

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT MULTIPLEX - PCR XÁC ĐỊNH KIỂU GEN CỦA VIRÚT VIÊM GAN B

**HOÀNG XUÂN SỬ, NGUYỄN LĨNH TOÀN
NGUYỄN NGỌC TUẤN, NGUYỄN THÁI SƠN**
Học viện quân y

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm vi rút viêm gan B (*Hepatitis B virus, HBV*) là một trong những nhiễm trùng phổ biến nhất ở loài người và là một vấn đề y tế lớn của nhiều quốc gia trên thế giới cũng như Việt Nam. Ước tính hiện nay trên thế giới đã có khoảng 2 tỷ người đã nhiễm HBV, trong đó đang có gần 400 triệu người đang nhiễm HBV mạn tính chiếm 6% dân số thế giới. Nhiễm HBV có thể gây nên nhiều thể bệnh khác nhau từ người mang vi rút không triệu chứng, viêm gan cấp tính tự hồi phục đến viêm gan mạn, xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) [1]. Kiểu gen của HBV được phát hiện lần đầu tiên năm 1988 bởi Okamoto và CS dựa vào sự khác biệt trên 8% trình tự nucleotide trên toàn bộ bộ gen của HBV. Cho đến nay 8 kiểu gen của HBV từ A-H đã được xác định. Hiện nay có nhiều phương pháp được ứng dụng xác định các kiểu gen của HBV như phân tích tính đa hình

của các đoạn giới hạn (restriction fragment length polymorphism: RFLP) (Mizokami và CS., 1999, Lindh và CS., 1998), phương pháp PCR đa mồi (multiplex - PCR) (Kirschberg và CS., 2004; Naito và CS., 2001), phương pháp line đầu dò (line probe assay: LiPA) (Osiowy và Giles, 2003), phương pháp real-time PCR (Yeh và CS., 2004), phương pháp oligonucleotide microarray (Song và CS., 2006) và phương pháp giải trình tự (sequencing) (Bartholomeusz and Schaefer, 2004; Norder và CS., 1994). Tuy nhiên các phương pháp này đòi hỏi phải có các trang thiết bị hiện đại, chi phí cho một xét nghiệm còn cao và mất nhiều thời gian, không phù hợp khi thực hiện một cách thường qui ở các phòng xét nghiệm cũng như trong điều tra dịch tễ khi phải thực hiện với một số lượng mẫu lớn. Chính vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm các mục tiêu:

1. Hoàn thiện qui trình cho phản ứng Multiplex - PCR xác định kiểu gen của HBV.

2. Đánh giá khả năng ứng dụng của kỹ thuật Multiplex - PCR xác định kiểu gen của HBV trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu và đối tượng nghiên cứu:

Trình tự bộ gen (Genome) HBV chủng hoang dại đại diện cho 8 kiểu gen HBV được công bố trên Genbank (70 chủng).

DNA plasmids của 3 kiểu gen là A, B, C được cung cấp bởi Kirschberg group (Kirschberg et al., 2004).

55 mẫu huyết thanh của các bệnh nhân có HbsAg (+). Huyết thanh được bảo quản ở -20°C cho đến khi được sử dụng tách DNA.

Hoá chất và các trang thiết bị được sử dụng tại Phòng Vi sinh vật và các mầm bệnh sinh học - Trung tâm nghiên cứu Sinh Y Dược học - Học viện Quân y.

+ Các primer dùng cho nghiên cứu chúng tôi dựa theo Kirschberg và CS (2004) [9].

Genotype A:

HBV-A-s (nt 2331–2360) 5'-CGG AAA CTA CTG TTG TTA GAC GAC GGG AC-3'

HBV-A-as (nt 2701–2665) 5'-AAT TCC TTT GTC TAA GGG CAA ATA TTT AGT GTG GG-3'

Genotype B:

HBV-B-s (nt 1470–1491) 5'-CCG CTT GGG GCT CTA CCG CCC G-3'

HBV-B-as (nt1660–1633) 5'-CTC TTA TGC AAG ACC TTG GGC

AGG TTC C-3'

Genotype C:

HBV-C-s (nt 2706–2741) 5'-CCT GAA CAT GCA GTT AAT CAT TAC TTC AAA ACT AGG-3'

HBV-C-as (nt 192–165) 5'-AGC AGG GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'

Các cặp mồi được đặt tổng hợp tại hãng Invitrogen.

Phương pháp nghiên cứu:

Tách DNA: DNA được tách theo bộ kit tách chiết và tinh sạch DNA tổng số theo qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất, chúng tôi sử dụng bộ kit QIA amp DNA Mini Kit, (QIAGEN, Đức). Qui trình như sau: cho 200µl huyết thanh vào tube ly tâm có chứa 20µl QIAGEN Protease và thêm 200µl dung dịch đệm AL, vortex trong 15 giây, sau đó ủ ở 56°C trong 10 phút. Ly tâm thu cặn rửa bằng cồn và các dung dịch đệm AW1, AW2. Cuối cùng thêm 200µl dung dịch đệm AE, ly tâm thu DNA, bảo quản ở -20°C cho đến khi chạy PCR.

Phương pháp nhân các gen đích bằng kỹ thuật PCR và Multiplex - PCR.

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy GeneAmp PCR System 9700 và iCycler. Thực hiện nhân gen đích theo chu trình nhiệt và tối ưu hóa bằng cách chạy gradient nhiệt độ gắn mồi và thời gian gắn mồi, nồng độ Mg⁺⁺ thời gian biến tính, thời gian kéo dài chuỗi theo chu trình nhiệt cơ bản của phản ứng PCR. Với Multiplex - PCR thành phần phản ứng cũng

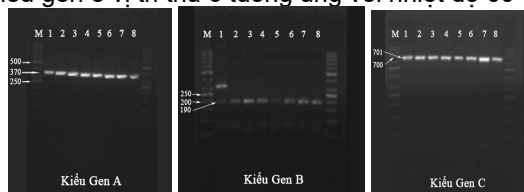
tương tự nhưng chỉ khác là tất cả các cặp mồi đều được cho vào một phản ứng không như PCR đơn chỉ có một cặp mồi cho mỗi kiểu gen.

Kỹ thuật giải trình tự gen: Giải trình tự gen (ADN sequencing) là phương pháp xác định vị trí sắp xếp các nucleotid trong phân tử ADN. Nguyên lý của phương pháp này là: tổng hợp các mạch đơn ADN mới có độ dài ngắn hơn mạch khuôn; nhờ kỹ thuật đánh dấu và ngắt đoạn trong quá trình tổng hợp mạch ADN, thu được các mạch đơn hơn kém nhau một base; từ đó có được sơ đồ trật tự ADN khuôn mẫu.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả tối ưu quy trình phản ứng Multiplex - PCR.

Đối với nhiệt độ gắn mồi chúng tôi sử dụng chương trình Gradient nhiệt trên máy iCycler. Nhiệt độ gắn mồi được chia trong khoảng nhiệt độ nóng chảy của mồi là 50 - 62°C. Sau khi đưa thông số máy cho dải nhiệt độ cụ thể là: 50; 50,9; 52,4; 54,6; 57,7; 59,9; 61,3 và 62. Chúng tôi sử dụng mẫu dương tính là các kiểu gen HBV DNA plasmid của 3 kiểu gen A, B, C hay gặp ở Việt Nam như một số báo cáo gần đây [2], [3] chuẩn bị 24 phản ứng PCR giống nhau về thành phần (8 phản ứng cho 1 kiểu gen) tương ứng với các mốc nhiệt độ ở trên, chạy đồng thời trong cùng một điều kiện nhưng chỉ khác nhau về nhiệt độ gắn mồi. Sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose 1,5% và hình ảnh điện di được chụp bằng máy Dolphin - DOC. Kết quả cho thấy băng ADN rõ nhất của cả ba kiểu gen ở vị trí thứ 6 tương ứng với nhiệt độ 60°C.



Hình 1: Hình ảnh điện di kết quả Gradient nhiệt độ gắn mồi của 3 kiểu gen A, B, C.

M: Thang DNA chuẩn, cột số 2- 9, theo thứ tự điểm đặt nhiệt là 50; 50,9; 52,4; 54,6; 57,7; 59,9; 61,3 và 62 °C.

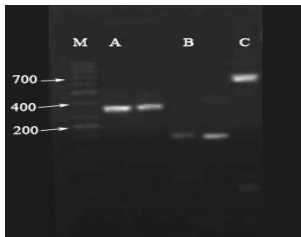
Tiếp theo chúng tôi tiến hành tối ưu thời gian gắn mồi, nồng độ mồi, nồng độ dNTP, nồng độ Mg⁺⁺ tương tự như trên và tìm ra qui trình tối ưu cho phản ứng Multiplex - PCR là:

Thành phần phản ứng Multiplex - PCR.

Multiplex - PCR		
Thành phần Mix PCR	Thể tích (µl)	Nồng độ cuối cùng
Nước khử ion	12,3	
PCR bufer (10X)	2,5	1x
dNTP mix (10 mM)	2	0,2 mM
Primer HB-As (10pmol/l)	0,5	0,5 mM
Primer HB-Aas (10pmol/l)	0,5	0,5 mM
Primer HB-Bs (10pmol/l)	0,5	0,5mM
Primer HB-Bas (10pmol/l)	0,5	0,5 mM
Primer HB-Cs (10pmol/l)	0,5	0,5 mM
Primer HB-Cas (10pmol/l)	0,5	0,5 mM
Taq Polymerase (5U/µl)	0,2	1 unit
DNA template	5	
Tổng số	25	

Chu trình luân nhiệt là: 95°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/2 min; 72°C/7 min; 4°C/#;

Kết quả chạy kiểm tra quy trình tối ưu trên các HBV DNA plasmid của 3 kiểu gen A, B, C.



Hình 2: Hình ảnh điện di sản phẩm Multiplex - PCR. M: Thang DNA chuẩn; A: Kiểu gen A; B: Kiểu gen B; C: Kiểu gen C

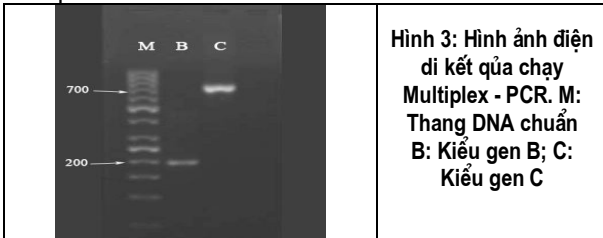
Hình ảnh điện di cho thấy tất cả các giếng đều xuất hiện băng ADN có kích thước tương ứng với từng kiểu gen. Không có vị trí nào có băng phụ.

Kết quả multiplex - PCR xác định kiểu gen của HBV trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

Bảng 1: Kết quả multiplex - PCR xác định kiểu gen của HBV trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

Kết quả	Số lượng	Tỷ lệ(%)
HBV kiểu gen B	32	58,18
HBV kiểu gen C	22	40
Không xác định	1	1,82
Tổng số	55	100

Bảng 1 cho thấy có 32/55 (58,18%) bệnh nhân nhiễm kiểu gen B và 22/55 (40%) bệnh nhân nhiễm kiểu gen C được phát hiện bằng phương pháp Multiplex - PCR.



Hình 3: Hình ảnh điện di kết quả chạy Multiplex - PCR. M: Thang DNA chuẩn; B: Kiểu gen B; C: Kiểu gen C

Kết quả so sánh phương pháp Multiplex - PCR xác định kiểu gen của HBV với phương pháp giải trình tự gen.

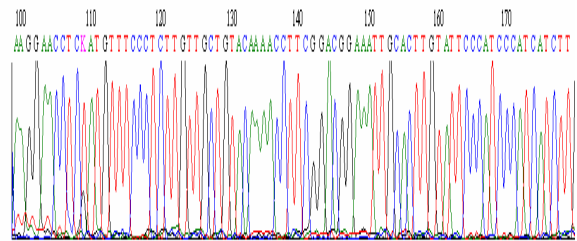
Để xác định chính xác kiểu gen của HBV bằng phương pháp Multiplex - PCR chúng tôi tiến hành giải trình tự 25/55 (45,5%) mẫu trên vùng S sau khi có kết quả phân tích bằng phương pháp Multiplex - PCR. Bên cạnh đó chúng tôi cũng sử dụng cả phương pháp phân tích loài dùng chương trình phần mềm BioEdit 7.01 và TreeView cũng như so sánh trên ngân hàng gen (Genbank) sử dụng công cụ viral genotyping tool và phương pháp BLAST để so sánh.

Bảng 2: So sánh sự phù hợp giữa phương pháp xác định kiểu gen của HBV bằng Multiplex - PCR với giải trình tự vùng S.

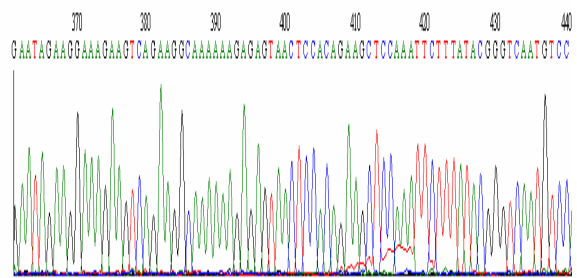
N = 25	Sequencing		Tổng
	+	-	
Multiplex - PCR	+	0	24
	-	0	1
Tổng	25	0	25

$$K = \frac{OA - EA}{100 - EA} = \frac{(24/25) \times 100 - 1/25 \times 100}{100 - 1/25 \times 100} = 0,95$$

Như vậy kết quả xác định kiểu gen bằng giải trình tự vùng S và phương pháp Multiplex - PCR cho kết quả độ phù hợp cao với K = 0,95.

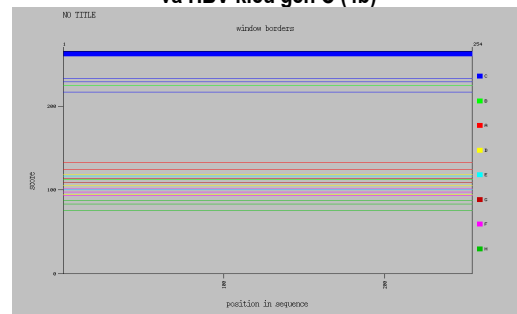


4a

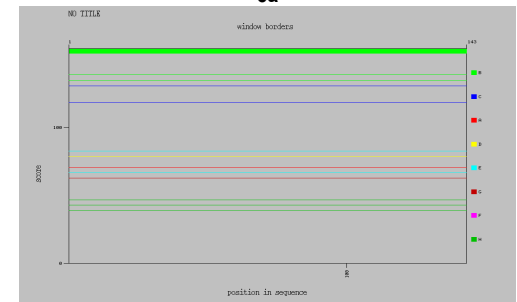


4b

Hình 4: Hình ảnh giải trình tự gen HBV kiểu gen C (4a) và HBV kiểu gen C (4b)



5a



5b

Hình 5: Hình ảnh đối chiếu trên Genbank HBV kiểu gen C (5a) và HBV kiểu gen B (5b)

KẾT LUẬN

Quy trình Multiplex - PCR xác định kiểu gen của HBV với chu trình luân nhiệt như sau 95°C/1 phút; 60°C/1 phút; 72°C/2 phút; 72°C/7 phút; 4°C/#.

Kiểu gen của HBV trên 100 bệnh nhân có HBV (+) ở khu vực Hà Nội cho thấy: kiểu gen B là 33/55 (60%) và kiểu gen C là 22/55 (40%), kết quả này tương đương với phương pháp giải trình tự gen.

SUMMARY

Eight genotypes (A-H) of hepatitis B virus (HBV) are known with variations in nucleotide sequences greater than 8%. Several recent publications found that the clinical course and outcome of antiviral therapy depended on the genotype of the infecting HBV strain. Large epidemiological studies will require the availability of a system which is rapid, reliable and can be performed on a large number of samples.

We have developed Multiplex-PCR assay which uses genotype-specific primer pairs for genotyping of hepatitis B virus (HBV), these primer pairs specifically amplified HBV DNA of respective genotype, either in single or in Multiplex PCR.

Keywords: Multiplex - PCR; HBV; Genotypes.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đào Đình Đức, Lê Đăng Hà (1997). Dịch tễ học viêm gan virút B ở Việt Nam. *Tạp chí Y học thực hành*, 9, tr 1-3.
2. Lê Hữu Song, Nguyễn Lĩnh Toàn, Đinh Ngọc Duy, Vũ Quốc Bình, Peter Kreamsner và Thomas Bock. Tác động của kiểu gen và pha trộn kiểu gen của virút viêm gan B lên bệnh cảnh lâm sàng. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2006: 329: 5-17
3. Trần Xuân Chương. Kiểu gen B, C và bệnh viêm gan virút B cấp. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2006: 329: 52-58.
4. Angeline Bartholomeusz1 and Stephan Schaefer.

Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev. Med. Virol.* 2004; 14: 3-16.

5. Hannoun C, Norder H, Lindh M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2267-72.

6. Hideo Naito, Shigeki Hayashi và Kenji Abe. Rapid and Specific Genotyping System for Hepatitis B Virus Corresponding to Six Major Genotypes by PCR Using Type-Specific Primers. *Journal of clinical Microbiology* 2001, 39; 362-364

7. Jinsong Chena, Jianhua Yin, Xiaojie Tan, Haiqin Zhang, Hongwei Zhang, Beichuan Chen, Wenjun Chang, Stephan Schaefer, Guangwen Cao. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A-F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2. *Journal of Clinical Virology* 38 (2007) 238-243

8. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-2583.

9. Oliver Kirschberg, Christian Schutter, Reinald Repp, Stephan Schaefer. A multiplex - PCR to identify hepatitis B virus - genotype A - F. *J of clinical virology* 2004; 29: 39 - 43.

10. Yuzo Miyakawa, Massashi Mizokami. Classifying Hepatitis B virus genotypes, *Intervirolgy* 2003; 46: 329-338.