

PHÂN BIỆT GENOTYPE 1 VÀ 6 BẰNG KỸ THUẬT ALLELE-SPECIFIC RT-PCR DỰA VÀO VÙNG GEN NS5B CỦA VIRUS VIÊM GAN C

NGUYỄN HOÀNG CHƯƠNG¹, NGUYỄN THỊ MINH HIẾU¹,
HUỠNH VIẾT LỘC², VÕ ĐỨC XUYỀN AN², PHẠM HÙNG VÂN^{2,3}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại Học Quốc Gia Tp HCM

²Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Nam Khoa

³Trường Đại học Y Dược Tp HCM

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với sự định lượng virus trong máu trước điều trị, việc xác định genotype của virus viêm gan C (HCV) ở người bệnh nhiễm đóng vai trò quan trọng trong việc tiên lượng điều trị và quyết định thời gian điều trị^[1]. Người ta đã chứng minh rằng các genotype khác nhau có tính đáp ứng điều trị bằng interferon kết hợp ribavirin khác nhau trong đó genotype 1 có tính đáp ứng tương đối thấp nhất^[2]. Các phương pháp xác định genotype HCV bằng kỹ thuật PCR hay giải trình tự thường dựa vào vùng 5' không mã hóa của bộ gen HCV. Trong khi việc phân biệt các genotype khác của HCV như type 2, 3, 4, 5 trên vùng này là rõ ràng thì một số lượng không nhỏ các mẫu chứa genotype 6 thường được xác định là genotype 1 dẫn đến hậu quả là người bệnh bị tiên lượng điều trị và quyết định thời gian điều trị sai, gây ra tổn kém không cần thiết và các phản ứng phụ nguy hiểm đi kèm khi điều trị dài ngày với genotype 1. Đứng trước tình hình đó, người ta khuyến cáo nên sử dụng vùng gen NS5B để phân biệt giữa genotype 1 và 6^[3]. Công ty TNHH TM và DV Nam Khoa đã phát triển

phương pháp giải trình tự trên vùng gen NS5B để phân biệt các genotype 1 và 6. Mặc dù có độ chính xác cao nhưng nhược điểm của phương pháp giải trình tự là thiết bị đắt tiền và hóa chất không rẻ, điều này làm cho phương pháp này khó có thể được thực hiện rộng rãi trong thực tế lâm sàng. Với những lý do này, chúng tôi đề xuất một phương pháp phân biệt genotype 1 và 6 dựa trên vùng NS5B bằng kỹ thuật PCR. Ưu điểm của kỹ thuật này là thiết bị và hóa chất thực hiện rất phổ biến nên khả năng ứng dụng rộng rãi trong thực tế lâm sàng sẽ lớn.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Các oligonucleotide, các mẫu huyết thanh chứng chứa HCV genotype 1 và 6, mẫu huyết thanh dương tính HCV, các hóa chất để tách chiết RNA virus và thực hiện phản ứng RT-PCR: Các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu được tổng hợp nhân tạo bởi công ty Sigma (Mỹ); Công ty Nam Khoa cung cấp các mẫu huyết thanh chứng chứa

genotype 1 và 6, 48 mẫu huyết thanh dương tính HCV mang genotype 1 hoặc 6 được xác định bằng phương pháp giải trình tự vùng gen NS5B, bộ kit tách chiết RNA virus (RNA-Prep), bộ kit tổng hợp cDNA (cDNA synthesis kit). Bộ kit PCR được mua từ Qiagen.

2. Thiết kế các oligonucleotide đặc hiệu cho genotype 1 và 6 dựa vào vùng gen NS5B thuộc bộ gen HCV: Từ ngân hàng bộ gen (GENBANK), chúng tôi thu thập 633 trình tự bộ gen HCV của genotype 1 và 67 trình tự bộ gen của genotype 6. Chúng tôi trích xuất đoạn gen NS5B nằm giữa cặp primer HC3 và HC3R [4] của tất cả các trình tự này và đem so sánh theo cột (alignment) bằng phần mềm ClustalX (EBI), từ đó chúng tôi chọn ra vùng trình tự nucleotide cho phép phân biệt được genotype 1 và 6. Từ đoạn trình tự này chúng tôi thiết kế các oligonucleotide dùng cho phản ứng allele-specific RT-PCR như sau: NS5B16F-GACYTSGAGYTSATAACATC (mỗi xuôi chung cho genotype 1 và 6); NS5B1R-GAGAGTAACTATGGAGTGAAAATGCGCTAAG (mỗi ngược đặc hiệu cho genotype 1); NS5B6R-YRTGGAGTGARAANGCDGCC (mỗi ngược đặc hiệu cho genotype 6).

3. Xây dựng quy trình phân biệt genotype 1 và 6 bằng kỹ thuật allele-specific RT-PCR: Từ các mẫu huyết thanh chứa genotype 1 và genotype 6 được cung cấp bởi công ty Nam Khoa, chúng tôi tiến hành tách chiết RNA của HCV bằng bộ kit RNA-Prep. Sau đó, thực hiện phản ứng phiên mã ngược với bộ kit cDNA synthesis kit với chương trình nhiệt như sau: 25°C trong 5 phút tiếp theo là 50°C trong 30 phút. cDNA từ phản ứng này được cho vào hai phản ứng PCR sử dụng bộ kit PCR, phản ứng I với hệ mỗi nhằm phát hiện genotype 1 (NS5B16F-NS5B1R) và phản ứng II với hệ mỗi nhằm phát hiện genotype 6 (NS5B16F-NS5B6R). Chương trình luân nhiệt cho phản ứng PCR như sau: 95°C-15 phút (1 chu kỳ); 94°C-1 phút, 62°C-1 phút, 72°C-1 phút (40 chu kỳ); 72°C-10 phút (1 chu kỳ). Các sản phẩm PCR genotype HCV được điện di trên gel agarose và phát hiện với chất đánh dấu huỳnh quang Ethidium Bromide.

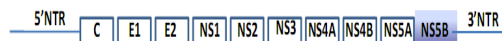
4. Đánh giá quy trình phân biệt genotype trên các mẫu huyết thanh lâm sàng: Chúng tôi đánh giá quy trình đã xây dựng trên 48 mẫu huyết thanh dương tính với HCV đã được xác định nhiễm genotype 1 hoặc 6 bằng phương pháp giải trình tự trên vùng NS5B do công ty Nam Khoa thực hiện. Kết quả thu nhận được từ quy trình phân type bằng kỹ thuật allele-specific RT-PCR được so sánh với kết quả giải trình tự vùng NS5B để xem xét sự tương đồng giữa hai phương pháp.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thiết kế hệ mỗi cho phản ứng allele-specific RT-PCR nhằm phân biệt genotype 1 và 6 dựa trên vùng gen NS5B.

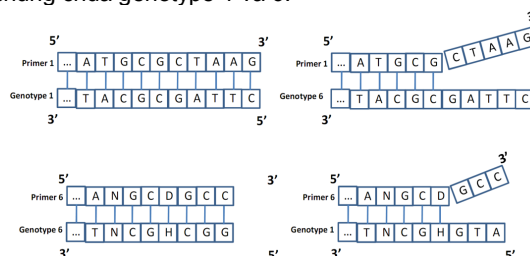
Từ việc so sánh sự tương đồng trên vùng gen NS5B (Hình 1) của 633 mẫu genotype 1 và 67 mẫu genotype 2, chúng tôi đã chọn được vùng trình tự cho phép thiết kế một mỗi xuôi chung cho cả genotype 1

và genotype 6, hai mỗi ngược đặc hiệu cho từng genotype 1 và 6.



Hình 1. Cấu trúc bộ gen của virus HCV. Vùng gen NS5B được đánh dấu đậm

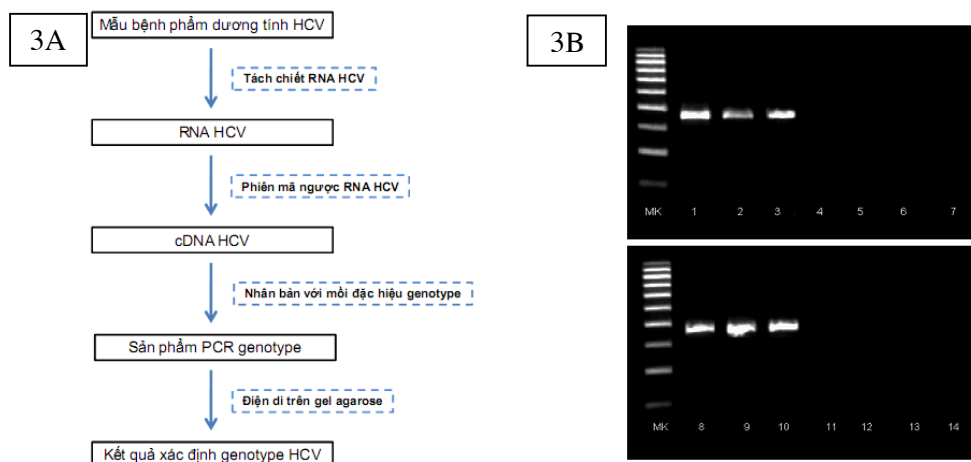
Trình tự nucleotide của các mỗi được trình bày trong phần Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu. Mỗi xuôi NS5B16F bắt cặp hoàn toàn vào cả hai genotype 1 và 6. Mỗi ngược đặc hiệu genotype 1 NS5B1R bắt cặp hoàn toàn vào 633 trình tự bộ gen HCV genotype 1, nhưng chỉ bắt cặp một phần vào 67 trình tự bộ gen genotype 6, đặc biệt ở đầu 3' của mỗi có đến 4 nucleotide không bắt cặp với mạch khuôn tạo nên một cấu trúc hở (overhang). Cấu trúc overhang tại đầu 3' của mỗi bắt cặp với mạch khuôn ngăn cản hoạt động kéo dài mạch mới (primer extension) của enzyme *Taq* polymerase. Tương tự, mỗi đặc hiệu cho genotype 6 là NS5B6R bắt cặp hoàn toàn vào các trình tự bộ gen của genotype 6 nhưng tạo cấu trúc overhang gồm 5 nucleotide khi bắt cặp với các trình tự genotype 1. Các mỗi này được khảo sát hoạt động thực tế trong phản ứng allele-specific RT-PCR trên các mẫu huyết thanh chứa genotype 1 và 6.



Hình 2. Cấu trúc bắt cặp hoàn toàn và không hoàn toàn (overhang) của các mỗi đặc hiệu. Primer 1: mỗi đặc hiệu cho genotype 1; primer 6: mỗi đặc hiệu cho genotype 6; Genotype 1: cDNA của genotype 1 HCV; Genotype 6: cDNA của genotype 6 HCV

2. Xây dựng quy trình phân biệt genotype 1 và 6

Đặc điểm cơ bản của enzyme *Taq* polymerase khi kéo dài mạch khuôn từ vị trí của mỗi đang bắt cặp là cần phải có cấu trúc bắt cặp hoàn toàn giữa mỗi và mạch khuôn, đặc biệt với các nucleotide ở đầu 3' của mỗi như minh họa ở Hình 2. Trên nguyên tắc, chỉ cần 1 nucleotide ở đầu 3' của mỗi không bắt cặp là đã đủ để ức chế hoạt tính kéo dài mạch khuôn của *Taq* polymerase [5]. Với đặc tính này của *Taq* polymerase và với hai mỗi đặc hiệu cho genotype 1 và 6, chúng tôi đã xây dựng quy trình phân type dựa trên kỹ thuật mà chúng tôi gọi là allele-specific RT-PCR. cDNA tổng hợp từ RNA qua quá trình phiên mã ngược được cho vào 2 phản ứng PCR riêng biệt, mỗi phản ứng chứa mỗi đặc hiệu cho từng genotype. Sơ đồ các bước thao tác của quy trình allele-specific RT-PCR được trình bày trong hình 3A. Kết quả của quy trình này trên các mẫu huyết thanh chứa genotype 1 và 6 được trình bày trong hình 3B.



Hình 3A. Sơ đồ các bước tiến hành quy trình allele-specific RT-PCR nhằm phân biệt genotype 1 và 6 Hình 3B. Kết quả của quy trình allele-specific RT-PCR trên các mẫu huyết thanh chứng chứa genotype 1 và 6. Giếng 1-3: Kết quả PCR với cặp mỗi NS5B16F-NS5B1R trên các mẫu RNA HCV genotype 1; Giếng 4-6: Kết quả PCR với cặp mỗi NS5B16F-NS5B1R trên các mẫu RNA HCV genotype 6; Giếng 7: Kết quả PCR với cặp mỗi NS5B16F-NS5B1R trên nước cất; Giếng 8-10: Kết quả PCR với cặp mỗi NS5B16F-NS5B6R trên các mẫu RNA HCV genotype 1; Giếng 11-13: Kết quả PCR với cặp mỗi NS5B16F-NS5B6R trên các mẫu RNA HCV genotype 6; Giếng 14: Kết quả PCR với cặp mỗi NS5B16F-NS5B6R trên nước cất.

Kết quả PCR cho thấy phản ứng với mỗi đặc hiệu type 1 chỉ cho tín hiệu huỳnh quang dương tính trên 3 mẫu huyết thanh chứng genotype 1 và kết quả âm tính trên 3 mẫu huyết thanh chứng genotype 6. Ngược lại, phản ứng với mỗi đặc hiệu type 6 chỉ cho tín hiệu huỳnh quang dương tính trên 3 mẫu huyết thanh chứng genotype 6 và kết quả âm tính trên 3 mẫu huyết thanh chứng genotype 1. Các sản phẩm PCR có kích thước như mong đợi là 361 bp cho genotype 1 và 352 bp cho genotype 6. Kết quả giải trình tự nucleotide các sản phẩm PCR này (kết quả không trình bày) cho thấy tính đặc hiệu đối với trình tự nucleotide của genotype 1 và 6 của HCV.

3.3. Đánh giá quy trình

Với quy trình phân type đã xây dựng, chúng tôi áp dụng trên 48 mẫu huyết thanh dương tính HCV lâm sàng để đánh giá khả năng hoạt động thực tế của quy trình. Các mẫu huyết thanh này đã được xác định genotype bằng phương pháp giải trình tự vùng NS5B, tất cả 48 mẫu này chỉ chứa genotype 1 hoặc genotype 6. Kết quả đánh giá được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Đánh giá quy trình phân type trên 48 mẫu huyết thanh có so sánh với phương pháp giải trình tự vùng gen NS5B. (1): Số thứ tự của mẫu huyết thanh; (2): Mã số mẫu huyết thanh; (3): Kết quả giải trình tự vùng gen NS5B; (4): Kết quả phân type bằng quy trình allele-specific RT-PCR.

(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)
1	578	1b	1	17	141	1b	1	33	CC1544	6e	6
2	783	1b	1	18	CC335	6a	6	34	CC1591	6e	6
3	CB1076	1b	1	19	CC337	6e	6	35	CC1592	1a	1
4	615	6f	6	20	CC484	1b	1	36	544	6p	6
5	623	6f	6	21	CC485	1b	1	37	567	1b	1
6	652	6e	6	22	670	6a	6	38	601	1b	1

7	CC34	1a	1	23	671	6e	6	39	CC1688	6a	6
8	CC35	6a	6	24	672	1a	1	40	CC1689	6e	6
9	CC36	6e	6	25	674	6a	6	41	CC1471	6e	6
10	CC151	6e	6	26	818	6a	6	42	CC1538	6e	6
11	CC152	6a	6	27	847	6a	6	43	CC1546	1b	1
12	CC153	1b	1	28	241	1b	1	44	CC1799	6a	6
13	CC208	6e	6	29	283	1b	1	45	CC1800	6a	6
14	CC179	6p	6	30	291	6e	6	46	655	1a	1
15	CC265	6e	6	31	972	1b	1	47	CC1540	1b	1
16	113	1b	1	32	CC1543	6a	6	48	CC1541	1b	1

Bảng 1 cho thấy kết quả xác định genotype của quy trình allele-specific RT-PCR hoàn toàn phù hợp với kết quả giải trình tự vùng NS5B. Như vậy độ đặc hiệu phân type của quy trình này trên 48 mẫu huyết thanh lâm sàng đạt 100%.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế thành công mỗi xuôi NS5B16F (GACYTSGAGYTSATAACATC) phát hiện chung genotype 1 và 6 của HCV. Mỗi ngược NS5B1R (GAGAGTAACTATGGAGTGAAAATGCGCTAAG) phát hiện đặc hiệu genotype 1. Mỗi ngược NS5B6R (YRTGGAGTGARAANGCDGCC) phát hiện đặc hiệu genotype 6. Chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình allele-specific RT-PCR (Hình 3A) nhằm phân biệt genotype 1 và 6 trên các mẫu huyết thanh chứng. Chúng tôi đã đánh giá quy trình phân type này trên 48 mẫu huyết thanh HCV dương tính có so sánh với kết quả giải trình tự vùng NS5B (Bảng 1). Quy trình này có độ đặc hiệu 100% trên 48 mẫu huyết thanh đã khảo sát.

SUMMARY

Characterization of hepatitis C virus genotypes is important issue for treatment prognosis and for decision of therapy duration. Genotype 6 is often

mischaracterized as genotype 1 based on the sequence analysis by PCR or sequencing on the 5'NTR of HCV genome. Therefore, we have developed an allele-specific RT-PCR method to specifically distinguish genotype 1 and 6 based on the NS5B region. This method includes the RNA extraction step followed by the cDNA synthesis step and ended with two genotype-specific PCR. Each of two genotype-specific PCR contains a general forward primer and a genotype-specific reverse primer. Consequently, each PCR gives the positive signal for the specific genotype and negative signal for the other genotype as tested with the control sera containing genotype 1 or 6. The evaluation of the method on 48 clinical sera gave the genotype-specific characterization compared to the NS5B sequencing results on the same samples. In conclusion, our method to characterize the genotype 1 and 6 based on the NS5B region is reliable and it could find its application in clinical practice.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blanca Olaechea de Careaga. 2006. Predictive factors for response to treatment of chronic hepatitis C. *Annals of Hepatology*. 5(Suppl.1): S24-S28.
2. Michael F Freid *et al.* 2002. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*. 347:975-982.
3. Donald G Murphy *et al.* 2007. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(4): 1102-1112.
4. Hung Van Pham *et al.* 2011. Very high prevalence of hepatitis C virus genotype 6 variants in southern Vietnam: large scale survey based on sequence determination. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 64(6): 537-539.
5. Luis Ugozzoli, Bruce Wallace. 1991. Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*. 2(1): 42-48.