hành ở tốc độ 50000 vòng/phút trong 5 giờ ở 4°C. Phân lớp chứa AR-HCV sau siêu ly tâm được thay đổi đệm TES (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) bằng Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck) có kích thước màng lọc là 30 kDa, ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút ở 4°C với 3 lần thể tích đệm TES so với thể tích mẫu. Dịch nằm trên màng lọc sau đó được xử lý với 100 U DNase và 50 U RNase ở 37°C trong 2 giờ để loại bỏ DNA và RNA tạp nhiễm. Dịch chứa AR-HCV sau đó được chạy qua cột sắc ký lọc gel Hiload 26/600 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) với đệm TES bằng hai lần thể tích cột theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

AR-HCV thu nhận sau mỗi bước tinh sạch được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Gel sau khi điện di được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue và giải nhuộm bằng destain solution (40% methanol, 10% acetic acid, 50% nước). Sự hiện diện của protein vỏ (coat protein) của bacteriophage trong mẫu AR-HCV thu nhận sau siêu ly tâm được kiểm tra bằng phương pháp Western blot sử dụng bacteriophage MS2 Coat Protein antibody (Kerafast, USA) là kháng thể sơ cấp và Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific) là kháng thể thứ cấp. Protein mục tiêu được phát hiện bằng cơ chất Pierce ECL Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific) và chụp hình bằng thiết bị chụp hình quang hóa ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

Sự hình thành cấu trúc đóng gói virút giả của AR-HCV sau khi tinh sạch được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy - TEM) được thực hiện bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Y khoa Moscow (Nga).

Định lượng AR-HCV

AR-HCV sau khi tinh sạch được định lượng bằng phương pháp real-time PCR sử dụng bộ kit COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 (Roches), được thực hiện bởi Trung tâm Y khoa MEDIC (TP Hồ Chí Minh).

Kiểm tra tính kháng với các enzyme nuclease của AR-HCV thiết kế

Tính ổn định của AR-HCV với các enzyme nuclease được xác định bằng cách ủ 1 ml dịch chứa AR-HCV với 100 U DNase I (Thermo Fisher Scientific) và 50 U RNase A (Thermo Fisher Scientific) ở 37°C trong 2 giờ. Đối chứng là plasmid pAU2-HCV và AR-HCV được xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút (xử lý nhiệt làm biến tính protein vỏ làm lộ RNA trần) [7]. Khả năng kháng các nuclease của AR-HCV được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%).

Kiểm tra tính ổn định của AR-HCV trong điều kiện bảo quản

AR-HCV được pha loãng bằng đệm TES bổ sung 0,05 mg/ml bovine serum albumin (BSA) về nồng độ 1×10⁵ copies/ml rồi chia nhỏ vào các tube 1,5 ml, mỗi tube chứa 1 ml mẫu. Các tube chứa AR-HCV được bảo quản ở -80°C, -20°C, 4°C và 25°C. Tính ổn định theo thời gian được xác định bằng cách định lượng AR-HCV bằng real-time PCR với cặp mồi và probe thiết kế, tại các mốc thời gian bảo quản (0, 1, 2, 3 và 6 tháng). Đối chứng là plasmid pAU2-HCV và AR-HCV được xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút (RNA trần). Kết quả đo nồng độ mẫu được phân tích và xử lý bằng chương trình Excel.

Kết quả và bàn luận

Đánh giá in-silico khả năng phát hiện các genotype, subtype HCV khác nhau của cặp mồi thiết kế

Primer và probe dùng cho khuếch đại và phát hiện HCV được thiết kế trên vùng 5'UTR trên bộ gen của HCV được trình bày trong bảng 1. Phân tích trình tự bộ gen HCV đã được công bố cho thấy, vùng 5'UTR có độ bảo tồn cao ở các genotype HCV khác nhau và đó là lý do vùng này thường được dùng trong các xét nghiệm phát hiện và định lượng HCV [8]. Kết quả kiểm tra in-silico PCR sử dụng phần mềm AmplifX của cặp mồi thiết kế (HCV-F và HCV-R) cho thấy khả năng khuếch đại vùng trình tự có kích thước 237-240 bp trên vùng 5'UTR của tất cả các genotype, subtype khác nhau của HCV đã được công bố trên cơ sở dữ liệu HCV Genome Database (bảng 2).

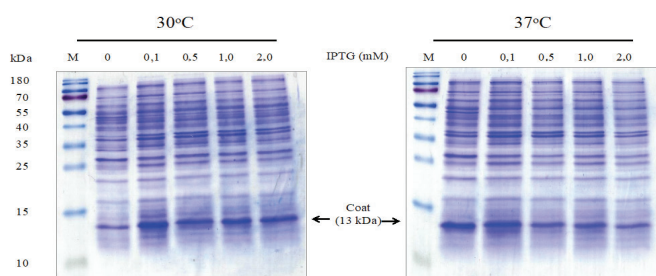
Bảng 2. Khả năng khuếch đại in-silico vùng 5'UTR của HCV sử dụng cặp mồi HCV-F và HCV-R.

Genotype/subtype	Mã trình tự (Accession No.)	Kích thước bộ gen (nucleotides)	5'UTR (nucleotides)	Sản phẩm PCR (nucleotides)
1a	M62321	9401	341	237
	M67463	9416	341	237
1b	D90208	9413	329	237
	M58335	9416	331	237
1c	D14853	9487	341	237
	AY051292	9441	341	237
2a	D00944	9589	340	237
	AB047639	9678	340	237
2b	D10988	9511	341	237
	AB030907	9654	341	237
2c	D50409	9513	340	237
2k	AB031663	9488	341	237
3a	D17763	9456	339	237
	D28917	9454	339	237
3b	D49374	9444	339	237
3k	D63821	9450	339	237
4a	Y11604	9355	279	237
5a	Y13184	9343	279	237
6a	Y12083	9340	283	240
6b	D84262	9628	342	240
6d	D84263	9615	338	237
6g	D63822	9461	338	237
6h	D84265	9621	338	237
6k	D84264	9601	338	237

Thu nhận AR-HCV

Vector biểu hiện pAU2-HCV mang đầy đủ các thông tin cần thiết để sản xuất AR-HCV. Trên vector này có trình tự mã hóa cho protein A hỗ trợ quá trình đóng gói tạo AR-HCV, trình tự mã hóa cho protein coat làm vỏ của AR-HCV và trình tự vùng 5'UTR-HCV cần đóng gói. T7 promoter với lac operator được điều khiển bởi chất cảm ứng là IPTG.

Kết quả cho thấy ở nhiệt độ 30°C, sự biểu hiện protein coat thấp khi không có chất cảm ứng IPTG, sự biểu hiện tốt nhất ở 0,1 mM IPTG và có xu hướng giảm xuống khi tăng nồng độ IPTG. Ở 37°C, nồng độ IPTG cho sự biểu hiện AR-HCV tốt nhất cũng là 0,1 mM và giảm xuống khi tăng nồng độ IPTG (hình 1). Mặc dù E. coli phát triển tốt nhất ở 37°C, việc giảm nhiệt độ cảm ứng xuống 30°C có thể làm giảm các phản ứng trao đổi chất không mong muốn cho sự tổng hợp các protein khác, do đó cải thiện năng suất tổng hợp protein mục tiêu. Bên cạnh đó, giảm nhiệt độ cảm ứng từ 37°C xuống 30°C cũng làm giảm đáng kể sự phân hủy protein sản phẩm, giảm sự kết tủa của protein biểu hiện vượt mức dưới dạng thể vùi (inclusion bodies) [9]. Nhìn chung, trong các điều kiện khảo sát, điều kiện tốt nhất để thực hiện cảm ứng sự biểu hiện AR-HCV là 0,1 mM IPTG ở 30°C. Kết quả này có sự tương đồng

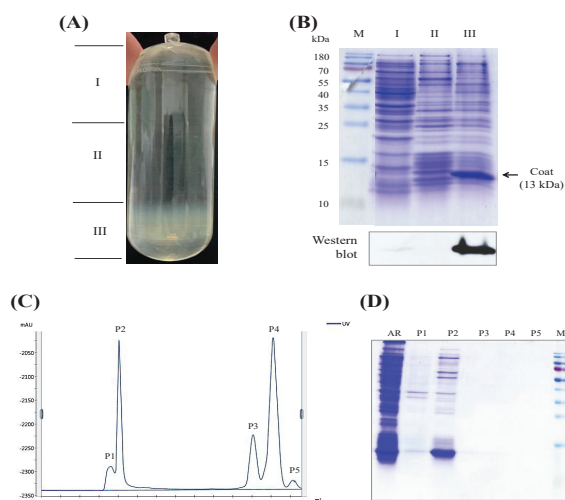


Hình 1. Kết quả điện di SDS-PAGE khảo sát điều kiện nhiệt độ và nồng độ IPTG cảm ứng sự biểu hiện AR-HCV của chủng *E. coli* BL21(DE3) sau 16 giờ nuôi cấy trong môi trường LB bổ sung IPTG.

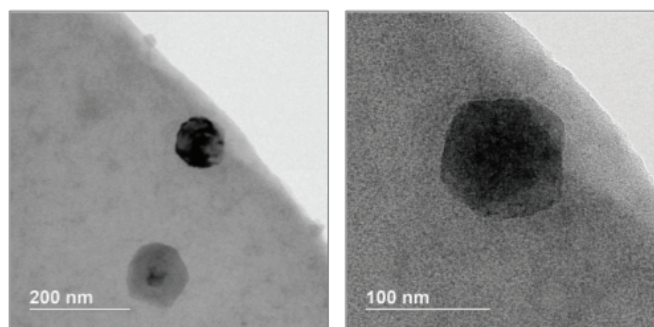
với nghiên cứu của Larentis và cộng sự (2014) [10] cho thấy điều kiện tốt nhất để thực hiện cảm ứng sự biểu hiện protein bằng IPTG trên *E. coli* BL21 (DE3) là 0,1 mM IPTG ở 28°C và nghiên cứu của Mühlmann và cộng sự (2017) [11] cho thấy nồng độ IPTG tốt nhất là 0,1 mM ở 28 và 30°C.

Tinh sạch AR-HCV

Dịch ly giải tế bào *E. coli* được siêu ly tâm gradient tỷ trọng sucrose để thu nhận AR-HCV (hình 2A). Sự hiện diện của AR-HCV trong các phân lớp được xác định bằng SDS-PAGE và Western blot (hình 2B). Kết quả cho thấy AR-HCV tập trung ở phân lớp dưới đáy. Đồng thời, quá trình siêu ly tâm cũng loại bớt một phần các protein tạp có tỷ trọng thấp hơn vào hai phân lớp trên. Phân lớp dưới được loại bỏ sucrose và thay đổi đệm TES bằng Amicon, sau đó được chạy qua cột sắc ký lọc gel (hình 2C, 2D). Để đánh giá sự đóng gói hình thành cấu trúc virút giả (phage like particle - PLP), mẫu AR-HCV sau khi tinh sạch qua sắc ký lọc gel được phân tích bằng TEM. Từ ảnh TEM có thể thấy các hạt AR-HCV tạo ra có cấu hình nhị thập diện, kích thước 30-50 nm, tương tự với cấu trúc của thực khuẩn thể MS2 (hình 3).



Hình 2. Tinh sạch thu nhận AR-HCV. (A) Các phân lớp trong ống siêu ly tâm tỷ trọng sucrose thu nhận AR-HCV; (B) Điện di SDS-PAGE và Western blot kiểm tra sự hiện diện của coat protein trong các phân lớp sau siêu ly tâm; (C) Sắc ký độ tinh sạch AR-HCV bằng cột lọc gel Hiload 26/600 Superdex 75 prep grade; (D) Điện di SDS-PAGE kiểm tra các phân đoạn thu được từ sắc ký lọc gel mẫu AR-HCV.



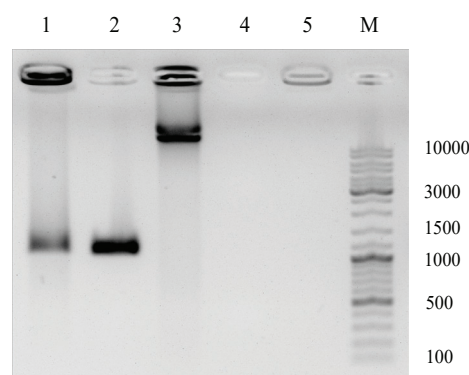
Hình 3. Cấu trúc AR-HCV nguyên vẹn sau khi tinh sạch được chụp bằng TEM.

Định lượng AR-HCV

Nồng độ AR-HCV sau tinh sạch được xác định bằng real-time PCR (sử dụng bộ kit COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 - Roche). Bộ kit này sử dụng cặp mồi và probe để khuếch đại và phát hiện vùng 5'UTR của HCV, nằm trong vùng 5'UTR được nhân dòng để thiết kế AR-HCV, vì vậy có thể sử dụng để định lượng AR-HCV. Kết quả định lượng cho thấy đã tạo được AR-HCV hiệu quả với số lượng lớn ($1,48 \times 10^{11}$ copies/ml).

AR-HCV kháng với các nucleases

Tính kháng nuclease (DNase và RNase) của AR-HCV sau khi xử lý với các enzyme này được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%) (hình 4).



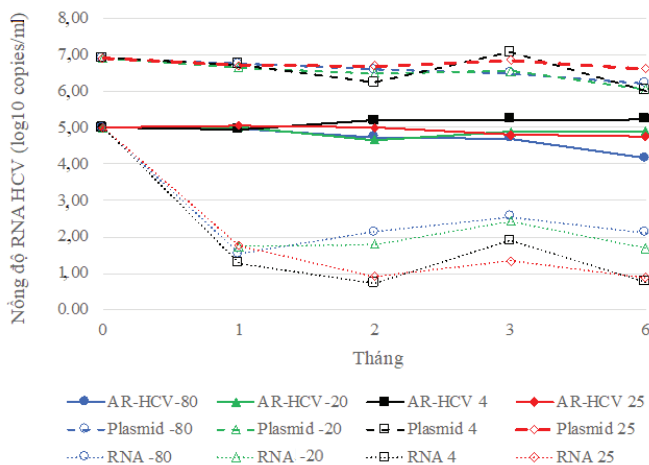
Hình 4. Kết quả điện di gel agarose (1%) kiểm tra tính kháng của AR-HCV sau khi xử lý với 100 U/ml DNase và 50 U/ml RNase ở 37°C trong 2 giờ. 1 - AR-HCV; 2 - AR-HCV xử lý với nucleases; 3 - plasmid pAU2-HCV; 4 - plasmid pAU2-HCV xử lý với nucleases; 5 - AR-HCV được xử lý nhiệt (95°C, 5 phút) và xử lý với nucleases; M - thang DNA (code SM0331, Thermo Scientific).

Kết quả điện di cho thấy chỉ có AR-HCV còn ổn định sau khi được xử lý đồng thời với DNase và RNase ở nồng độ cao, trong khi các phân tử plasmid DNA và RNA trần (AR-HCV được xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút) bị phân hủy hoàn toàn sau 2 giờ xử lý (hình 4). Tính kháng lại nuclease làm cho AR-HCV trở nên ổn định, không bị phân hủy khi điều kiện bảo quản không đảm bảo sạch nuclease, vốn có ở khắp nơi trong môi trường xung quanh. Điều này đặc biệt

quan trọng đối với các mẫu chuẩn cho định lượng cần có nồng độ không hoặc rất ít thay đổi, làm tăng độ chính xác và đáng tin cậy cho kết quả định lượng. Do có đặc tính bền với các nucleases, AR-HCV có thể bổ sung trực tiếp vào mẫu máu hoặc huyết thanh, giúp kiểm soát và tăng độ chính xác của toàn bộ quy trình định lượng HCV.

AR-HCV ổn định trong điều kiện và thời gian bảo quản

Kết quả định lượng mẫu AR-HCV so sánh với mẫu plasmid (pAU2-HCV) và RNA trần (AR-HCV xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút), được bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau theo thời gian được trình bày trong hình 5. Sau 6 tháng, nồng độ AR-HCV gần như không thay đổi so với ban đầu ở các điều kiện bảo quản -20°C, 4°C và 25°C, đảm bảo được tính ổn định để làm mẫu chuẩn dùng cho định lượng. Trong khi đó với mẫu RNA trần, nồng độ mẫu giảm mạnh (từ 10⁵ copies/ml xuống dưới 10² copies/ml) ở tất cả các điều kiện bảo quản. Mẫu plasmid cũng có sự biến động và giảm nồng độ sau 6 tháng ở các điều kiện bảo quản.



Hình 5. Biểu đồ đánh giá độ ổn định của AR-HCV theo điều kiện và thời gian bảo quản.

Kết luận

Nghiên cứu đã tạo thành công mẫu chuẩn AR-HCV bằng công nghệ armored RNA có đặc tính bền và kháng tốt với nuclease. Mẫu chuẩn được tạo ra bằng cách chèn một đoạn trình tự bảo tồn thuộc vùng 5'UTR của bộ gen HCV có khả năng phát hiện các genotype, subtype khác nhau của HCV vào vector pBH20 tạo thành vector tái tổ hợp pAU2-HCV. AR-HCV được sản xuất bằng cách cảm ứng sự biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang vector pAU2-HCV bằng chất cảm ứng IPTG 0,1 mM ở 30°C trong 16 giờ. Sau khi thu nhận và tinh sạch bằng siêu ly tâm tỷ trọng sucrose và sắc ký lọc gel, AR-HCV được đánh giá khả năng đóng gói RNA thành cấu trúc virút giả bằng ảnh TEM và được định lượng bằng real-time PCR với nồng độ 1,48×10¹¹ copies/ml. AR-HCV được chứng minh tính kháng với nuclease khi ủ với 100 U/ml DNase và 50 U/ml RNase trong 2 giờ và ổn

định sau 6 tháng bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Mẫu chuẩn AR-HCV được tạo ra từ nghiên cứu có khả năng ứng dụng trong các phương pháp sinh học phân tử như real-time PCR để định lượng HCV.

Ngoài đặc tính kháng nuclease, đảm bảo được tính ổn định của mẫu chuẩn và đảm bảo độ chính xác của xét nghiệm, armored RNA/DNA không có khả năng lây nhiễm [12], đảm bảo sự an toàn, thuận tiện trong việc bảo quản và vận chuyển (AR bền ở các điều kiện bảo quản khác nhau). Công nghệ armored RNA/DNA có nhiều tiềm năng để phát triển và ứng dụng trong tạo mẫu chuẩn, chứng nội để định lượng chính xác các tác nhân gây bệnh khác có bản chất di truyền là RNA như SARS-CoV-2, HIV cũng như DNA như HBV, baculovirus...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] WHO (2017), *Global Hepatitis Report 2017*, 83p.

[2] L. Dunford, et al. (2012), "Hepatitis C virus in Vietnam: high prevalence of infection in dialysis and multi-transfused patients involving diverse and novel virus variants", *PLoS One*, **7(8)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0041266.

[3] K.S. Abdelwahab, Z.N.A. Said (2016), "Status of hepatitis C virus vaccination: recent update", *World J. Gastroenterol.*, **22(2)**, pp.862-873.

[4] C.P. Cartwright (1999), "Synthetic viral particles promise to be valuable in the standardization of molecular diagnostic assays for hepatitis C virus", *Clin. Chem.*, **45(12)**, pp.2057-2059.

[5] D. Brown, and B.L. Pasloske (2001), "Ribonuclease-resistant RNA controls and standards", *Methods Enzymol.*, **341**, pp.648-654.

[6] <http://bccm.belspo.be/catalogues/lmbp-plasmids-plasmid-details?NM=BH20>.

[7] Y.J. Cheng, et al. (2006), "Preparation of His-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus", *J. Clin. Microbiol.*, **44(10)**, pp.3557-3561.

[8] J. Bukh, R.H. Purcell, R.H. Miller (1992), "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89(11)**, pp.4942-4946.

[9] R.S. Donovan, C.W. Robinson, B.R. Glick (1996), "Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter", *Journal of Industrial Microbiol.*, **16**, pp.145-154.

[10] A.L. Larentis, et al. (2014), "Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor", *BMC Research Notes*, **7(671)**, DOI: 10.1186/1756-0500-7-671.

[11] M. Mühlmann, E. Forsten, S. Noack, J. Buchs (2017), "Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures", *Microb. Cell Fact.*, **16(220)**, DOI: 10.1186/s12934-017-0832-4.

[12] B.L. Pasloske, C.R. Walkerpeach, R.D. Obermoeller, M. Winkler, D.B. DuBois (1998), "Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards", *J. Clin. Microbiol.*, **36(12)**, pp.3590-3594.