

## TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM SINH HÓA CỦA RNA POLYMERASE PHỤ THUỘC RNA (RdRp) TỪ VIRUS GÂY BỆNH TAY-CHÂN-MIỆNG (FMDV)

PHẠM TẤN VIỆT, NGUYỄN NGỌC AN, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH  
Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh  
nguyenthidieuhanh@iuh.edu.vn

**Tóm tắt.** Protein RdRp (RNA dependent RNA polymerase) của các virus có vai trò quan trọng trong chu trình sống của virus. Enzyme này được xem là mục tiêu cho các thuốc phòng ngừa và điều trị bệnh. Trong nghiên cứu này, protein RdRp tái tổ hợp của gây bệnh tay chân miệng (FMDV) đã được tinh sạch và kiểm tra các hoạt tính sinh hóa. Protein RdRp tái tổ hợp với độ tinh sạch hơn 98% đã được thu nhận và thể hiện hoạt tính RNA polymerase với sự tổng hợp RNA phụ thuộc môi. Chúng tôi đã xác định được giá trị  $k_m$  và  $V_{max}$  cho sự tổng hợp UTP lần lượt là 13,6  $\mu\text{M}$  và 42  $\mu\text{M}/\text{giờ}$ .  $k_{cat}$  cho sự xúc tác phản ứng là 0,28  $\text{min}^{-1}$  và  $k_{obs}$  cho sự chuyển đổi cơ chất là 0,022  $\text{min}^{-1}$ . Chất ức chế cho hoạt động của enzyme DMUT cũng được kiểm tra và  $\text{IC}_{50}$  của DMUT là 26,79  $\mu\text{M}$ . Như vậy, đặc điểm sinh hóa của enzyme RdRp của FMDV đã được xác định, đây là cơ sở cho việc sàng lọc các đối tượng thuốc trong phương pháp hóa trị liệu để phòng ngừa và điều trị bệnh tay chân miệng.

**Từ khóa.** RNA polymerase phụ thuộc RNA, virus gây bệnh tay chân miệng, đặc điểm sinh hóa, phương pháp so màu, tinh sạch enzyme.

### PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF RNA- DEPENDENT RNA POLYMERASE (RdRp) FROM FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS

**Abstract.** The RdRp protein (RNA dependent RNA polymerase) of the viruses plays an important role in the viral life cycle. This enzyme is considered an attractive target for viral preventive and treatment drugs. In this study, the recombinant RdRp protein of foot and mouth disease virus (FMDV) was purified and examined biochemical activities. The recombinant RdRp protein with 98% purity were collected and expressed RNA polymerase activity with primer-dependent RNA synthesis.  $k_m$  and  $V_{max}$  values are also calculated and  $k_m$  for UTP synthesis is 13.6  $\mu\text{M}$  and  $V_{max}$  is 42  $\mu\text{M} / \text{hour}$ .  $K_{cat}$  for catalytic reaction is 0.28  $\text{min}^{-1}$  and  $k_{obs}$  for rate constant is 0.022  $\text{min}^{-1}$ . The inhibitor for enzyme activity was also tested and the  $\text{IC}_{50}$  for DMUT was 1.28 mM and 26.79  $\mu\text{M}$ . Thus, the biochemical characteristics of FMDV RdRp has been identified, which is the basis for the screening of drug candidates in chemotherapy to prevent and treat foot and mouth disease.

**Key words.** RNA dependent RNA polymerase, foot and mouth disease virus, biochemical characterization, colorimetric assay, enzyme purification.

### 1. GIỚI THIỆU

Bệnh tay chân miệng (hay còn gọi bệnh lở mồm long móng trên động vật móng guốc) là bệnh cấp tính, rất dễ lây lan trên vật nuôi móng guốc như bò, lợn, cừu, cũng như một số động vật hoang dã. Bệnh này đã gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi [1-4]. Tác nhân gây nên bệnh tay chân miệng là virus FMDV (Foot and Mouth Disease Virus) thuộc chi *Aphthovirus*, họ *Picornavirida*. Sự lây lan nhanh của virus FMDV trên động vật đã khiến Tổ chức Thế giới cho Sức khỏe Động vật (World Organization for Animal Health-OIE) đưa bệnh tay chân miệng vào danh mục các bệnh nghiêm trọng cần được giám sát [5]. Hiện nay FMDV được biết có bảy kiểu huyết thanh bao gồm A, O, C, Châu Á 1, và lãnh thổ Nam Phi SAT1, SAT2, SAT3. Mỗi kiểu huyết thanh có chứa nhiều kiểu gen quy định. [6, 7]. Trong các kiểu huyết thanh này, hơn 60 phân nhóm cũng đã được báo cáo. Chính vì kiểu gen quá đa dạng nên hiện nay chưa có vaccine đa hiệu cho FMDV. Do đó, đây là thách thức cho việc chọn lọc các dòng vaccine [8]. Trước đây, vaccine hiệu quả cho ngăn ngừa bệnh tay chân miệng đang được sử dụng là FMDV bất hoạt nhưng số lượng giới hạn khi dịch bùng phát. Hiện nay, ứng dụng kỹ thuật di truyền, vaccine chứa một phần gen của FMDV mà cần thiết cho sự hợp nhất capsid của virus và không chứa các gen mã hóa cho nonstructural protein, đặc biệt là enzyme RNA dependent RNA polymerase – RdRp. Tuy nhiên, vaccine này chỉ có hoạt lực sau bảy ngày tiêm chủng vì cần thời gian để kích hoạt phản ứng miễn dịch [9]. Nhiều nghiên cứu đã

được thực hiện để tìm ra các loại thuốc cho việc phòng ngừa và điều trị bệnh tay chân miệng như việc sử dụng hợp chất ribavirin để ức chế sự nhân lên của bộ gen virus, hoặc các hợp chất 29-C-methylcytidin ức chế hoạt động của enzyme RdRp, nhưng vẫn chưa có loại thuốc nào được công nhận thật sự có khả năng phòng ngừa và điều trị bệnh này. [2-4, 10].

Bộ gen của Virus FMDV là một phân tử RNA sợi dương mạch đơn có chiều dài khoảng 8,5 kb. Sản phẩm sau dịch mã là một polyprotein. Phân tử polyprotein này sẽ được phân cắt thành các protein cấu trúc và protein chức năng [11]. Protein chức năng tham gia quá trình tổng hợp RNA là một RNA polymerase phụ thuộc RNA (RNA dependent RNA polymerase - RdRp). Do đó, enzyme RdRp có vai trò mấu chốt trong chu trình sống của FMDV. Hiện nay, nhiều loại thuốc kháng virus mà mục tiêu là các polymerase của các tác nhân gây bệnh khác nhau đã được chứng nhận. Như vậy, các enzyme polymerase của virus là mục tiêu chủ yếu cho việc phát triển các loại thuốc chống lại các bệnh do virus gây ra. Trong đó, enzyme RdRp của FMDV là mục tiêu rất rõ ràng cho việc sử dụng các phương pháp hóa trị liệu trong điều trị và phòng ngừa bệnh [4, 12-15]. Việc hiểu rõ các đặc tính sinh hóa của RdRp giúp cho việc sàng lọc các loại thuốc và hỗ trợ phòng chống các căn bệnh do các tác nhân virus RNA mang bộ gen RNA gây nên.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành biểu hiện và tinh sạch RNA phụ thuộc RNA của virus gây bệnh tay chân miệng bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Protein sau tinh sạch được kiểm tra các đặc tính động học của enzyme với ảnh hưởng của nồng độ enzyme lên hoạt tính RNA polymerase, sự phụ thuộc môi của enzyme, hoạt tính RNA polymerase trong các điều kiện nồng độ mạch khuôn RNA khác nhau, nồng độ cơ chất UTP khác nhau và hoạt tính thể hiện trong các khoảng thời gian khác nhau. Ngoài ra, sự ảnh hưởng của chất ức chế cạnh tranh DMUT lên quá trình tổng hợp RNA cũng được kiểm tra và nồng độ ức chế 50% hoạt tính của enzyme đã được xác định. Sự hiểu biết về động học enzyme giúp cho việc tiên đoán sự hoạt động của enzyme và hỗ trợ việc sàng lọc các đối tượng thuốc cho việc phòng ngừa và điều trị bệnh tay chân miệng.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Biểu hiện và tinh sạch biểu hiện và tinh sạch RdRp tái tổ hợp từ FMDV

Plasmid pET-28a chứa gen mã hóa cho enzyme RNA polymerase phụ thuộc RNA từ virus gây bệnh tay chân miệng C-S8c1 (Foot and mouth disease virus RNA dependent RNA polymerase – FMDV C-S8c1 RdRp) được biến nạp vào *Escherichia coli* BL21, quá trình biểu hiện RdRp tái tổ hợp đã được trình bày trong nghiên cứu của Cristina Ferrer-Orta và cộng sự, 2004 [16]. Vi khuẩn *E. coli* BL21 có chứa plasmid mang gen mã hoá cho protein RdRp được nuôi trong môi trường LB (Luria broth) có bổ sung kanamycin (50 µg/mL) tại nhiệt độ 37°C và lắc 180 vòng/phút cho đến khi giá trị mật độ quang ở bước sóng 600 nm đạt giá trị 0,6 thì cho cảm ứng để tổng hợp protein. Chất cảm ứng IPTG (isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside) được thêm vào môi trường nuôi cấy với nồng độ cuối đạt 0,5mM và kiểm tra sự biểu hiện protein ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau 16°C, 28°C, 37°C trong các khoảng thời gian khác nhau 2, 4, 6, 16 giờ để chọn ra điều kiện nhiệt độ và thời gian thích hợp cho sự biểu hiện protein. Các tế bào sau nuôi cấy được ly tâm thu nhận tại điều kiện 4500 vòng/phút ở 20 phút trong 4°C. Các tế bào được phá vỡ bằng sóng siêu âm với thiết bị Ultrasonic Probe Sonicator Q500 (Thomas Scientific, USA) và thu dịch sau khi ly tâm tại 13000 vòng/phút ở 4°C. Protein FMDV RdRp tái tổ hợp với tag His trong dịch vi khuẩn được tinh sạch bằng hệ thống FPLC (Akta Prime Plus, GE Healthcare, USA) với kỹ thuật sắc ký ái lực Ni-NTA, sau đó tiếp tục được tinh sạch với kỹ thuật sắc ký lọc gel (Superdex 75 3,2/300) như được mô tả trong các nghiên cứu trước [17]. Sản phẩm protein tinh sạch được kiểm tra trên gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis).

#### 2.1.2. Cơ chất mạch khuôn RNA poly-rA, môi dT18, nucleotide UTP và pyrophosphatase

Mạch khuôn RNA được sử dụng trong phản ứng tổng hợp RNA là poly(rA) (khoảng 600 nt; Sigma–Aldrich). Môi sử dụng là các phân đoạn DNA cấu tạo bởi các Thymine với chiều dài 18 nucleotide - DNA oligo(dT) (Cosmo Genetech, Seoul, Hàn Quốc). Thành phần nucleotide UTP (Uracil triphosphate) được đánh dấu đồng vị phóng xạ tại đầu phosphate [ $\square$ - $^{32}$ P] UTP (3,000 Ci/mmol, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) và được sử dụng trong các thí nghiệm kiểm tra hoạt tính RNA polymerase. Enzyme pyrophosphatase tái tổ hợp (PPase) chịu nhiệt từ vi khuẩn *Pyrococcus* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Nucleic Acid Biochemistry Laboratory (Đại học Konkuk, Seoul, Hàn Quốc).

## 2.2. Phương pháp

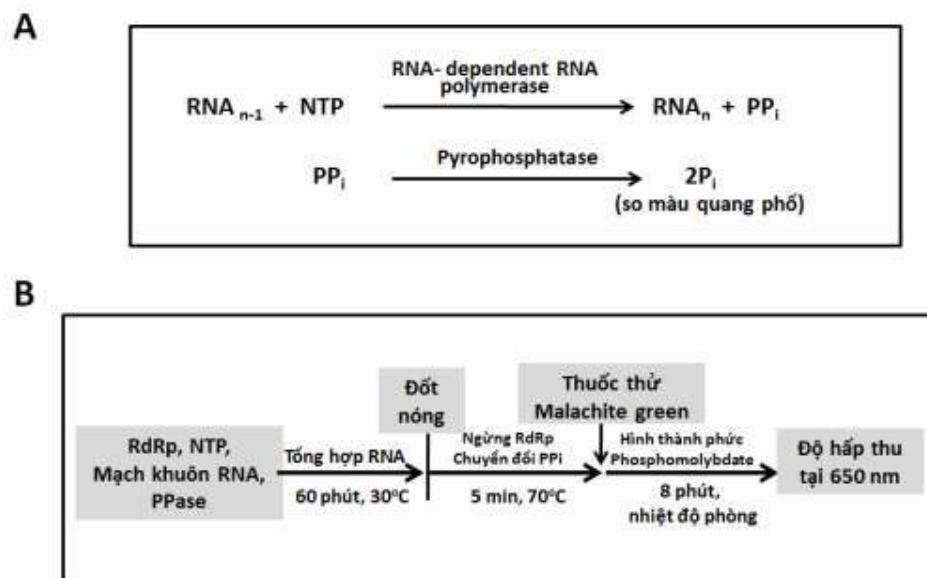
### 2.2.1. Xác định hoạt tính phân hủy UTP của FMDV RdRp tái tổ hợp

Phản ứng RNA polymerase được kiểm tra bằng phương pháp so màu thông qua gốc phosphate được tạo thành như trong nghiên cứu trước đây [18]. Do đó, hoạt tính phân hủy UTP hình thành nên các gốc phosphate sẽ ảnh hưởng đến kết quả thu nhận được. Hoạt tính phân hủy UTP được kiểm tra bằng phản ứng được thực hiện trong điều kiện chứa 25 mM Tris-HCl (pH 7,8), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM DTT, 20 U/ml chất ức chế RNase (Enzynomics, Daejeon, Korea), 0,1 μM mạch khuôn poly(rA) đã được bắt cặp với 1 μM mỗi DNA oligo(dT) (18 nt), 20 μM UTP có pha trộn với [<sup>32</sup>P] UTP (0,4 μCi/nmol), và 2 μM FMDV RdRp tái tổ hợp. Phản ứng được ủ trong các khoảng thời gian khác nhau (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120 phút) tại 30°C. Sản phẩm phản ứng được phân tích trên sắc ký bản mỏng TCL (Thin Chromatography Layer). Sản phẩm tạo thành được quan sát bằng việc nhận diện các tín hiệu thông qua thông qua thiết bị Cyclone phosphorimager (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

### 2.2.2. Xác định hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp bằng phương pháp đánh dấu đồng vị phóng xạ

Hoạt tính RNA polymerase được xác định thông qua khả năng tổng hợp chuỗi RNA polynucleic acid bằng phương pháp đồng vị phóng xạ thể hiện trên gel điện di. Hoạt tính RNA polymerase được kiểm tra trong môi trường phản ứng có chứa 25 mM Tris-HCl (pH 7,8), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM DTT, 20 U/ml chất ức chế RNase, 0,1 μM mạch khuôn poly(rA) đã được bắt cặp với 1 μM mỗi DNA oligo(dT) (18 nt), 200 μM UTP có pha trộn với [<sup>32</sup>P] UTP (0,4 μCi/nmol) và 2 μM FMDV RdRp tái tổ hợp. Phản ứng được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 60 phút và được ngừng bằng dung dịch quenching buffer có chứa 100 mM EDTA pH 8,0, 0,4% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, 0,1% bromophenol blue, 0,1% xylene cyanol. Hỗn hợp sau phản ứng được kiểm tra bằng sự điện di trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE) và nhận diện các tín hiệu thông qua thiết bị PhosphorImager. Các phản ứng đối chứng được thực hiện trong tự trong điều kiện không có enzyme FMDV RdRp hoặc không có mạch khuôn RNA poly(rA). Sản phẩm được tạo thành là các RNA có kích thước lớn hơn [<sup>32</sup>P] UTP và sẽ cho tín hiệu là các vạch di chuyển chậm sau quá trình điện di.

### 2.2.3. Xác định hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp bằng phương pháp so màu quang phổ



Hình 1: Sơ đồ kiểm tra hoạt tính RNA polymerase theo phương pháp so màu quang phổ. (A) Sơ đồ phản ứng RNA polymerase theo phương pháp so màu. (B) Trình tự phản ứng và dò tìm sự tổng hợp RNA của RdRp theo phương pháp so màu thông qua sự hình thành gốc phosphate với thuốc thử malachite green molybdate.

Sự tổng hợp RNA bằng enzyme RNA polymerase giải phóng ra các pyrophosphate (PP<sub>i</sub>) và việc thêm vào phản ứng enzyme pyrophosphatase sẽ phân hủy pyrophosphate để hình thành 2 gốc phosphate (P<sub>i</sub>). Do đó, xác định hàm lượng phosphate tạo thành sẽ gián tiếp xác định được hoạt tính của RNA polymerase [18]. Như vậy, phương pháp so màu được sử dụng để xác định hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp trải qua 2 giai đoạn: (a) tổng hợp RNA và giải phóng pyrophosphate (PP<sub>i</sub>); (b) phân hủy PP<sub>i</sub> thành phosphate (P<sub>i</sub>) (hình 1A). Hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp được thực hiện trong môi trường phản ứng có chứa 25 mM Tris-HCl (pH 7,8), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM DTT, 20 U/ml chất ức chế RNase, 3 μM *Pyrococcus* PPase, mạch khuôn poly(rA) đã được bắt cặp với mỗi DNA oligo(dT) (18 nt), 200 μM UTP và FMDV RdRp tái tổ hợp. Phản ứng được ủ ở nhiệt độ 30°C trong các khoảng thời gian nhất định. Sau thời gian ủ, hỗn hợp phản ứng được đun nóng tại 70°C trong 5 phút để ngừng phản ứng. Thuốc thử malachite green - molybdate (100 μl) được thêm vào 25 μl hỗn hợp phản ứng để hình thành phức hợp phosphomolybdate được hấp thụ ở bước sóng 650 nm [18, 19] (hình 1B). 10 μl của hỗn hợp sau phản ứng được điện di trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE) và quan sát sản phẩm tạo thành sau khi nhuộm với SYBR Gold.

#### 2.2.4. Kiểm tra hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp trong các điều kiện khác nhau

Hoạt tính của enzyme được kiểm tra trong các điều kiện khác nhau sẽ được thực hiện như phản ứng nêu trên và thay đổi các yếu tố tương ứng. Nồng độ của enzyme FMDV RdRp được thực hiện trong phản ứng với các nồng độ khác nhau 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 μM. Ảnh hưởng của hàm lượng mỗi lên sự tổng hợp RNA polymerase cũng được kiểm tra với 0,1 μM (20 μg/ml) mạch khuôn poly(rA) đã được bắt cặp với các hàm lượng mỗi DNA oligo (dT) (18 nt) khác nhau 0, 0,2, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μg/ml (tương ứng với nồng độ 0, 0,04, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2 μM). Nồng độ cơ chất mạch khuôn RNA cũng ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme, do đó, hoạt tính enzyme cũng được kiểm tra trong các phản ứng có sự thay đổi nồng độ cơ chất mạch khuôn poly(rA) đã được bắt cặp với mỗi DNA oligo(dT) (18 nt) ở các hàm lượng khác nhau 0, 5, 7,5, 10, 20, 30, 40, 60 μg/ml (tương ứng với các nồng độ 0, 0,025, 0,037, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3 μM). Thời gian phản ứng được kiểm tra bằng cách ủ hỗn hợp phản ứng trong các khoảng thời gian khác nhau 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 phút. Nồng độ cơ chất UTP cũng được khảo sát trong các phản ứng tương tự với sự thay đổi nồng độ UTP (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300 μM). Yếu tố ức chế hoạt động của RNA polymerase cũng được kiểm tra với các nồng độ khác nhau của 3'-Deoxy-5-Methyluridine-5'-Triphosphate – DMUT (0, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 μM) trong 60 phút tại 30°C. Hỗn hợp sau phản ứng được kiểm tra hàm lượng phosphate tạo thành bằng phương pháp so màu với thuốc thử malachite green - molybdate.

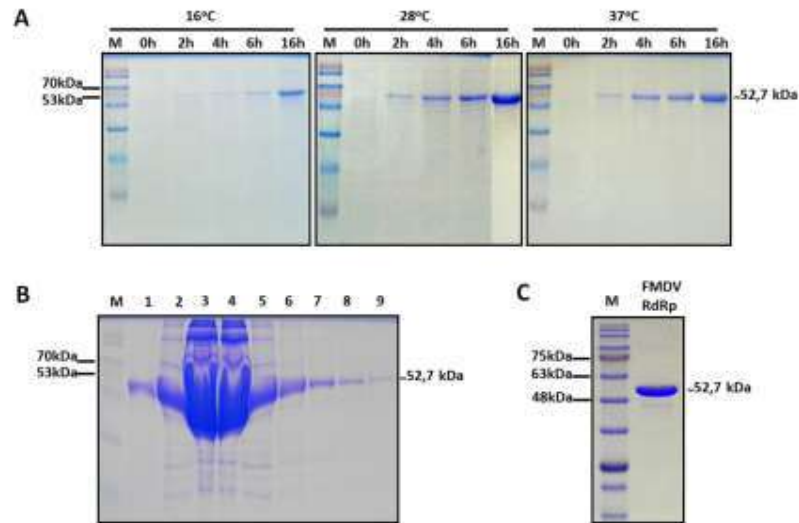
#### 2.2.4. Phân tích số liệu

Các số liệu thu nhận được từ các phản ứng thực nghiệm sau 3 lần lặp lại được phân tích thông qua phần mềm Prism để xác định các giá trị V<sub>max</sub>, k<sub>m</sub>, k<sub>cat</sub> theo phương trình Michaelis Menten  $v = \frac{V_{max} \cdot x}{k_m + x}$  với x là nồng độ cơ chất tham gia phản ứng;  $k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$  với E là nồng độ enzyme tham gia phản ứng; k<sub>obs</sub> (hằng số tốc độ phản ứng) theo công thức  $y = Y_{max}(1 - e^{-kx})$  với k là hằng số tốc độ phản ứng.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tinh sạch FMDV RdRp tái tổ hợp

Vi khuẩn *E. coli* BL21 mang gen mã hóa enzyme RNA polymerase phụ thuộc mạch khuôn RNA của virus gây bệnh tay chân miệng (FMDV RdRp) được kiểm tra khả năng biểu hiện trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau. Dịch vi khuẩn sau thời gian biểu hiện được thu nhận và tinh sạch bằng sắc ký ái lực. Sản phẩm protein tinh sạch được phân tích trên gel SDS-PAGE để kiểm tra khả năng biểu hiện (hình 2A). Kết quả phân tích cho thấy protein FMDV RdRp tái tổ hợp với trọng lượng phân tử được dự đoán khoảng 52,7 kDa thể hiện trong cả 3 điều kiện khảo sát, trong đó điều kiện nhiệt độ 16°C không phù hợp cho sự biểu hiện protein này với vạch lượng protein tạo ra không cao sau 16 giờ nuôi ủ. Nhiệt độ 37°C cũng cho thấy sự biểu hiện hàm lượng protein đáng kể sau 16 giờ, tuy nhiên, kết quả biểu hiện protein tốt nhất được quan sát thấy tại nhiệt độ 28°C và thời gian cần thiết cho sự biểu hiện protein là 16 giờ. Do đó, nhiệt độ 28°C và thời gian 16 giờ được chọn cho việc biểu hiện protein FMDV RdRp tái tổ hợp.



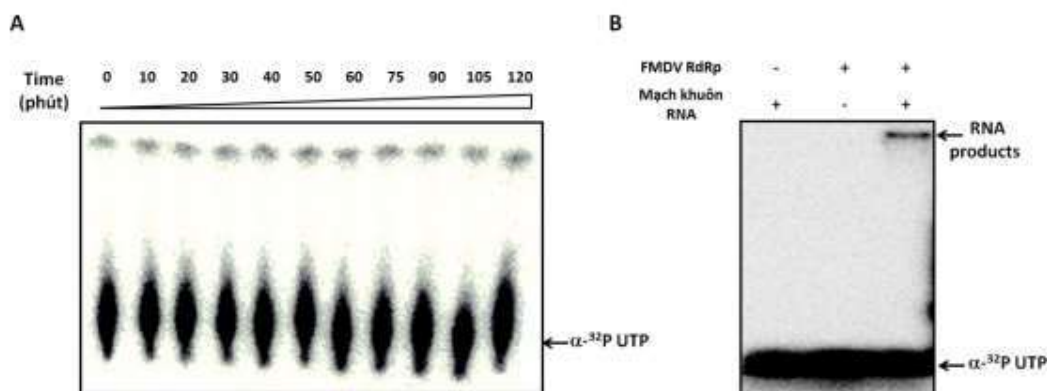
Hình 2: Kết quả tinh sạch enzyme FMDV RNA dependent RNA polymerase (FMDV RdRp). (A) Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian cảm ứng lên sự biểu hiện protein. (B) Phân tích trên SDS-PAGE 12% của enzyme FMDV RdRp sau khi tinh sạch bằng sắc ký ái lực Nickel<sup>2+</sup>, 1-9 là các phân đoạn thu được trong quá trình sắc ký ái lực Nickel<sup>2+</sup>. (C) Kết quả điện di trên SDS-PAGE 12% của FMDV RdRp sau khi tiếp tục tinh sạch với sắc ký lọc gel. M là thang chuẩn protein.

Protein FMDV RdRp tái tổ hợp được biểu hiện trong điều kiện thích hợp, tinh sạch bằng sắc ký ái lực và sắc ký lọc gel. Sản phẩm thu nhận được sẽ cho phân tích trên SDS-PAGE 12% (hình 2B và 2C). Sau quá trình tinh sạch bằng sắc ký ái lực, mức độ nhiễm tạp rất thấp (lane 2-5 của hình 2B), tuy nhiên khi kiểm tra ở hàm lượng cao, sự nhiễm tạp protein thể hiện rõ rệt với sự hiện diện của nhiều protein không mong muốn, do đó, protein cần được tinh sạch tiếp theo để thu nhận protein tốt nhất. Kỹ thuật sắc ký lọc gel được sử dụng để tinh sạch protein và kết quả phân tích trên gel SDS-PAGE cho thấy sự hiện diện của các vạch ngoài mong đợi là không đáng kể. Độ tinh sạch trong sản phẩm protein FMDV RdRp tái tổ hợp đạt trên 98% sau khi được kiểm tra bằng phần mềm gel analyzer. Độ tinh sạch của protein sẽ ảnh hưởng đến các phản ứng của enzyme và sự nhiễm tạp chất có thể gây ra các phản ứng không mong muốn của enzyme. Do đó, với độ tinh sạch trên 98%, FMDV RdRp tái tổ hợp được sử dụng trong các nghiên cứu về đặc tính của enzyme này.

### 3.2. Kiểm tra hoạt tính tổng hợp RNA của FMDV RdRp tái tổ hợp

FMDV RdRp tái tổ hợp được kiểm tra hoạt tính tổng hợp RNA trong phản ứng có chứa mạch khuôn là poly(rA) (~600 nt) đã được bắt cặp với môi DNA oligo(dT) (18 nt) với sự hiện diện của [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (0,4  $\mu$ Ci/nmol). Hoạt tính tổng hợp RNA của FMDV RdRp tái tổ hợp được quan sát thông qua sản phẩm tạo thành sau quá trình điện di trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE) có chứa tín hiệu phóng xạ của [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP. Tuy nhiên, để đảm bảo FMDV RdRp tái tổ hợp không bị tạp nhiễm bởi các enzyme phân hủy khác, khả năng phân giải UTP cũng được kiểm tra và quan sát kết quả thông qua phương pháp sắc ký bản mỏng (TCL) như được trình bày phía trên. Phản ứng được thực hiện trong các khoảng thời gian khác nhau (0 – 120 phút). Kết quả quan sát trên TCL cho thấy FMDV RdRp tái tổ hợp không có khả năng phân hủy UTP (hình 3A), với sản phẩm quan sát được không có sự thay đổi so với trước phản ứng (tại thời gian 0 phút, hình 3A). Điều này khẳng định các điều kiện phản ứng bố trí cho việc kiểm tra hoạt tính RNA polymerase với mạch khuôn là poly(rA) (~600 nt) sẽ không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác.

Hỗn hợp phản ứng kiểm tra hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp sau thời gian phản ứng (60 phút) được phân tích trên gel PAGE 15% và cho thấy có sự hiện diện của sản phẩm RNA như mong đợi trong điều kiện phản ứng có chứa enzyme và mạch khuôn tương ứng, sản phẩm RNA không được quan sát thấy trong các phản ứng không chứa enzyme hoặc không chứa mạch khuôn (hình 3B). Kết quả này đã thể hiện hoạt tính tổng hợp RNA phụ thuộc RNA của FMDV RdRp tái tổ hợp. Như vậy, FMDV RdRp tái tổ hợp thu được thích hợp để nghiên cứu cho các đặc tính về khả năng xúc tác của enzyme này trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3: Hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp. (A) Kiểm tra hoạt tính phân giải UTP của FMDV RdRp bằng sắc ký bản mỏng TCL (thin chromatography layer). (B) Kết quả kiểm tra hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp phân tích trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE).

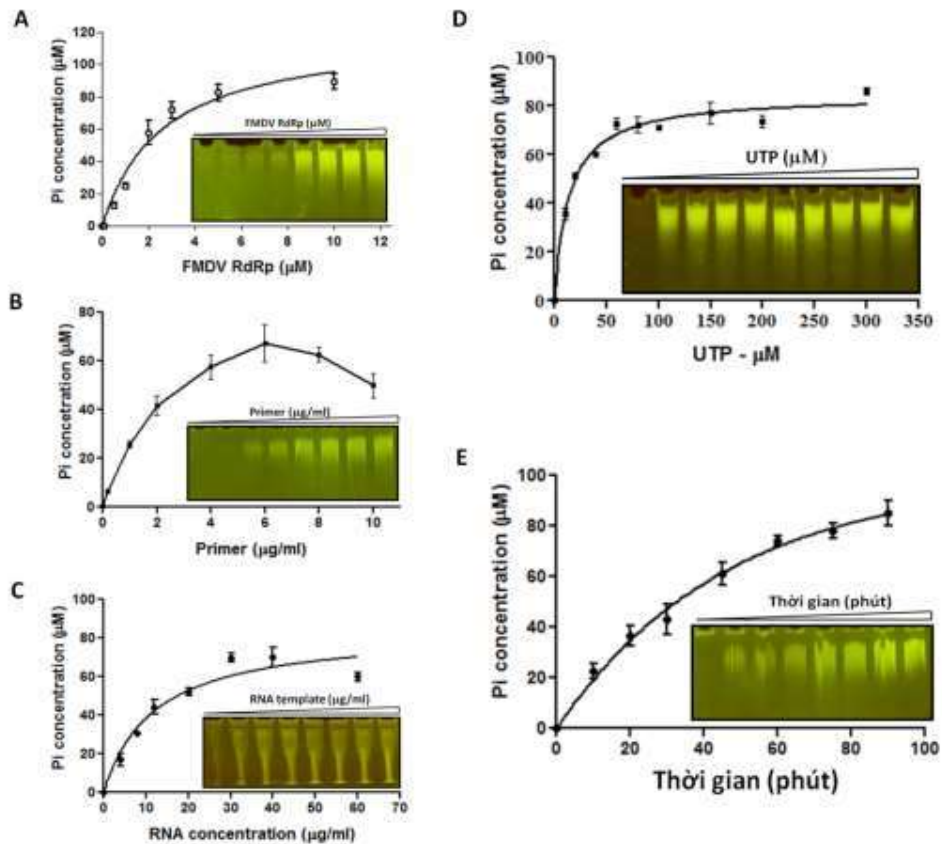
### 3.3. Xác định hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp

Động học phản ứng của FMDV RdRp tái tổ hợp được kiểm tra theo phương pháp so màu quang phổ. Điều kiện phản ứng với các nồng độ enzyme khác nhau (0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10  $\mu$ M FMDV RdRp) được kiểm tra để xác nhận nồng độ enzyme thích hợp cho kiểm tra động học của enzyme. Phản ứng được thực hiện trong 60 phút và đo lượng  $P_i$  tạo thành sau phản ứng theo sơ đồ thể hiện trong hình 1. Kết quả cho thấy sản phẩm tổng hợp RNA tạo thành tăng dần theo sự gia tăng nồng độ enzyme RdRp trong phản ứng. Kết quả phân tích trên gel PAGE cũng cho thấy sản phẩm RNA được tạo thành khi có sự hiện diện của enzyme và sản phẩm tạo thành rõ rệt khi nồng độ enzyme tham gia phản ứng trên 2 $\mu$ M (Hình 4A). Phân tích với phần mềm Prism, nồng độ 2,5  $\mu$ M RdRp cho kết quả đạt 50% hoạt tính tổng hợp RNA tối đa. Do đó, nồng độ 2,5  $\mu$ M của enzyme RdRp được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất mạch khuôn RNA và thời gian lên hoạt tính của enzyme.

Mạch khuôn RNA poly(rA) đã được bắt cặp với môi DNA oligo (dT) (18 nt) được sử dụng để kiểm tra hoạt tính của enzyme, hàm lượng môi DNA oligo(dT) (18 nt) được kiểm tra ở các nồng độ khác nhau trên 0,1  $\mu$ M (20  $\mu$ g/ml) như được trình bày ở trên. Kết quả cho thấy hoạt tính tổng hợp RNA đạt cao nhất khi hàm lượng môi bắt cặp với mạch khuôn ở nồng độ 6  $\mu$ g/ml (Hình 4B) và không quan sát thấy sự biểu hiện hoạt tính khi không có sự hiện diện của môi. Điều này cho thấy sự phụ thuộc môi của enzyme này trong quá trình biểu hiện hoạt tính polymerase. Sự gia tăng hàm lượng môi cho thấy sự giảm hoạt tính tổng hợp RNA, nguyên nhân là do sự tự bắt cặp của môi với mạch khuôn và hạn chế không gian của phản ứng tổng hợp RNA. Do đó, điều kiện nồng độ môi 6  $\mu$ g/ml (tương ứng 1,2  $\mu$ M) được sử dụng để bắt cặp với 20  $\mu$ g/ml (0,1  $\mu$ M) RNA poly(rA) để tạo thành cơ chất mạch khuôn RNA cho các phản ứng tổng hợp RNA tiếp theo.

Hoạt tính RNA polymerase được kiểm tra trong các phản ứng có cơ chất mạch khuôn RNA đã được bắt cặp với môi với các nồng độ khác nhau. Phản ứng được xác định sau 60 phút và sản phẩm RNA tổng hợp được quan sát sau quá trình điện di trên gel không biến tính (PAGE) (Hình 4C). Phân tích với phần mềm Prism, kết quả cho thấy hoạt tính tổng hợp RNA cao nhất khi mạch khuôn RNA đạt trên 20  $\mu$ g/ml (tương ứng với 0,1  $\mu$ M). Nồng độ RNA mạch khuôn này được sử dụng cho các nghiên cứu về sự tổng hợp RNA của enzyme FMDV RdRp. Khả năng tổng hợp UTP lên mạch khuôn RNA được xác định trong các phản ứng có chứa các nồng độ cơ chất UTP khác nhau. Phân tích với phần mềm Prism, theo phương trình Michaelis-Menten, vận tốc phản ứng đạt cực đại khi giải phóng được 84  $\mu$ mol/mL.giờ phosphate ( $P_i$ ) tương ứng với  $V_{max}$  tổng hợp UTP là 42  $\mu$ mol/mL.giờ do sự tổng hợp 1 UTP sẽ giải phóng ra 1  $P_i$  và sẽ tương ứng với 2 gốc phosphate (Hình 4D). Giá trị  $k_m$  và  $k_{cat}$  cũng được xác định tương ứng với 13,6  $\mu$ M và 0,28  $min^{-1}$ . Ngoài các giá trị thể hiện cho khả năng kết nối và xúc tác của enzyme, tỷ lệ chuyển đổi cơ chất cũng được quan tâm trong xác định động học của enzyme, time-course của FMDV RdRp cũng đã được xác định trong các khoảng thời gian khác nhau (0, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 phút), sản phẩm RNA tạo thành được quan sát trên gel PAGE và hàm lượng  $P_i$  được xác định bằng phương pháp so màu (hình 4E). Phân tích với phần mềm Prism, hằng số tốc độ phản ứng  $k_{obs}$  được xác định là 0,022  $min^{-1}$ , kết quả

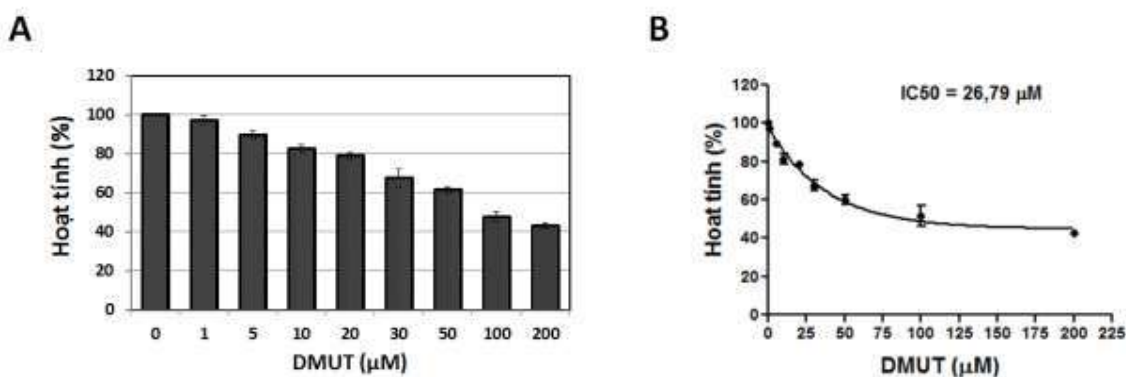
thu được tương tự như kết quả của hằng số tốc độ phản ứng đã được xác định trong nghiên cứu của Hanh Thi Dieu Nguyen và cộng sự, 2013 [18].



Hình 4: Hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp. (A) Ảnh hưởng của nồng độ enzyme lên phản ứng RNA polymerase. (B) Ảnh hưởng của nồng độ primer lên sự tổng hợp RNA của enzyme tái tổ hợp. (C) Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất mạch khuôn RNA lên phản ứng. (D) Ảnh hưởng của thời gian phản ứng lên quá trình tổng hợp RNA. Kết quả phân tích sản phẩm phản ứng bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE) và quan sát sau nhuộm với SYBR Gold (các hình ảnh bên trong đồ thị)

### 3.4. Ảnh hưởng của các chất ức chế lên hoạt tính tổng hợp RNA polymerase của FMDV RdRp tái tổ hợp

Hoạt tính RNA polymerase của FMDV RdRp cũng được kiểm tra trong sự hiện diện của chất ức chế cho hoạt tính của enzyme. DMUT (3'-Deoxy-5-Methyluridine-5'-Triphosphate) có cấu trúc tương đồng với UTP và là chất ức chế cạnh tranh với UTP khi tham gia vào sự tổng hợp RNA của FMDV RdRp, sự gắn DMUT vào mạch RNA sẽ ức chế việc tổng hợp mạch tiếp theo do thiếu nhóm -OH tại đầu 3' cho việc tổng hợp tiếp theo [10]. Hoạt tính RNA polymerase giảm dần theo sự tăng dần của chất ức chế cạnh tranh DMUT và hoạt tính còn 51,2% khi nồng độ DMUT là 100 μM và còn 42,8% khi nồng độ DMUT tăng lên 200 μM (Hình 5A). Phân tích với phần mềm Prism với các nồng độ DMUT trong phản ứng khác nhau, kết quả cho thấy nồng độ DMUT để ức chế 50% hoạt tính RNA polymerase của FMDV là 26,79 μM (Hình 5B). Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu trước đây với nồng độ ức chế 50% là 37,3 μM [18].



Hình 5: Ảnh hưởng của các chất ức chế DMUT lên hoạt tính tổng hợp RNA polymerase của RdRp trong các điều kiện nồng độ khác nhau (A) và giá trị IC<sub>50</sub> (B)

#### 4. KẾT LUẬN

Virus gây bệnh tay chân miệng với nhiều kiểu gen khác nhau, gây bệnh trên nhiều đối tượng động vật khác nhau, đặc biệt là trên động vật móng guốc, làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến kinh tế của ngành chăn nuôi. Hiện nay, các vaccine đa hiệu cho việc phòng ngừa vẫn chưa được chứng nhận và mục tiêu để kiểm soát virus này là enzyme có vai trò quan trọng trong sự nhân lên của virus RNA polymerase phụ thuộc RNA - RdRp. Việc nghiên cứu các đặc tính sinh hóa của RdRp sẽ góp phần hiểu rõ hơn hoạt động của enzyme này trong chu trình sống của virus cũng như hỗ trợ việc sàng lọc các loại thuốc tiềm năng cho việc phòng ngừa và điều trị bệnh. Để xác định các đặc tính sinh hóa của RdRp, protein RdRp tái tổ hợp của FMDV đã được biểu hiện và tinh sạch với kết quả tinh sạch hơn 98%. Hoạt tính enzyme trong các điều kiện nồng độ môi khác nhau cho thấy hoạt tính tổng hợp RNA phụ thuộc môi của enzyme và các giá trị về động học của enzyme cũng được xác nhận. Các giá trị  $V_{max}$ ,  $k_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{obs}$  của enzyme cũng được tính toán. Các giá trị IC<sub>50</sub> của chất ức chế cạnh tranh DMUT cũng được xác định. Kết quả đạt được tạo cơ sở cho việc sàng lọc các loại thuốc tiềm năng trong tương lai.

#### LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu này được thực hiện tại phòng thí nghiệm Nucleic Acid Biochemistry và phòng thí nghiệm Global, đại học Konkuk, Seoul, Hàn Quốc. Do đó, tôi xin chân thành cảm ơn giáo sư Kang Lin-Woo, giáo sư Kim Dong-Eun đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexandersen, S. and N. Mowat, Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. 288: p. 9-42.
- Ellingham, M., et al., Selection and characterization of RNA aptamers to the RNA-dependent RNA polymerase from foot-and-mouth disease virus. *RNA*, 2006. 12(11): p. 1970-9.
- Du, J., et al., Effective inhibition of foot-and-mouth disease virus (FMDV) replication in vitro by vector-delivered microRNAs targeting the 3D gene. *Virol J*, 2011. 8: p. 292.
- Li, C., et al., Foot-and-mouth disease virus type O specific mutations determine RNA-dependent RNA polymerase fidelity and virus attenuation. *Virology*, 2018. 518: p. 87-94.
- Grubman, M.J. and B. Baxt, Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004. 17(2): p. 465-93.
- Knowles, N.J. and A.R. Samuel, Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 2003. 91(1): p. 65-80.
- Mason, P.W., M.J. Grubman, and B. Baxt, Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res*, 2003. 91(1): p. 9-32.



8. Paton, D.J., et al., Selection of foot and mouth disease vaccine strains--a review. *Rev Sci Tech*, 2005. 24(3): p. 981-93.
9. Grubman, M.J., Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals*, 2005. 33(4): p. 227-34.
10. Durk, R.C., et al., Inhibitors of foot and mouth disease virus targeting a novel pocket of the RNA-dependent RNA polymerase. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e15049.
11. Ryan, M.D., G.J. Belsham, and A.M. King, Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Virology*, 1989. 173(1): p. 35-45.
12. De Clercq, E., Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(1): p. 13-25.
13. Menendez-Arias, L., Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res*, 2008. 134(1-2): p. 124-46.
14. Saez-Alvarez, Y., et al., Development of a fluorescence-based method for the rapid determination of Zika virus polymerase activity and the screening of antiviral drugs. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 5397.
15. Smertina, E., et al., Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases: Evolution, Structure, Protein Dynamics, and Function. *Front Microbiol*, 2019. 10: p. 1280.
16. Cristina Ferrer-Orta, A.A., Rosa Perez-Luque, Cristina Escarmis, Esteban Domingo, Nuria Verdaguier, Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA-dependent RNA Polymerase and Its Complex with a Template-Primer RNA. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2004. 279(45): p. 47212-47221.
17. Hanh Thi Dieu Nguyen, N.-A.N., Gia-Buu Tran, Tan-Viet Pham, The DEAD-box protein CshA in *Staphylococcus aureus* contains ATP-independent DNA strand annealing and exchange activities. *Journal of Sciences and Technology-Industrial University in Ho Chi Minh City*, 2019. (in press).
18. Nguyen, H.T.D., An efficient colorimetric assay for RNA synthesis by viral RNA-dependent RNA polymerases, using thermostable pyrophosphatase. *Analytical biochemistry*, 2013. v. 434(no. 2): p. pp. 284-286-2013 v.434 no.2.
19. Feng, J., et al., An improved malachite green assay of phosphate: mechanism and application. *Anal Biochem*, 2011. 409(1): p. 144-9.

*Ngày nhận bài: 30/12/2019*

*Ngày chấp nhận đăng: 25/02/2020*