

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR-RFLP TRONG XÁC ĐỊNH KIỂU GENE VIRUT VIÊM GAN B

LÊ HỮU SONG, TRẦN THỊ HUYỀN TRANG
Bệnh viện TƯQĐ 108

TÓM TẮT

Mục tiêu: áp dụng quy trình xác định kiểu gene HBV bằng phương pháp PCR-RFLP của Hannoun.

Đối tượng và phương pháp: 120 bệnh nhân (BN) nhiễm HBV được chia thành 3 nhóm {42 BN ung thư gan (UTG); 48 BN viêm gan mạn tính (VGM); 30 người mang virus viêm gan B không triệu chứng (NMVR)}. Kiểu gene HBV được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP của Hannoun sử dụng enzym cắt Tsp509I.

Kết quả: 103/120 BN có thể phân tích kiểu gene, trong đó có 79 mẫu (77%) được xác định là kiểu gene C (16 BN UTG, 41 BN VGM và 22 là NMVR). 14 mẫu có đồng nhiễm hai kiểu gene B và C, chiếm 13,6%. 4 mẫu UTG tạo ra motif băng 200/256 và 4 mẫu UTG và 2 mẫu NMVR tạo ra motif băng 200/230/256.

Kết luận: Phương pháp xác định kiểu gene HBV của Hannoun đã được xây dựng thành công, tuy nhiên, kỹ thuật này còn nhiều hạn chế cần phải khắc phục.

Từ khóa: kiểu gene HBV, PCR-RFLP

SUMMARY

Aims: to apply the Hannoun's assay for identifying HBV genotype.

Patients and methods: 120 patients infected with HBV including 3 groups (42 HCC; 48 CHB; 30 ASYM). HBV genotypes were identified by PCR-RFLP adapted from Hannoun using Tsp509I.

Results: 103/120 could be genotyped with 79/103 (77%) samples were genotype C (16 HCC, 41 CHB and 22 ASYM). 14/103 (13,6%) samples infected with two genotypes B and C, 4 samples of HCC induced a motif of 200/256 and 4 samples of HCC and 2 samples of ASYM induced a motif of 200/230/256.

Conclusion: Hannoun's assay for identifying of HBV genotypes was successful established, however, this technology still have many limitation need to be resolved.

Keywords: HBV genotype, PCR-RFLP.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm virus viêm gan B (HBV) có thể gây ra nhiều thể bệnh khác nhau từ người mang virus mạn tính không triệu chứng đến viêm gan cấp tính tự hồi phục, viêm gan tối cấp tính, viêm gan mạn tính, xơ gan và có thể dẫn đến ung thư tế bào gan. Trước đây các nhà nghiên cứu cho rằng khả năng đáp ứng miễn dịch của cơ thể đóng vai trò quyết định trong cơ chế bệnh sinh của HBV. Tuy nhiên sự phát triển của sinh học phân tử

2. Phương pháp:

Kiểu gene HBV được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP sử dụng các cặp mồi như bảng 1.

Bảng 1: Trình tự các bộ mồi đặc hiệu cho vùng Core HBV

Tên mồi	Trình tự	Kích thước (nt)	T _m (°C)
HBprecore F	5'-AGTTGGGGGAGGAGATTAGGT-3'	21	53,49
HBx-core R	5'-TTTCCCACCTTATGAGTCCAA-3'	21	50,56
HBcore F	5'-CAAGCCTCCA.AGCTGTGCCTTGGGTGGCCTT-3'	31	68
HBcore-A R	5'-TTCTTCTTCTAGGGGACCTGCCTCGGTCCCG-3'	31	66
HBcore-noA R	5'-TTCTTCTTCTAGGGGACCTGCCTCGTCGTCT-3'	31	64,57

hiện đại đã bổ sung thêm một giả thuyết mới cho quá trình phát sinh bệnh của HBV đó là các đặc tính của HBV. Trong đó kiểu gen và các đột biến gen... đóng một vai trò quan trọng trong quá trình diễn biến bệnh lý của các bệnh nhân nhiễm HBV [1].

Từ năm 1988, Okamoto và cs đã ghi nhận được sự khác biệt trong bộ gen của HBV trên các bệnh nhân mà ông nghiên cứu, phát hiện này mở đầu cho hàng loạt các nghiên cứu về bộ gen của HBV sau đó [4]. Qua hàng loạt các nghiên cứu, các tác giả đã quy ước kiểu gen A là kiểu gen cổ điển, kiểu gen B có 8% nucleotide khác so với kiểu gen A, kiểu gen C có hơn 8% nucleotide khác so với kiểu gen A và B. Tương tự như vậy theo thời gian đến năm 2000 người ta đã phát hiện được 8 kiểu gen của HBV và ký hiệu từ A đến H [6]. Tiếp theo đó, năm 2008 Việt Nam là nước đã phát hiện thêm kiểu gene I [8] và Nhật Bản là nơi phát hiện ra kiểu gene thứ 10, được gọi là kiểu gene J [7]. Kết quả nghiên cứu cho thấy các kiểu gene được phân bố khác nhau trên từng khu vực và được ghi nhận là có ảnh hưởng tới đặc tính sinh học của virus cũng như bệnh cảnh lâm sàng của bệnh nhân nhiễm HBV [5].

Mặc dù, đã có nhiều công trình nghiên cứu về kiểu gene HBV nhưng do có nhiều phương pháp phân tích khác nhau, nhiều quần thể nghiên cứu khác nhau nên đặc điểm phân bố kiểu gene của HBV ở Việt Nam nói riêng và thế giới nói chung chưa được thống nhất.

Năm 2002, Hannoun và cộng sự đã xây dựng một phương pháp xác định kiểu gene đơn giản, hiệu quả, có thể phát hiện không những chỉ một kiểu gene trên một bệnh nhân mà còn có thể phát hiện đồng thời 2, hoặc 3 kiểu gene trên cùng một bệnh nhân [2]. Đây là một kỹ thuật hứa hẹn sẽ phù hợp với điều kiện của những nước đang phát triển như Việt Nam. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu ứng dụng phương pháp này trong điều kiện các phòng thí nghiệm trong nước để xác định kiểu gene.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng: Chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên 120 bệnh nhân, trong đó dựa trên diễn biến lâm sàng, các bệnh nhân này được chia thành ba nhóm, bao gồm: 42 bệnh nhân ung thư gan; 48 bệnh nhân viêm gan mạn tính; 30 người mang virus viêm gan B không triệu chứng.

Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi HBcore F/ HBcore-A,R (cặp mồi A) sẽ khuếch đại vùng Core của kiểu gen A và cho sản phẩm có kích thước 520bp.

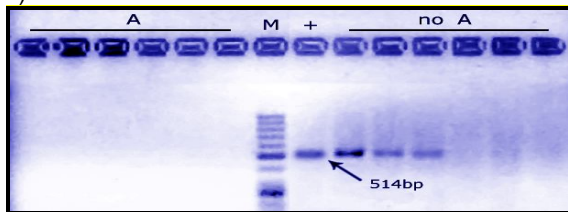
Phản ứng PCR với cặp mồi HBcore F/ HBcore-noA,R (cặp mồi noA) sẽ khuếch đại vùng Core của các kiểu gen không phải là A (bảy kiểu gen còn lại). Sản phẩm PCR nếu có kích thước là 550bp, xác định HBV DNA khuôn thuộc kiểu gen G. Nếu sản phẩm PCR có kích thước 514bp, xác định HBV DNA khuôn thuộc sáu kiểu gen còn lại (B, C, D, E, F, H), và để xác định HBV DNA khuôn đó thuộc kiểu gen nào trong số sáu kiểu gen còn lại đó cần tiến hành phản ứng cắt RE *Tsp509I*.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả khuếch đại vùng gen Core HBV.

Loại trừ 17 mẫu có nồng độ HBV DNA dưới ngưỡng phát hiện, tất cả các mẫu nghiên cứu còn lại đã được khuếch đại song song bằng hai bộ mồi HBcore F/ HBcore-A,R và HBcore F/ HBcore-noA,R với các thành phần và điều kiện phản ứng đã được tối ưu như đã mô tả ở trên, có kèm theo một mẫu chuẩn âm (NCT) và một mẫu chuẩn dương (PCT) có nồng độ HBV DNA tương đương 10^9 . Kết quả điện di trên gel cho thấy: Không có mẫu nào dương tính khi nhân PCR bằng cặp mồi HBcore F/ HBcore-A,R. Điều đó, theo lý thuyết của Hannoun thì chứng tỏ không có kiểu gene A trong nhóm nghiên cứu.

Song song với đó là các mẫu được nhân PCR bằng cặp mồi HBcore F/ HBcore-noA,R thấy có cả những mẫu cho kết quả PCR 514bp như dự tính và những mẫu không có sản phẩm PCR được nhân (hình 1).

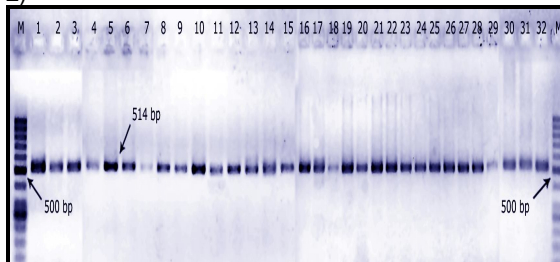


Hình 1: Minh họa kết quả PCR trực tiếp từ hai bộ mồi HBcore F/ HBcore-A,R (A): tất cả âm tính và HBcore F/ HBcore-noA,R (no A): một số mẫu âm tính, một số mẫu dương tính. Chú thích: M: 50bp DNA ladder, +: mẫu đối chứng dương.

Tất cả các mẫu không phát hiện được bằng trên bản điện di (gồm có tất cả những mẫu được nhân bằng cặp mồi HBcore F/ HBcore-A,R và những mẫu được nhân bằng cặp mồi HBcore F/ HBcore-noA,R nhưng không có bằng kết quả PCR trên bản điện di) sau khi được nhân Nested PCR bằng hai bộ mồi HbprecoreF/ HBx-core R (mồi ngoài), HBcore F/ HBcore-A,R; HBcore F/ HBcore-noA,R (các mồi trong) cho kết quả trên bản điện di Agarose 1% như sau:

Tất cả các mẫu được nhân Nested PCR sử dụng cặp mồi HBcore F/ HBcore-A,R làm mồi trong vẫn không có cho kết quả trên bản điện di. Điều đó khẳng định không có kiểu gene A trong quần thể nghiên cứu nếu như phương pháp của Hannoun là đúng.

Hầu hết các mẫu được nhân Nested PCR sử dụng cặp mồi HBcore F/ HBcore-noA,R làm mồi trong đều cho kết quả như dự tính trên bản điện di (514bp) (hình 2)



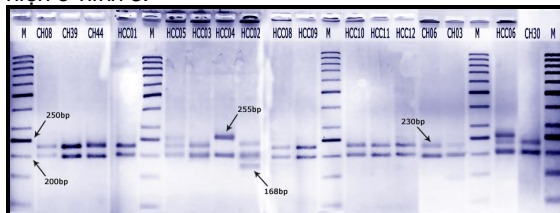
Hình 2: Kết quả Nested-PCR các mẫu nghiên cứu. Chú thích: M: 50bp DNA ladder, 1~32: mẫu nghiên cứu.

Kết hợp số liệu định lượng HBV DNA và kết quả PCR vùng Precore chúng tôi nhận thấy: (i) Các mẫu có nồng độ HBV DNA $<10^4$ phải tiến hành phản ứng Nested PCR mới phát hiện ra kết quả trên băng điện di; (ii) Không có mẫu bệnh nào được khuếch đại bằng cặp mồi được thiết kế riêng cho kiểu gen A. Điều này đặt ra khả năng có thể rằng trong 103 bệnh nhân VGB thuộc nhóm nghiên cứu, không có bệnh nhân nào mang kiểu gen A. Sở dĩ chưa thể khẳng định chắc chắn kết luận này bởi lẽ mẫu được chọn làm chuẩn dương cũng âm tính khi nhân PCR với cặp mồi HBcore F/ HBcore-A,R. Do đó không xác định được chính xác độ nhạy cũng như độ đặc hiệu của phản ứng PCR trên. Điều này đồng nghĩa với việc phải kiểm chứng lại khả năng các mẫu nghiên cứu không mang kiểu gen A bằng các phương pháp tiếp theo; (iii) Tất cả các mẫu nghiên cứu đều được khuếch đại thành công bằng bộ mồi HBcore F/ HBcore-noA,R và đều cho kết quả sản phẩm PCR có kích thước 514bp. Như vậy, cũng không có kiểu gen G nào được xác định trong số 103 mẫu nghiên cứu và cần phải tiến hành các bước tiếp theo để có thể xác định các mẫu này sẽ thuộc kiểu gen nào trong số các kiểu gen HBV còn lại.

2. Kết quả phân cắt vùng gen Core bằng enzym giới hạn

Tất cả các mẫu sau khi khuếch đại thành công bằng cặp mồi HBcore F/ HBcore-noA,R được xử lý bằng enzyme *Tsp509I* ở 65°C và điện di trên gel agarose 4% cùng với thang DNA chuẩn 50bp. Gel điện di sau khi nhuộm Ethidium Bromide 5ng/ml trong 15 phút được soi chụp bằng hệ thống soi gel UVP.

Hình ảnh minh họa kết quả điện di PCR-RFLP thể hiện ở hình 3.



Hình 3: Kết quả minh họa của một số mẫu phân tích bằng PCR-RFLP. Chú thích: M- 50bp DNA Ladder.

3. Kết quả xác định kiểu gene trên các bệnh nhân nghiên cứu

Kết quả cho thấy trong 103 mẫu phân tích có 79 mẫu sau khi cắt bằng *Tsp509I* tạo ra hai băng 200/230bp, chiếm 77%. Theo như nghiên cứu của Hannoun thì các mẫu này thuộc kiểu gene C [2]. Trong nghiên cứu của chúng tôi kiểu gene này gặp ở 16 bệnh nhân UTG, 41 bệnh nhân VGM và 22 mẫu ở NMVR. Bên cạnh đó có 14 mẫu có đồng nhiễm hai kiểu gene B và C, chiếm 13,6%. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Hannoun, trong nghiên cứu đó tác giả thấy có 67% bệnh nhân nhiễm hơn một kiểu gene. Điều khác biệt trong nghiên cứu của chúng tôi so với nghiên cứu của Hannoun là có một số mẫu cho kích thước băng không điển hình. Trong đó có 4 mẫu tạo ra motif băng 200/256 (4 mẫu UTG) và 6 mẫu tạo ra motif băng 200/ 230/ 256 (4 mẫu UTG, 2 mẫu NMVR). Như vậy, nếu tính những mẫu này là mẫu đồng nhiễm các kiểu gene thì tỷ lệ đồng nhiễm là 23,3%.

Bảng 2: Phân bố kiểu gene trên các nhóm bệnh nhân

Kiểu gene Nhóm NC	C	B/C	Không xác định
NMVR (n,%)	22 (27,85)	3 (21,4)	0 (0)
VGM (n,%)	41 (52)	5 (35,7)	2 (20)
UTG (n,%)	16 (20,15)	6 (42,9)	8 (80)
Tổng (n,%)	79 (100)	14 (100)	10 (100)

Nhận xét: Kiểu gene chủ yếu là C (77%), kiểu gene tiếp theo là hỗn hợp B và C (13,6%), cuối cùng là không xác định (9,4%).

Như vậy ngoài việc tạo ra các motif băng cắt khác với dự kiến, các mẫu nghiên cứu còn thấy xuất hiện một vị trí mới trên trình tự cắt để tạo ra băng 256. Điều này gợi mở ra một khả năng có sự đồng nhiễm giữa các kiểu gen đã tạo ra motif cắt 3 băng. Các mẫu có motif cắt 200/256 có thể là một motif cắt mới của các kiểu gen trên, cũng có thể là của một kiểu gen mới. Đây là những kết quả hoàn toàn mới so với các báo cáo trước đây của Hannoun [2].

Như vậy, nếu như chúng ta không phối hợp nhiều phương pháp thì việc xác định kiểu gene sẽ gặp rất nhiều khó khăn và sẽ cho kết quả không thống nhất. Một trong những lý do gây nên hạn chế của phương pháp Hannoun là tác giả chỉ mới khảo sát trên 6 kiểu gene từ A đến F. Hơn nữa, phương pháp này được xây dựng từ năm 2002. Trong khi đó, nghiên cứu cho

thấy HBV là một trong những virus có khả năng biến đổi gene rất nhanh với tỷ lệ thay thế nucleotide ước tính là $7,9 \times 10^{-5}$ nucleotide/vị trí/năm [3]. Do đó, khả năng xuất hiện những kiểu gene mới, hay dưới kiểu gene trong quần thể nghiên cứu của chúng tôi là rất lớn. Để khắc phục nhược điểm này chúng ta cần phải tiến hành giải trình tự gene của những kiểu gene nghi ngờ. Nếu có điều kiện như vậy thì khả năng tìm ra kiểu gene mới như một đồng nghiệp đã phát hiện ra kiểu gene I ở Việt Nam là rất có cơ hội [8].

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết lập thành công phương pháp xác định kiểu gene bằng RFLP-PCR theo Hannoun, tuy nhiên phương pháp này tỏ ra nhiều hạn chế khi HBV tiến hóa không ngừng. Do đó, trong thực hành việc xác định kiểu gene HBV cần phải phối hợp nhiều phương pháp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arzumanyan, A., H.M. Reis, M.A. Feitelson "Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma," *Nat Rev Cancer*, 13(2): 123-35.
2. Hannoun, C., K. Krogsgaard, P. Horal, M. Lindh (2002). "Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon," *J Infect Dis*, 186(6): 752-9.
3. Hayer, J., F. Jadeau, G. Deleage, A. Kay, F. Zoulim, et al. "HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus," *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue): D566-70.
4. Okamoto, H., F. Tsuda, H. Sakugawa, R.I. Sastrosoewignjo, M. Imai, et al. (1988). "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes," *J Gen Virol*, 69 (Pt 10): 2575-83.
5. Shi, Y.H. "Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes," *Jpn J Infect Dis*, 65(6): 476-82.
6. Stuyver, L., S. De Gendt, C. Van Geyt, F. Zoulim, M. Fried, et al. (2000). "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness," *J Gen Virol*, 81(Pt 1): 67-74.
7. Tatematsu, K., Y. Tanaka, F. Kurbanov, F. Sugauchi, S. Mano, et al. (2009). "A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J," *J Virol*, 83(20): 10538-47.
8. Tran, T.T., T.N. Trinh, K. Abe (2008). "New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam," *J Virol*, 82(11): 5657-63.