

## PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT ADN TỔNG SỐ TỪ MẪU GỖ

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG TRANG, NGUYỄN MINH ĐỨC, ĐẶNG TÁT THẾ

*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,*

*Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

**TRẦN THU HƯƠNG**

*Sinh viên cao học khóa 16-Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,*

*Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Trong nhiều năm trở lại đây, buôn bán trái phép các loại gỗ quý đang ngày càng gia tăng cả về quy mô và phạm vi, trở thành nguyên nhân chính đe dọa không những sự sống sót của các loài sinh vật mà còn đe dọa an ninh quốc phòng và an toàn dân sinh do nhiều rừng phòng hộ bị chặt phá trái phép. Nghị định số 32/2006-CP của Chính phủ đã ban hành các quy định bảo vệ loài động thực vật nguy cấp, quý hiếm [2]. Tuy nhiên, do nhiều loài thân gỗ có giá trị cao về mặt kinh tế nên chúng vẫn bị khai thác và buôn bán trái phép. Hơn nữa, với vị trí địa lý thuận lợi, Việt Nam còn trở thành điểm nóng trong việc trao đổi, buôn bán gỗ trái phép giữa các nước trong khu vực và thế giới. Chính phủ Việt Nam đã ký cam kết Quốc tế về kiểm soát buôn bán các loài động thực vật bị đe dọa tuyệt chủng (Công ước CITES). Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (Viện ST & TNSV) là cơ quan thẩm quyền khoa học CITES Việt Nam, một trong các chức năng chính là giám định các mẫu động thực vật theo yêu cầu của các cơ quan chức năng có liên quan [3]. Tuy nhiên hiện tại chúng ta gặp nhiều khó khăn trong giám định hình thái các mẫu thực vật ở dạng gỗ do các loại gỗ bị khai thác buôn bán thường bị xử lý hóa học hoặc vật lý nên không còn giữ được các đặc điểm như gỗ tươi. Vì vậy, chúng tôi hướng đến việc phân loại bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Bước đầu tiên quan trọng quyết định sự thành công trong việc phân loại bằng phương pháp này là bước tách chiết ADN tổng số từ các mẫu gỗ buôn bán nói trên.

Ba quy trình tách chiết ADN tổng số đã được tiến hành. Kết quả cho thấy phương pháp tách chiết bằng CTAB cải tiến bởi Phòng Hệ thống học Phân tử và Di truyền bảo tồn (HTHTP & DTBT) (Viện ST & TNSV) đã cho kết quả tốt nhất.

### I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 3 mẫu gỗ do cơ quan chức năng gửi về Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật yêu cầu giám định bao gồm Trắc (*Dalbergia cochinchinensis*), Sưa (*Dalbergia torulosa*) và Giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus*). Ngoài ra, 1 mẫu lá Sưa tươi thu tại Vườn Thực nghiệm Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật được sử dụng làm mẫu đối chứng.

#### 2. Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu được nghiền trong nitơ lỏng (-196°C) thành dạng bột mịn, sau đó 3 quy trình tách chiết ADN tổng số từ thực vật được song song tiến hành bao gồm:

1. Quy trình tách chiết ADN bằng các hoá chất của hãng Qiagen (kit tách chiết thực vật DNeasy plant mini kit) [9].

2. Quy trình tách chiết theo Xavier, 2000.

3. Quy trình tách chiết bằng hóa chất tự pha, sử dụng CTAB là chất chiết xuất chính, thay đổi một số điều kiện về ngâm, ủ và kết tủa mẫu (sau đây gọi tắt là quy trình tách chiết bằng CTAB cải tiến bởi Phòng HTHPT & DTBT).

Kết quả tách ADN tổng số sau đó được tiến hành kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 1% và kiểm tra nồng độ bằng đo OD ở bước sóng 260nm, kiểm tra độ tinh sạch bằng đo OD ở bước sóng 280nm.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Quy trình tách bằng kit Qiagen

Qiagen là hãng hóa chất có uy tín của Đức, nổi tiếng trên toàn thế giới. Kit tách ADN của hãng là kit tách có chất lượng tốt nhất, được nhiều phòng thí nghiệm trên toàn thế giới lựa chọn sử dụng. Kit tách ADN của Qiagen phù hợp để tách ADN từ các mô thực vật và nấm. Cột tách của Qiagen cho phép tách các phân tử ADN có kích thước lên đến 40Kb, phổ biến nhất là các phân tử ADN có kích thước từ 20 đến 25Kb [9].

### 2. Quy trình tách theo Xavier, 2000

CTAB là phương pháp tách chiết ADN từ mô thực vật lần đầu tiên được giới thiệu vào năm 1984 bởi Saghai-Marooof (PNAS 81, 8014-8019, 1984). Đây là phương pháp khá đơn giản, sử dụng CTAB, một chất tẩy rửa mạnh để phá vỡ màng tế bào. Phương pháp này sau đó đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới lựa chọn sử dụng do các thao tác đơn giản, dễ làm và chi phí thấp. Tuy nhiên, hàm lượng và chất lượng ADN thu được không cao. Nhiều tác giả sau này như Doyle J., 1987, Ausubel, 1994; N.Tel-Zur, 1999... đã hiệu chỉnh lại một số bước trong quy trình để thu được sản phẩm ADN đạt chất lượng tốt hơn. Phương pháp tách ADN bằng CTAB mà Xavier và cộng sự cải tiến năm 2000 [8] được cho là thích hợp cả về mặt thu gọn thời gian thực hiện cũng như có được ADN đạt chất lượng tương đối tốt. Phương pháp này được giới thiệu là phù hợp cho tách ADN trên mọi đối tượng thực vật, từ cây lá kim, cây lá rộng, cho cả mẫu tươi và mẫu khô.

### 3. Phương pháp tách bằng CTAB cho các mẫu gỗ khô (hiệu chỉnh và cải tiến bởi Phòng HTHPT & DTBT-VST & TNSV)

Các loại gỗ dùng cho thương mại, buôn lậu thường đã bị xử lý hoá, nhiệt và không còn giữ được các đặc tính như gỗ tươi. Chúng tôi đã tiến hành tách chiết ADN tổng số từ 3 mẫu gỗ yêu cầu giám định, sử dụng CTAB là chất tẩy rửa có tính khử mạnh làm hóa chất chính để tách chiết ADN, bổ sung PVP 10% (Polyvinylpyrrolidone) để thay thế cho  $\beta$ -Mercapto (trong phương pháp của Xavier 2000), nhằm loại bỏ các hợp chất phenolic, ngoài ra thay đổi một số điều kiện về ngâm ủ và kết tủa mẫu. Các bước tiến hành như sau:

- Nghiền mẫu trong nitor lỏng thành dạng bột mịn, chuyển 100mg bột mẫu vào ống eppendorf 2ml.

- Ngâm mẫu trong 800 $\mu$ l đệm PBS 1X (NaCl 0,1M, KCl 0,1M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  0,1M), pH 7,4 trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (Lắc đều sau mỗi 10 phút). Ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi.

(Ngâm mẫu trong đệm PBS giúp làm sạch mẫu và cân bằng pH)

- Bổ sung 800 $\mu$ l đệm rửa (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, Sodium Natri photphat 0,5%), trộn đều bằng vortex. Ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi (lặp lại bước này 2 đến 3 lần cho tới khi dịch nổi hết nhất).

(Đệm rửa giúp loại bỏ những chất có trong tế bào chất như poly-sacharide, nhựa mù...)

- Bổ sung 600 $\mu$ l đệm chiết (NaCl 1,5M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, CTAB 4%, PVP 10%), đảo đều cho tới khi mẫu thành dung dịch đồng nhất, ủ mẫu ở 65°C trong 80 phút, đảo đều mẫu sau mỗi 15 phút. Bổ sung 4 $\mu$ l RNase (100mg/ml), ủ tiếp ở 65°C thêm 10 phút nữa.

(Đệm chiết có chứa CTAB là hóa chất chính giúp phá vỡ màng tế bào, màng nhân, giải phóng acid-nucleic, bổ sung enzyme RNase ở 10 phút cuối giúp loại bỏ ARN).

- Để nguội 5 phút ở nhiệt độ phòng.

- Bổ sung 600 $\mu$ l Chloroform: Isoamylalcohol (24: 1), đảo đều.

- Ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút, hút dịch nổi cho sang ống eppendorf mới, loại bỏ phần cặn.

- Bổ sung 600 $\mu$ l Chloroform:iso-amyl alcohol (24: 1), đảo đều, để mẫu ở -20°C trong 10 phút.

- Lấy mẫu ra, ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút, hút phần dịch nổi cho sang ống eppendorf mới.

(Chloroform:Iso-amyl alcohol là chất chiết xuất acid nucleic, đưa acid nucleic hoà tan lên pha trên của dung dịch, kết tủa các loại protein, sacharide, chlorofil... xuống pha dưới, có thể lặp lại bước chiết Chloroform:Iso-amyl alcohol 2-3 lần nếu thấy dịch chiết vẫn còn lảng cặn hoặc đục màu. Phương pháp tách của Xavier 2000 sử dụng dung dịch chiết là Phenol:Chloroform: Iso-amyl alcohol, ở đây chúng tôi loại bỏ Phenol do Phenol tuy chiết xuất tốt nhưng là chất có độc tính mạnh, mùi khó chịu, do vậy chúng tôi đã tăng bước chiết bằng Chloroform lên 2-3 lần).

- Bổ sung Isopropanol lạnh vào mẫu theo tỷ lệ ( $V_{mẫu} \cdot V_{isopropanol} = 1: 1$ ) đảo nhẹ, để ở -20°C trong ít nhất 1 giờ (có thể để qua đêm). (Isopropanol lạnh sẽ làm kết tủa ADN, thời gian để ủ mẫu ở -20°C càng lâu thì sẽ kết tủa được càng nhiều ADN, tuy nhiên thí nghiệm cho thấy trong 60 phút đầu thì đã kết tủa được 80% lượng ADN có trong dung dịch).

- Ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch nổi, thu tủa.

- Bổ sung 500 $\mu$ l cồn 70%, ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút, thu tủa. Lặp lại bước này 2 lần (cồn 70% để rửa các cặn bẩn kết tủa cùng ADN, tuy nhiên sau đó phải làm khô thật kỹ để hoàn toàn loại bỏ lượng cồn còn sót lại, nếu không còn sót lại sẽ làm ức chế quá trình chạy PCR về sau).

- Làm khô cặn ADN trong máy speed-vac.

- Hoà tan cặn ADN bằng 100 $\mu$ l nước khử trùng (nước khử trùng cần làm ấm lên 50°C trước khi dùng để hoà tan ADN do nước ấm sẽ dễ hoà tan ADN hơn).

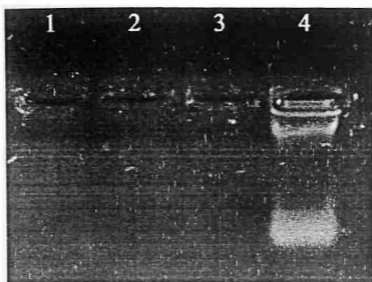
- Kiểm tra ADN thu được bằng điện di trên gel Agarose 1%,

- Bảo quản mẫu ở -20°C.

Các mẫu gỗ sau khi được tách chiết theo 3 quy trình khác nhau được tiến hành kiểm tra chất lượng ADN thu được bằng điện di trên gel Agarose 1% và kiểm tra nồng độ bằng đo OD ở các bước sóng 260nm và 280nm.

*\* Kết quả kiểm tra chất lượng ADN bằng điện di trên gel Agarose 1%.*

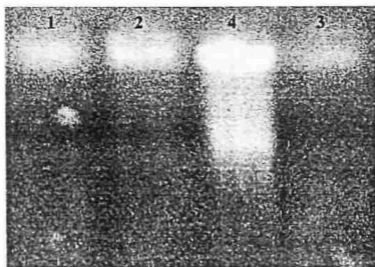
- Với quy trình 1, tách bằng kit Qiagen, kết quả cho thấy mẫu lá Sưa tươi cho kết quả rất tốt, vạch sắc nét, rõ ràng, ít bị đứt gãy. Tuy nhiên với 3 mẫu gỗ còn lại thì hoàn toàn không quan sát thấy có vạch sáng (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose ADN tổng số tách bằng kit Qiagen

(Gỗ trắc (1), gỗ Giáng hương (2), gỗ Sưa (3), lá Sưa tươi (4))

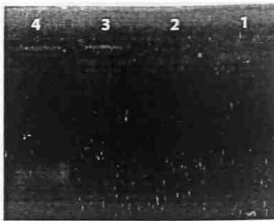
- Với quy trình 2: Tách theo Xavier (2000), kết quả cho thấy với mẫu lá tươi thì lượng ADN tổng số thu được rõ nét hơn so với 3 mẫu gỗ. Vạch ADN tổng số của 3 mẫu gỗ thể hiện trên bản điện di là không rõ ràng, không sắc nét, nhìn vào kết quả thu được qua điện di cho thấy nhiều khả năng có thu được mẫu ADN tổng số của 3 mẫu gỗ, tuy nhiên ADN có thể bị đứt gãy nhiều (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di trên gel Agarose ADN tổng số tách theo Xavier 2000

(Gỗ trắc (1), gỗ Giáng hương (2), gỗ Sưa (3), lá Sưa tươi (4))

- Với quy trình 3, tách ADN bằng CTAB có cải tiến bởi Phòng HTHPT & DTBT, kết quả điện di trên gel Agarose 1% cho thấy cả 4 mẫu đều xuất hiện vạch cho dù độ sáng của 4 mẫu là khác nhau, trong đó vạch ADN ở mẫu lá Sưa tươi là sáng nhất, vạch ADN của mẫu Sưa gỗ sáng hơn so với vạch ADN ở mẫu gỗ Trắc và gỗ Giáng hương. Tuy nhiên độ sắc nét của vạch đã chứng tỏ chất lượng ADN thu được khá tốt, không bị đứt gãy (hình 3).



Hình 3. Kết quả điện di trên gel Agarose ADN tổng số tách bằng CTAB cải tiến bởi Phòng HTHPT & DTBT

(Gỗ trặc (1), gỗ Giáng hương (2), gỗ Sưa (3), lá Sưa tươi (4))

\*Kiểm tra nồng độ ADN thu được bằng đo OD ở bước sóng 260nm và 280nm:

Nồng độ ADN thu được sau khi tách bằng 3 quy trình trên được kiểm tra bằng cách pha loãng 100 lần và đo OD trên máy đo quang phổ ở bước sóng 260nm và 280nm.

Tiến hành như sau: Lấy 10 $\mu$ l mẫu ADN pha với 990 $\mu$ l nước cất khử trùng, lần lượt đo ở các bước sóng 260nm và 280nm. Kết quả OD ở các bước sóng 260nm, 280nm lần lượt được thể hiện ở bảng 1 và bảng 3.

Bảng 1

**Kết quả đo OD ở bước sóng 260nm**

Kết quả đo OD 260nm/pha loãng 100 lần	Kit Qiagen	Xavier 2000	CTAB cải tiến
Mẫu lá Sưa tươi	2,8640	1,9173	2,1150
Mẫu gỗ Sưa	0,1201	0,2315	1,8942
Mẫu gỗ Trắc	0,0132	0,1101	1,1051
Mẫu gỗ Giáng hương	0,0091	0,2013	1,0067

Từ kết quả đo OD ở bước sóng 260nm, nồng độ thực của ADN có trong 100 $\mu$ l mẫu được tính theo công thức sau:

$$C [ADN] \text{ (ng/ml)} = OD \text{ 260nm} \times 50\text{ng/ml} \times 100 \text{ lần pha loãng}/10 \text{ lần (100}\mu\text{l} \times 10 = 1\text{ml)}$$

Từ đó, ta có kết quả nồng độ ADN có trong 100 $\mu$ l mẫu tách theo từng phương pháp được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2

**Nồng độ thực của ADN có trong 100 $\mu$ l mẫu thu được**

Nồng độ ADN (ng) thu được trong 100 $\mu$ l mẫu	Kit Qiagen	Xavier 2000	CTAB cải tiến
Mẫu lá Sưa tươi	996	785,5	865,5
Mẫu gỗ Sưa	9,5	41,5	492,5
Mẫu gỗ Trắc	8,6	49	460,5
Mẫu gỗ Giáng hương	4,55	26,05	440,5

Kết quả đo OD ở bước sóng 280nm là bước sóng hấp thụ của các protein, về mặt lý thuyết, khi kết quả đo OD của ADN ở bước sóng 260nm chia cho kết quả thu được khi đo OD ở bước sóng 280nm mà kết quả nằm trong giới hạn từ 1,8-2,0 chứng tỏ ADN thu được là sạch, dưới 1,8 nghĩa là ADN còn lẫn nhiều protein (hay nói cách khác là không tinh sạch) [6].

Bảng 3

**Kết quả đo OD ở bước sóng 280nm**

Kết quả đo OD 280nm/pha loãng 100 lần	Kit Qiagen	Xavier 2000	CTAB cải tiến
Mẫu lá Sưa tươi	1,102	1,12	1,007
Mẫu gỗ Sưa	0,0098	0,059	0,531
Mẫu gỗ Trắc	0,00892	0,071	0,502
Mẫu gỗ Giáng hương	0,0046	0,0361	0,471

Từ kết quả đo OD ở các bước sóng 260nm và 280nm (bảng 1 và bảng 3), ta có tỷ lệ OD 260/280 như sau (bảng 4):

Bảng 4

**Tỷ lệ OD 260/280 của các mẫu ADN tách theo 3 phương pháp khác nhau**

Tỷ lệ OD 260nm/280nm	Kit Qiagen	Xavier 2000	CTAB cải tiến
Mẫu lá Sưa tươi	1,807	1,4026	1,7189
Mẫu gỗ Sưa	1,938	1,4067	1,8549
Mẫu gỗ Trắc	1,9282	1,3802	1,8346
Mẫu gỗ Giáng hương	1,9782	1,4432	1,8704

Từ kết quả tính toán thể hiện ở bảng 2 và bảng 4 cho thấy:

Phương pháp tách theo kit Qiagen thu được ADN có độ tinh sạch cao nhất, trong đó mẫu lá Sưa tươi cho nồng độ ADN thu được khá cao (996ng/100µl), tuy nhiên nồng độ ADN thu được ở các mẫu gỗ lại không đáng kể, chứng tỏ phương pháp này chỉ phù hợp để tách cho các mô thực vật tươi chứ không phù hợp cho tách ADN từ gỗ khô.

Phương pháp tách ADN theo Xavier 2000 cho các mẫu gỗ cũng thu được kết quả, tuy nhiên độ tinh sạch không cao, lượng ADN thu được thấp và hình ảnh điện di cho thấy chất lượng ADN không được tốt, các phân tử ADN cho vạch không sắc nét, chứng tỏ bị đứt gãy nhiều.

Phương pháp tách bằng CTAB có cải tiến bởi Phòng HTHPT & DTBT cho thấy lượng ADN thu được từ mẫu lá Sưa tươi tuy không cao bằng tách theo kit Qiagen nhưng cũng đáng kể (865,5ng/100µl). Đặc biệt, lượng ADN thu được từ các mẫu gỗ là cao nhất trong 3 phương pháp trên và khá ổn định cho cả 3 mẫu gỗ (lần lượt là 492,5ng/100µl với gỗ Sưa, 460,5ng/100µl với gỗ Trắc và 440,5ng/100µl với gỗ Giáng hương). Hình ảnh điện di cho thấy ADN thu được cho độ tinh sạch cao và ít bị đứt gãy.

### III. KẾT LUẬN

Phương pháp tách ADN bằng CTAB có cải tiến bởi Phòng HTHPT & DTBT là phù hợp cho tách ADN từ các mẫu gỗ buôn bán. Kết quả tách trong 100mg mẫu cho lượng ADN trung bình là 450ng/100 $\mu$ l.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asubel F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.D. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, 1999. Current protocol in Molecular Biology. New York city, NY: John Wiley & Sons Inc.
2. Chính phủ nước Cộng hòa Xã hội Chủ nghĩa Việt Nam, 2006. Nghị định số 32 về Quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý hiếm.
3. Công ước Cites, www.cites.org, Cites Việt Nam-Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên Môi trường www.cres.edu.vn.
4. Doyle J.J, 1991. DNA protocol for plants. p 283-293 in G.Hewitt, A. W. B
5. Tel-zur, N, S. Abbo, D. Myslabodski, Y. Mizrahi, 1999. Plant Molecular Biology Reporter 1999, Volume 17, Issue 3, p. 249-254.
6. Khuất Hữu Thanh, 2005. NXB. KHKT Hà Nội, trang 36-40.
7. MOST (Ministry of Science and Technology) and VAST (Vietnamese Academy of Science and Technology), 2007. Vietnam red data book, part II. Plants.
8. Xavier JL, Karine L., 2000. Plant Molecular Biology Reporter 18: 283a-283g.
9. www.qiagen.com/DNeasy plant mini kit.

### TOTAL DNA EXTRACTION PROTOCOL FOR TIMBER

NGUYEN THI PHUONG TRANG, NGUYEN MINH DUC,  
DANG TAT THE, TRAN THU HUONG

#### SUMMARY

In recent years, timber smuggling are increased in both scale and area, become a major cause not only threaten the survival of species but also dangerous to national security and people safety because many trees in protection forest are cut down illegally. 32/2006-CP Government decree issued regulations protecting endangered species. However, because of highly economic values, many timbers are still being over-exploited and traded illegally. Moreover, with favorable geographical location, Viet Nam has become a hot point in the exchange, illegal timber trade between countries in the Asian as well as in the world. Institute of Ecology and Biological Resources (IEBR) is scientific authority organization for CITES Vietnam since 1994; when Vietnam has participated in CITES with the main function is giving advices for CITES Management Authority of Vietnam to built policies and law enforcement, which relate to wildlife trading. IEBR is the key agency in the assessment and investigation of trading in wildlife. However, currently, we have difficulties in morphological identification of plant specimens in the form of dry wood because normally, trading timber are treated with chemical or physical and their characteristics will be changed compare with fresh form. Thus, we are trying to apply molecular biology techniques in to timber classification. The first important step that decide the success of the classification using bio-technology is DNA extraction from timber.

There are 3 protocols of DNA extraction were conducted. The results showed that, the protocol for DNA extraction using CTAB that improved by department of Molecular systematics and Conservation genetics (IEBR) has the best result.