

TỐI ƯU QUY TRÌNH PHÂN LẬP HỆ GEN VIRUS BK TỪ MẪU MÁU, NƯỚC TIỂU CỦA BỆNH NHÂN SAU GHEP THẬN

ĐINH THỊ THU HẰNG⁽¹⁾, ĐINH THỊ LINH^(1,2), HOÀNG XUÂN SỬ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

BK polyomavirus được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1971 ở một bệnh nhân ghép thận bị rối loạn chức năng thận ghép với tắc nghẽn niệu quản sau ghép thận, được đặt tên là virus BK (BKV) theo tên viết tắt của bệnh nhân này [3]. BKV được ghi nhận có tỷ lệ huyết thanh cao ở người khỏe mạnh, kháng thể chống lại BKV có thể được phát hiện ở hơn 90% trẻ em trước 10 tuổi, cho thấy tình trạng nhiễm BKV nguyên phát không triệu chứng xảy ra trong thời thơ ấu, khi các kháng thể truyền từ mẹ suy yếu [4]. Sau khi nhiễm trùng nguyên phát, BKV vẫn tồn tại tiềm ẩn trong tế bào biểu mô thận, nếu vật chủ bị ức chế miễn dịch, BKV có thể được kích hoạt trở lại và gây bệnh (viêm bàng quang xuất huyết, hẹp niệu quản...), thậm chí dẫn đến bệnh thận do virus BK (BK virus-associated nephropathy, BKVN) [5, 6]. BKVN là một trong những nguyên nhân chính gây rối loạn chức năng mảnh ghép và thải ghép [6].

BK polyomavirus thuộc họ *Polyomaviridae*, là một loại virus DNA không có vỏ ngoài, đường kính 40-45 nm. Hệ gen là DNA sợi kép kích thước khoảng 5,1 kb được bao quanh bởi các histon có nguồn gốc tế bào chủ [7], được phân chia theo chức năng thành ba vùng. Vùng kiểm soát không mã hóa (non-coding control region - NCCR) quy định sự biểu hiện của các gen vùng kiểm soát sớm và muộn của virus cùng với sự biệt hóa và hoạt hóa của tế bào chủ. Vùng mã hóa sớm (the early viral gene region - EVGR) mã hóa các protein điều hòa sớm là kháng nguyên T lớn và t nhỏ, giúp chuyển tế bào chủ sang pha S để sử dụng DNA polymerase của tế bào giúp sao chép virus. Vùng gen muộn (the late viral gene region - LVGR) mã hóa các protein capsid VP1, VP2 và VP3. Các vùng mã hóa muộn chỉ được biểu hiện sau khi virus bắt đầu sao chép DNA, vì chúng mã hóa các protein cấu trúc tham gia vào quá trình đóng gói virus cũng như agnoprotein [8]. Agnoprotein ngăn chặn hoạt động của kháng nguyên T và protein VP1, can thiệp vào quá trình sửa chữa DNA và điều hòa chu kỳ tế bào, hỗ trợ quá trình lắp ráp capsid của virus VP1 tương tác với các thụ thể tế bào và thúc đẩy sự xâm nhập của virus [9, 10]. Trong đó, vùng gen mã hóa protein VP1 có sự không đồng nhất về mặt di truyền, là cơ sở của 4 kiểu gen chính của BKV là I, II, III, IV và các subtype [11].

Hiện nay ở nước ta, các nghiên cứu về quy trình phân lập hệ gen BKV từ các nguồn mẫu bệnh phẩm khác nhau ở bệnh nhân ghép thận còn hạn chế, điều này dẫn đến đòi hỏi thời gian và chi phí để nghiên cứu số lượng lớn các hệ gen BKV. Do đó, chúng tôi tiến hành công trình này với mục tiêu nghiên cứu tối ưu hóa quy trình phân lập toàn bộ hệ gen BKV từ mẫu huyết tương, nước tiểu của bệnh nhân sau ghép thận.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh phẩm bao gồm huyết tương (10 mẫu, mã ký hiệu BK_P) và nước tiểu (40 mẫu, mã ký hiệu BK_U) được thu thập từ các bệnh nhân được giám sát, theo dõi điều trị sau ghép thận tại Bệnh viện Quân y 103 (năm 2019-2020). Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu gồm có QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen, Đức), Phusion High-Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), primers, probe (IDT, Mỹ), kit tách chiết DNA tổng số GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit, các kit tinh sạch GeneJET Gel Extraction kit, GeneJET PCR Extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), thuốc nhuộm ethidium bromua.

2.2. Tách chiết và định lượng nồng độ BKV-DNA

Mẫu huyết tương, nước tiểu thể tích 200 μ l (mẫu máu chống đông với ống K2/EDTA, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút, thu huyết tương và mẫu nước tiểu ly tâm 3.200 vòng/ phút trong 30 phút, thu cặn) được sử dụng để tách chiết DNA tổng số theo quy trình bộ GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit. Tải lượng BKV-DNA trong các mẫu bệnh phẩm được xác định theo quy trình real-time PCR BKV-DNA trên bệnh nhân ghép thận của Học viện Quân y sử dụng vùng gen đích *VPI* được tóm tắt như sau: Thành phần phản ứng gồm 1X QuantiTect Probe PCR Master Mix; 0,2 μ M mỗi xuôi, mỗi ngược mỗi loại; 0,05 μ M probe; 9 μ l DNA khuôn, với chu trình nhiệt (50°C/ 2 phút) (95°C/ 15 phút), tiếp theo là 45 chu kỳ (94°C/ 15 giây, 58°C/ 60 phút) được thực hiện trên máy real-time PCR Rotor-Gene Q (Qiagen, Đức) [12].

2.3. Tối ưu phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ hệ gen của BKV

Cặp mồi wBK_a(F+R) sử dụng để khuếch đại toàn bộ hệ gen BKV được thiết kế dựa trên trình tự tham chiếu BKV chủng Dunlop mã số V01108.1, kết quả khuếch đại được so sánh với bộ mồi tham chiếu BkFuBA(IF+IR) theo tác giả Hiroshi I. và cộng sự [13] (bảng 1).

Hệ gen của BKV từ DNA tổng số tách chiết từ mẫu huyết tương, nước tiểu bệnh nhân sau ghép thận được khuếch đại bằng phản ứng long-range PCR qua quá trình tối ưu hóa với các thành phần: 1X Phusion High-Fidelity Master Mix; 0,5 μ M mỗi xuôi, mỗi ngược mỗi loại; 3-5 μ l DNA khuôn và bổ sung nước khử ion vừa đủ thể tích 50 μ l. Quá trình khuếch đại được thực hiện trên máy PCR Mastercycler proS (Eppendorf, Đức) với hai chu trình nhiệt, với mục đích tối ưu hóa chu trình phản ứng. Chu trình nhiệt 1: Biến tính 98°C/ 2 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ (98°C/ 20 giây; 55°C/ 20 giây; 72°C/ 4 phút), sau đó hoàn thành kéo dài chuỗi ở 72°C trong 10 phút [13] (Chu trình nhiệt tham chiếu); Chu trình nhiệt 2: Biến tính 98°C/30 giây, tiếp theo là 30-35 chu kỳ (98°C/ 10 giây; 58°C/ 20 giây; 72°C/ 2 phút), sau đó hoàn thành kéo dài chuỗi ở 72°C trong 4-6 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2% trong đệm TBE 0,5X, điều kiện 110V/65 phút, nhuộm ethidium bromua, chụp ảnh và lưu kết quả trên máy UVP Eppendorf.

Bảng 1. Các môi sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Vị trí*	Nguồn
1	BkFuBA_IF	GGGGGATCCAGATGAAAACCTT AGGGGCT	1731- 1759	[13]
2	BkFuBA_IR	GGATCCCCCATTTCTGGGTTTAG GAAGCAT	1739- 1710	[13]
3	wBK_aF	GAGGCTGCTGCTGCCACAGGAT TTTCAGT	675- 703	Nghiên cứu này
4	wBK_aR	AGCAGCCTCAGATACACTGGCA ACTAGGTC	683- 654	Nghiên cứu này

* Vị trí trình tự Nucleotide theo hệ gen BKV chủng Dunlop, mã số: V01108.1

2.4. Kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại toàn bộ hệ gen BKV

Sản phẩm PCR đúng kích thước khoảng 5,1 kb được tinh sạch, kiểm tra bằng enzym giới hạn *XbaI* và *EcoRI*, giải trình tự Sanger với các môi sử dụng trong nghiên cứu (bảng 1). Kết quả giải trình tự được so sánh với các trình tự tham chiếu của BKV trên Genbank bằng phần mềm BLAST (NCBI).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tách chiết và định lượng nồng độ BKV-DNA trong huyết tương, nước tiểu

BKV-DNA của 50 mẫu bệnh phẩm sau khi tách chiết được định lượng nồng độ theo quy trình real-time PCR BKV-DNA sử dụng vùng gen đích *VPI* có kết quả ở mẫu huyết tương với giá trị trung bình $4,27E+06$ (10^2 - 10^7 copy/ml), trong khi đó mẫu nước tiểu nồng độ cao hơn, đạt trung bình là $5,71E+10$ (10^7 - 10^{11} copy/ml).

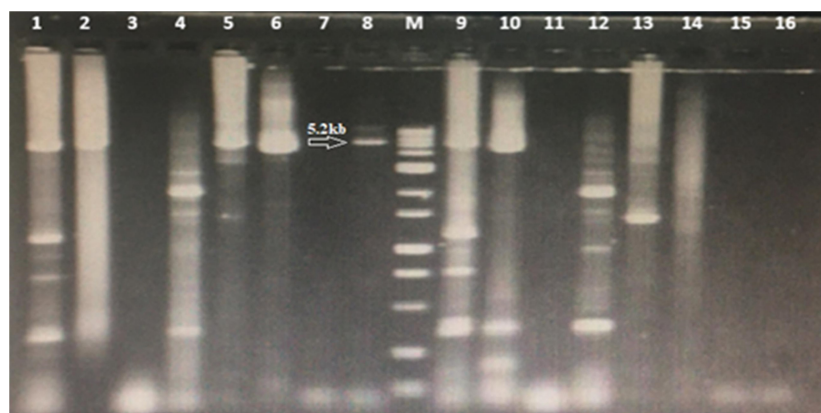
3.2. Tối ưu phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ hệ gen BKV

Phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ hệ gen BKV từ mẫu huyết tương, nước tiểu được tối ưu với hai bộ môi là wBk_a(F+R) và BkFuBA(IF+IR). Kết quả hình 1 cho thấy, với chu trình nhiệt 1, xuất hiện sản phẩm khuếch đại đúng kích thước mong muốn từ DNA mẫu nước tiểu với cả hai bộ môi, trong đó với môi tham chiếu BkFuBA(F+R) cho sản phẩm bằng rõ hơn (do thực hiện với số chu kỳ nhiều hơn - 40 chu kỳ), còn 02 mẫu huyết tương (nồng độ 10^4 - 10^5 copy/ml), chỉ có 01 mẫu huyết tương khuếch đại thành công hệ gen với môi tham chiếu (nồng độ khoảng 10^5 copy/ml). Sở dĩ có kết quả như vậy vì chu trình nhiệt 1 được thiết kế tối ưu cho bộ môi tham chiếu BkFuBA(F+R).

Ở chu trình nhiệt 2, chỉ có bộ môi thiết kế wBk_a(F+R) cho sản phẩm khuếch đại đúng tính toán lý thuyết, kết quả khuếch đại được 02 mẫu nước tiểu lên bằng rõ (tương đương sản phẩm khuếch đại sử dụng chu trình nhiệt 1 với bộ môi tham chiếu BkFuBA(F+R)) và 01 mẫu huyết tương lên bằng mờ, tuy nhiên xuất hiện nhiều băng phụ. Kết quả so sánh cho thấy với môi nghiên cứu wBk_a(F+R) ở cả hai chu trình nhiệt 1 và 2, mẫu nồng độ trung bình (khoảng 10^5 copy/ml) đều khuếch đại thành công hệ gen BKV, trong khi đó môi tham chiếu BkFuBA(F+R) chỉ khuếch đại thành công với chu trình nhiệt 1.

Bảng 2. Thành phần phản ứng long-range PCR

STT	Thành phần	Nồng độ cuối	Thể tích (μl)
1	2X Phusion HF Master Mix	1X	25
2	wBK_a(F+R)/ BKFuBA(IF+IR)	0,5 μM	5
3	H ₂ O	-	-
4	DNA		3-5
Tổng			50



Hình 1. Kết quả PCR với bộ môi thiết kế wBk_a(F+R) và môi tham khảo BkFuBA(F+R)

M: Thang chuẩn DNA 1kb,

1-8: Chu trình nhiệt 1 với bộ môi wBk_a(F+R) (giếng 1-4), bộ môi BkFuBA(F+R) (giếng 5-8),

9-16: Chu trình nhiệt 2 với bộ môi wBk_a(F+R) (giếng 9-12), bộ môi BkFuBA(F+R) (giếng 13-16)

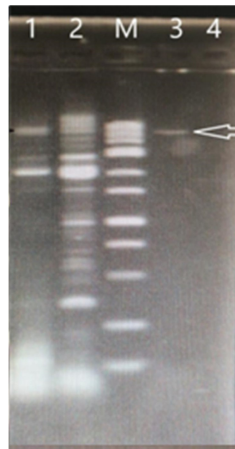
(1-2, 5-6, 9-10, 13-14) Mẫu nước tiểu: BK147UF, BK579U;

(3-4, 7-8, 11-12, 15-16) Mẫu huyết tương: BK263P, BK557P.

Như vậy, với bộ môi tham chiếu BkFuBA(F+R), quá trình khuếch đại phản ứng với tổng thời gian khoảng 210 phút, thực hiện khuếch đại trong 40 chu kỳ, do đó kết quả cho thấy với mẫu huyết tương nồng độ trung bình (khoảng 10^5 copy/ml) vẫn cho sản phẩm khuếch đại thành công. Ở bộ môi thiết kế wBk_a(F+R) với chu trình nhiệt có nhiệt độ gần môi 58°C , thời gian trong giai đoạn kéo dài ngắn hơn (2 phút), số chu kỳ khuếch đại ít hơn (30 chu kỳ), rút ngắn thời gian phản ứng xuống còn 120 phút cũng như hạn chế những sản phẩm PCR lỗi. Tuy nhiên, với sản phẩm PCR từ mẫu có nồng độ BKV-DNA trung bình (giếng số 12 - nồng độ 10^5 copy/ml) cho kết quả sản phẩm băng mờ và nhiều băng phụ, nên cần tối ưu về chu trình nhiệt.

3.3. Tối ưu chu trình nhiệt

Kết quả so sánh ở hình 1 cho thấy, với những mẫu nồng độ trung bình (mẫu huyết tương nồng độ khoảng 10^5 copy/ml), cho sản phẩm mờ hoặc không có sản phẩm, do đó chu trình nhiệt cần được tối ưu lại. So sánh hai chu trình nhiệt đã sử dụng, cho thấy sự khác biệt giữa số chu kỳ phản ứng, thời gian ở giai đoạn biến tính ban đầu, kéo dài chuỗi và giai đoạn hoàn thành kéo dài cuối cùng. Khảo sát các thông số này đã thu được chu trình nhiệt tối ưu như sau: $98^{\circ}\text{C}/30$ giây, tiếp theo là 35 chu kỳ ($98^{\circ}\text{C}/10$ giây; $58^{\circ}\text{C}/20$ giây; $72^{\circ}\text{C}/2$ phút), hoàn thành kéo dài chuỗi ở 72°C trong 6 phút.



Hình 2. Tối ưu chu trình nhiệt trên hai mẫu huyết tương với môi wBk_a(F+R), và BkFuBA_(F+R)

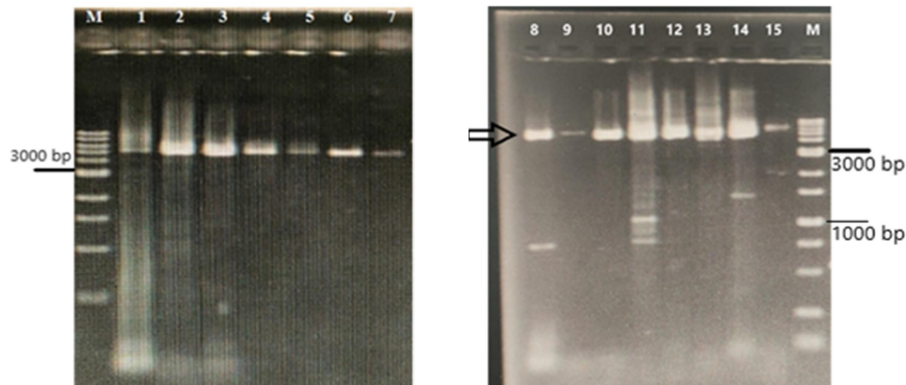
M: Thang DNA chuẩn 1kb, 1+2: môi wBk_a(F+R); 3+4: môi BkFuBA_(F+R)

Kết quả hình 2 cho thấy với chu trình nhiệt tối ưu của môi thiết kế wBk_a(F+R) đã khuếch đại thành công mẫu huyết tương có nồng độ trung bình với băng sáng rõ, còn với môi tham chiếu BkFuBA_(F+R) cho sản phẩm khuếch đại mờ hơn hoặc không có sản phẩm khuếch đại.

3.4. Thực hiện long-PCR khuếch đại hệ gen BKV từ các mẫu bệnh phẩm

Kết quả minh họa hình 3 cho thấy sản phẩm khuếch đại đều lên băng kích thước khoảng 5,1 kb. Với chu trình nhiệt tối ưu, bước đầu chúng tôi đã khuếch đại thành công hệ gen BKV trong đó có 37 mẫu nước tiểu và 4 mẫu huyết tương. Số lượng mẫu khuếch đại được hệ gen BKV thành công chiếm tỷ lệ khá cao trên tổng số mẫu thực hiện (41/50 mẫu, 82%).

Trong nghiên cứu này, mẫu huyết tương được sử dụng có nồng độ khoảng 10^2 - 10^7 copy/ml, mẫu nước tiểu từ 10^7 - 10^{11} copy/ml. Với các mẫu huyết tương nồng độ khoảng 10^5 copy/ml, mẫu nước tiểu nồng độ từ 10^7 copy/ml cho sản phẩm khuếch đại thành công, đảm bảo khuếch đại được toàn bộ hệ gen BKV.



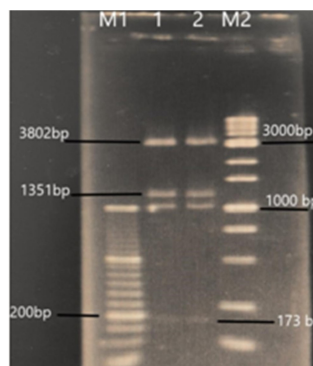
Hình 3. Sản phẩm tổng hợp hệ gen BKV với bộ mồi thiết kế (wBK_a(F+R)), thành phần và chu trình nhiệt tối ưu, trên gel agarose 1,2%

M: Thang DNA chuẩn 1kb, 1-14: Mẫu bệnh phẩm nước tiểu, 15: Mẫu bệnh phẩm huyết tương.

3.5. Kiểm tra sản phẩm khuếch đại toàn bộ hệ gen BKV bằng enzym giới hạn và giải trình tự

Sản phẩm PCR đúng kích thước 5,1 kb được tinh sạch, kiểm tra bằng enzym giới hạn *XbaI* và *EcoRI*. Nếu sản phẩm khuếch đại đúng hệ gen BKV, khi cắt hoàn toàn đồng thời bằng hai enzym giới hạn này sẽ cho ba băng có kích thước là 173, 1178 và 3802 bp, do *XbaI* có hai điểm cắt tại vị trí nucleotide 1668, 3019 bp còn *EcoRI* có một điểm cắt tại vị trí nucleotide 1841 bp (vị trí nucleotide theo chủng Dunlop mã số V01108.1).

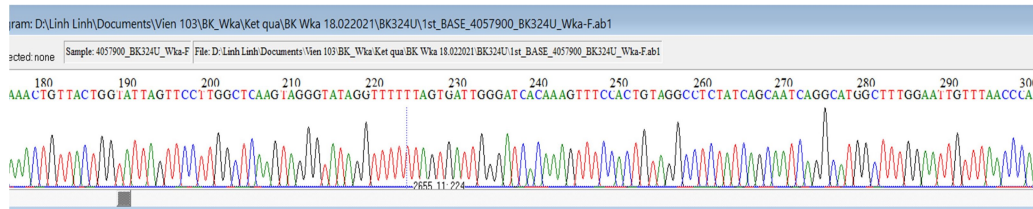
Kết quả hình 4 cho thấy sản phẩm thu được gồm bốn băng có kích thước lần lượt là 173, 1178, 1351 và 3802 bp. Kết quả cho thấy có ba băng đúng như tính toán lý thuyết là 173, 1178 và 3802 bp, tuy nhiên xuất hiện thêm một băng kích thước là 1351 bp, băng này xuất hiện do enzym *EcoRI* cắt không hoàn toàn, chỉ có enzym *XbaI* cắt. Như vậy, chúng tôi đã kiểm tra thành công sản phẩm khuếch đại hệ gen BKV bởi enzym giới hạn *XbaI* và *EcoRI*.



Hình 4. Kết quả kiểm tra sản phẩm bằng enzym giới hạn

M1: Marker 50bp; 1+2: Sản phẩm cắt mẫu PCR BK551U, BK579U; M2: Marker 1kb

Các sản phẩm PCR lên băng khoảng 5,1 kb, kiểm tra bằng enzym giới hạn thành công được giải trình tự Sanger. Phân tích, so sánh với trình tự tham chiếu trên Genbank, cho thấy sự tương đồng hơn 99,7% với các trình tự tham chiếu, chứng tỏ các mẫu nghiên cứu phân lập được là hệ gen của BKV.



Hình 5. Kết quả giải trình tự môi wBK_aF trên hệ gen BKV

4. BÀN LUẬN

Hiện nay, bệnh thận do BKV có thể gặp ở người nhận ghép thận với tỷ lệ từ 2 - 10%, và có tới 40 - 90% số bệnh nhân này bị mất chức năng thận ghép vĩnh viễn do bị chẩn đoán muộn [2]. Việc phân lập toàn bộ hệ gen đầy đủ của BKV từ mẫu máu, nước tiểu của bệnh nhân sau ghép thận có vai trò quan trọng, góp phần cung cấp thêm cơ sở dữ liệu trình tự hệ gen có giá trị trong nghiên cứu chẩn đoán và điều trị BKV ở bệnh nhân sau ghép thận ở Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu được quy trình phân lập hệ gen BKV, có thể khuếch đại thành công DNA hệ gen BKV từ các mẫu huyết tương với nồng độ trung bình (10^5 copy/ml), nước tiểu (10^7 copy/ml) với chu trình nhiệt PCR khoảng 120 phút. Chúng tôi đã tiếp cận theo hướng khuếch đại toàn bộ hệ gen BKV chỉ sử dụng một cặp môi bằng phản ứng long-PCR có độ chính xác cao với thời gian tối ưu. So sánh với nghiên cứu của tác giả Manoochehr và cộng sự khi phân lập hệ gen BKV, sử dụng phương pháp long-PCR với chu trình nhiệt như sau: Biến tính $98^\circ\text{C}/5$ phút, tiếp theo là ($98^\circ\text{C}/10$ giây; $55^\circ\text{C}/45$ giây; $68^\circ\text{C}/7,5$ phút) trong 30 chu kỳ, sau đó hoàn thành kéo dài chuỗi ở 68°C trong 10 phút. Như vậy, với chu trình nhiệt này, quá trình khuếch đại được thực hiện trong 30 chu kỳ, thời gian kéo dài chuỗi trong mỗi chu kỳ là 7,5 phút, so với nghiên cứu chúng tôi chỉ kéo dài chuỗi trong 2 phút, giúp rút ngắn tổng thời gian phản ứng, nhưng vẫn cho kết quả sản phẩm khuếch đại thành công (hình 2, 3) [14]. Điều này có thể được lý giải do sự khác nhau giữa các cặp môi, enzym polymerase được sử dụng trong phản ứng PCR tối ưu của từng tác giả.

Một nghiên cứu khác của tác giả Hiroshi Ikegaya, toàn bộ hệ gen BKV được khuếch đại bằng cách sử dụng Phusion High-Fidelity DNA polymerase với bộ môi BkFuBA(F+R) (bảng 1) đã được sử dụng trong nghiên cứu này như là bộ môi tham chiếu, so sánh đồng thời với bộ môi thiết kế là wBK_a(F+R). Kết quả với bộ môi tham chiếu, ở các mẫu nồng độ BKV-DNA trung bình (đặc biệt là mẫu huyết tương), vẫn cho sản phẩm khuếch đại thành công, tuy nhiên tổng thời gian phản ứng khoảng 210 phút, được thực hiện trong 40 chu kỳ [13]. Trong khi đó, trong công trình này, với bộ môi nghiên cứu wBK_a(F+R), có nhiều ưu điểm hơn với tổng thời

gian phản ứng khoảng 120 phút, thực hiện trong 30- 35 chu kỳ đều cho sản phẩm khuếch đại thành công. So sánh kết quả ở hình 1, cho thấy ở bộ môi thiết kế kết quả khuếch đại cho băng khá rõ so với bộ môi tham chiếu dù số chu kỳ thực hiện phản ứng ít hơn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã tối ưu thành công quy trình phân lập hệ gen BKV, khuếch đại thành công 41 hệ gen BKV kích thước 5,1 kb, trong đó có 04 hệ gen BKV phân lập từ mẫu huyết tương. So với nghiên cứu của các tác giả khác như Nishimoto Y, Hiroshi Ikegaya đều chỉ thực hiện trên mẫu nước tiểu [15]. Tuy nhiên với những mẫu nước tiểu cần nồng độ BKV-DNA cao (khoảng 10^7 copy/ml), cho thấy nếu chỉ sử dụng mẫu nước tiểu để phân lập hệ gen sẽ làm hạn chế nghiên cứu đa dạng di truyền về BKV ở những bệnh nhân được phát hiện sớm ở mẫu huyết tương có nồng độ virus trung bình [16]. Do đó, công trình này đã thành công trong việc khuếch đại được những mẫu huyết tương có nồng độ trung bình, góp phần nghiên cứu đặc điểm di truyền hệ gen ở những bệnh nhân được phát hiện sớm BKV trong mẫu huyết tương. Đồng thời, trong quy trình tối ưu này, thời gian phản ứng khuếch đại ngắn hơn 90 phút so với chu trình nhiệt tham chiếu (tổng thời gian phản ứng khoảng 120 phút) vẫn cho kết quả sản phẩm khuếch đại tương đương quy trình nghiên cứu của Hiroshi Ikegaya.

5. KẾT LUẬN

Đã tối ưu thành công quy trình phân lập hệ gen BKV kích thước 5,1 kb từ mẫu huyết tương, nước tiểu bệnh nhân sau ghép thận, khuếch đại thành công 41/50 mẫu, trong đó 04 mẫu huyết tương và 39 mẫu nước tiểu. Quy trình phân lập hệ gen BKV bao gồm: 1) Tách chiết DNA-BKV và định lượng nồng độ đảm bảo đạt khoảng 10^5 và 10^7 copy/ ml lần lượt với mẫu huyết tương và nước tiểu; 2) Thực hiện long-PCR thể tích 50 μ l với cặp môi wBK_a(F+R) có thành phần 1X Phusion HF master mix; 0,5 μ M wBK_a(F+R); 3-5 μ l DNA khuôn với chu trình nhiệt: Biến tính 98°C/ 30 giây, (98°C/ 10 giây, 58°C/ 20 giây, 72°C/ 2 phút) 35 chu kỳ, 72°C/ 6 phút; 3) Đánh giá sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn *Xba*I, *Eco*RI và giải trình tự.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành nhờ sự tài trợ kinh phí của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted) thông qua đề tài “Nghiên cứu kiểu gen CYP3A4, CYP3A5, ABCB1 và xây dựng qui trình xác định nồng độ Tacrolimus để ứng dụng cho bệnh nhân ghép thận”. Mã số: 04/2020/TN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yogo Y., et al., *Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications*, Reviews in Medical Virology, 2009, **19**(4):185-99.
2. Hà Phan Hải An, *Ca lâm sàng nhiễm virus BK ở bệnh nhân sau ghép thận*, Tạp chí Nghiên cứu Y học, 2015, **93**:142-148.
3. Parmjeet Randhawa, et al., *BK virus: discovery, epidemiology, and biology*, Graft, 2002, **5**:19-27.
4. Siguier M., Sellier P., and Bergmann J. F., *BK-virus infections: a literature review*, Med. Mal. Infect., 2012, **42**(5):181-7.

5. Mark D. Reploeg, Gregory A. Storch, and David B. Clifford, *BK virus: A clinical review*, Clinical Infectious Diseases, 2001, **33**(2):191-202.
6. Linpei Jia, et al., *Identification of potential key protein interaction networks of BK virus nephropathy in patients receiving kidney transplantation*, Scientific Reports, 2018, **8**:5017.
7. Dorota Polz, Agnieszka Stec, and Małgorzata Polz-Dacewicz, *BK-virus (BKV) - structure, epidemiology and pathogenesis*, Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, 2013, **7**(2):90-92.
8. Luo C., et al., *Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: implications for molecular diagnostic laboratories*, Journal of Medical Virology, 2008, **80**(10):1850-1857.
9. Daniel L. Bohl and Daniel C. Brennan, *BK virus nephropathy and kidney transplantation*, Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2007, **2**(1):36-46.
10. İlhan Akan, et al., *Human polyomavirus JCV late leader peptide region contains important regulatory elements*, Virology, 2006, **349**(1):66-78.
11. Saif A. Muhsin and David Wojciechowski, *BK virus in transplant recipients: current perspectives*, Transplant Research and Risk Management, 2019, **11**:47-58.
12. Hoàng Xuân Sứ, *Nghiên cứu định lượng nồng độ ADN BK polyomavirus bằng kỹ thuật taqman probe real-time PCR*, Tạp chí Y - Dược học quân sự, số 5, 2018.
13. Hiroshi Ikegaya, et al., *Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations*, Journal of General Virology, 2006, **87**(11):3201-3208.
14. Manoochehr Makvandi, et al., *The complete genome sequence BK polyomavirus study in kidney transplanted patients*, Journal of Nephropathology, 2018, **8**(2):e15.
15. Nishimoto Y., et al., *Evolution of BK virus based on complete genome data*, J Mol Evol, 2006, **63**(3):341-52.
16. Manon Dekeyser, et al., *Polyomavirus-specific cellular immunity: From BK-virus-specific cellular immunity to BK-virus-associated nephropathy?* Frontiers in immunology, 2015, **6**:307.

SUMMARY

OPTIMIZED AMPLIFICATION OF FULL-LENGTH GENOME OF BK VIRUS IN BLOOD AND URINE OF KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS

BK polyomavirus (BKV) is a common opportunistic pathogen in the community, infecting humans in their early life stages, often remaining in a latent state. BK virus-associated nephropathy occurs in 2 to 10% of kidney recipients, and up to 40 to 90% of these patients have permanent loss of graft function due to delay

in diagnosis. In the present study, we have successfully optimized the component and thermal cycling for the long-PCR assay to amplify the BKV genome, including middle-concentration samples such as plasma (concentration about 10^5 copy/ml). We have successfully amplified the BKV genome in 41/50 samples, including 04 plasma and 39 urine samples. The optimized amplification protocol of full-length BKV genome includes the following steps: 1) Extraction of DNA-BKV from plasma and urine samples and quantification of BKV-DNA concentrations to ensure that about 10^5 copies/ml (plasma) and 10^7 copies/ml (urine); 2) Each full-length genome reaction in the volume of 50 μ l containing 1X Phusion HF master mix (Thermo Scientific, USA); 0.5 μ M of wBK_a(F+R) primers, 3-5 μ l of genomic DNA. Cycling conditions were 98°C for 30 s, followed by 35 cycles of 98°C for 10 s; 58°C for 20 s; 72°C for 2 min, and 72°C for 6 min and a 4°C hold; 3) All 5.1 kb purified PCR were verified and confirmed by restriction enzymes *Xba*I, *Eco*RI, and direct sequencing.

Keywords: *BK polyomavirus, renal transplantation, long-range PCR, full-length genome, ghép thận, toàn bộ hệ gen.*

Nhận bài ngày 29 tháng 7 năm 2022

Phản biện xong ngày 10 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 19 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ *Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y*

⁽²⁾ *Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

Liên hệ: Đinh Thị Thu Hằng

Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

Số 222 Phùng Hưng, Hà Đông, Hà Nội

Điện thoại: 0904.194.391; Email: hangdinhbio@gmail.com