

ỨNG DỤNG TIN SINH HỌC VÀ KỸ THUẬT PCR TẠO THANG DNA DỰA TRÊN MỘT KHUÔN PLASMID DUY NHẤT

HUYỀN THỊ KIM PHƯƠNG^{*}, TRƯƠNG THỊ TINH TƯƠNG^{**}, VÕ MINH TOÀN^{**},
PHAN THỊ PHƯƠNG TRANG^{***}, NGUYỄN ĐỨC HOÀNG^{***}

TÓM TẮT

Trong lĩnh vực sinh học phân tử, thang DNA là dấu chuẩn không thể thiếu. Nghiên cứu này phát triển phương pháp mới tạo thang DNA nhanh và hiệu quả thông qua công cụ tin sinh học để thiết kế các cặp mồi bắt cặp đặc hiệu trên khuôn plasmid duy nhất pHT254, cho sản phẩm PCR với kích thước khác nhau từ 100 bp đến 2000 bp. Các sản phẩm PCR sau đó được tinh chế, xác định nồng độ DNA và tiến hành phối trộn. Sản phẩm thu được là các thang DNA thang khác nhau với các vạch phù hợp mục đích sử dụng.

Từ khóa: Thang DNA, pHT254, PCR, HT100, HT200.

ABSTRACT

Synthesis of DNA ladder by bioinformatic and PCR technique based on unique plasmid

DNA ladder is an indispensable marker in molecular biology. This study developed a new method to create quickly and efficiently DNA ladder via the bioinformatics tools to design specific primers paired on unique plasmid pHT254, the result of the PCR technique is DNA fragments with different sizes from 100 bp to 2000 bp. The PCR products then were purified and carried out mixing. Resulting product is different DNA ladders that contain the wishes lines, due to the mixing of each individual PCR products.

Keywords: DNA marker, pHT254, PCR, HT100, HT200.

1. Giới thiệu

Hiện nay, hai phương pháp thông dụng truyền thống tạo thang DNA được sử dụng là nối không hoàn toàn các đoạn DNA có kích thước xác định và cắt giới hạn plasmid của *Escherichia coli* [6], bộ gene bacteriophage hay bộ gene của *Tenebrio molitor* [4]. Đối với phương pháp nối không hoàn toàn, các phân tử DNA mạch thẳng được nối với nhau qua liên kết cộng hóa trị phosphodiester bởi enzyme ligase, một hỗn hợp các phân tử DNA có kích thước khác nhau sẽ được tạo ra sau phản ứng nối không hoàn toàn. Đối với phương pháp sử dụng enzyme cắt giới hạn, phân tử DNA như plasmid từ *Escherichia coli* hoặc bộ gene phage lamda được cắt giới hạn bởi enzyme cắt giới hạn cụ thể có trình tự nhận biết của nó, tạo ra những phân tử DNA có kích thước xác định [3, 6]. Ưu điểm của hai phương pháp truyền thống này là đơn giản, dễ

^{*} Cử nhân, Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học; Email: htkphuong@hcmus.edu.vn

^{**} ThS, Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học

^{***} PGS TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM

tiến hành và ít tốn chi phí. Tuy nhiên, các vạch DNA được tạo ra phụ thuộc vào số lần lặp lại vị trí nhận biết của enzyme cắt hay sự nối ngẫu nhiên của enzyme nối nên gây khó khăn trong việc kiểm soát nồng độ và kích thước các vạch theo mong muốn. [1]

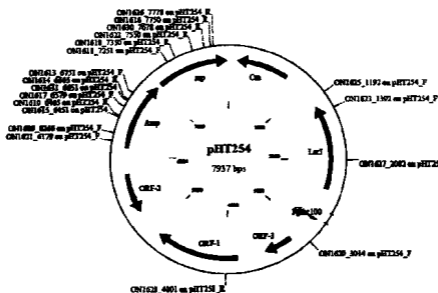
Bên cạnh đó, phương pháp tạo thang chuẩn DNA bằng kỹ thuật Multiplex-PCR hoặc PCR dựa trên khuôn là plasmid hay DNA của phage lamda đang được quan tâm, áp dụng rộng rãi trong nhiều phòng thí nghiệm và công ti thương mại như Sigma, Pharmacia, Life Technologies, Boehringer-Mannheim...[1, 5]. Ưu điểm của phương pháp này là nồng độ và kích thước phân tử các vạch của thang được điều chỉnh theo mong muốn nhờ kiểm soát số chu kỳ của phản ứng. Thông thường mỗi đoạn DNA có kích thước phù hợp sẽ được dòng hóa vào một plasmid khuôn để tiến hành PCR, quá trình trên đòi hỏi số lượng plasmid khuôn phải tương đương với số vạch DNA mong muốn nhằm xây dựng thang DNA.

Hướng tiếp cận của nghiên cứu này nhằm sử dụng công cụ tin sinh học trong quá trình thiết kế mỗi và kết hợp với kỹ thuật PCR để tạo ra các phân tử DNA có kích thước khác nhau dựa trên một khuôn plasmid duy nhất do nhóm nghiên cứu phát triển. Kết quả này sẽ giúp làm tiền đề để ứng dụng trong quá trình tự tạo nhanh thang DNA trong các phòng thí nghiệm, giảm kinh phí khi sử dụng các sản phẩm thang thương mại. Ngoài ra sản phẩm PCR là riêng lẻ nên rất dễ dàng trong việc tạo ra các thang có kích thước tròn trăm với nồng độ và kích thước mong muốn, tiện lợi cho mục đích của người sử dụng.

2. Vật liệu – phương pháp

Plasmid

Plasmid pHT254 được dùng làm khuôn cho toàn bộ các phản ứng PCR, pHT254 là DNA dạng mạch vòng, gồm 7937 bp (Hình 1), plasmid được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM.



Hình 1. Bản đồ vector pHT254 và vị trí bắt cặp của mỗi thiết kế

Mồi và quy trình PCR

Các cặp mồi đặc hiệu nhằm thu nhận các đoạn DNA có kích thước khác nhau được thiết kế bằng phần mềm Clone Manager dựa trên plasmid khuôn pHT254, trình tự và chiều dài của mồi được mô tả ở Bảng 1. Nguyên tắc thiết kế các mồi được thực hiện nhờ các thuật toán của phần mềm sao cho các cặp mồi đặc hiệu với mỗi phản ứng thu nhận từng sản phẩm DNA có kích thước tròn trăm từ 100 – 2000 bp. Các cặp mồi thiết kế (Bảng 2) được sử dụng cho phản ứng PCR để đánh giá sơ bộ về độ đặc hiệu và kích thước sản phẩm trên khuôn pHT254.

Thành phần phản ứng PCR: Taq buffer 1X (Công ti HT-Biotech), dNTP 200 mM (Fermentas), mồi 0,3 pmol/ μ l (Macrogen), Taq DNA polymerase 2 μ l/100 μ l phản ứng (HT-Biotech), plasmid khuôn pHT254 (Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học) 100 ng/100 μ l phản ứng.

Bảng 1. Trình tự 22 mồi được thiết kế dùng trong các phản ứng PCR

Mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Độ dài (nu)	Nhiệt độ nóng chảy ($^{\circ}$ C)
ON1609	AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGT	24	62
ON1610	GTCATGCCATCCGTAAGATGC	21	61
ON1611	TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCA	21	59
ON1613	GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT	24	63
ON1614	CTACAGGCATCGTGGTGTCAC	21	63
ON1615	TACGGATGGCATGACAGTAAGAG	23	63
ON1616	GTTGCTGGCGTTTTCCATAG	21	59
ON1617	GGGATCATGTAAGTCCGCCTTG	21	61
ON1618	GGCGTGCTACAGAGTTCCTTG	21	63
ON1619	CGTTTCCACCGGAATTAGCTT	21	59
ON1620	GGTAGATCCCCTAATTTTCGTACCAT	26	63
ON1621	GTTTTTGCTCACCCAGAAACG	21	59
ON1622	TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT	24	63
ON1623	GGGTGGTTTTCCTTTCACCAG	22	60
ON1624	TTCTCCGTGATTCCTTGAACA	22	58,5
ON1625	AGGCGATTAAGTTGGGTAACG	21	59
ON1626	AAAAGGCCAGGAACCGTAAAA	21	58,5

ON1627	ATAGTTAATGATCAGCCCCTGACG	25	63,5
ON1628	CTTCTCTTCCGTTTCAGCAACA	22	60
ON1629	TGGAGATGACTTGCTTAATTCCAC	24	62
ON1630	GCGAAACCCGACAGGACTATAA	22	60,5
ON1631	CCACGATGCCTGTAGCAATG	20	60

Điều kiện phản ứng PCR tối ưu nhằm thu nhận các đoạn DNA của từng cặp môi: nhiệt độ bắt cặp môi, nồng độ Mg^{2+} , nồng độ môi được khảo sát. Trong đó, nhiệt độ bắt cặp môi được khảo sát ở 54°C, 55°C, 56°C, 57°C và 58°C. Việc lựa chọn nhiệt độ khảo sát dựa vào mốc nhiệt độ T_m-5 của môi có nhiệt độ nóng chảy thấp nhất 58,5°C và môi có nhiệt độ nóng chảy cao nhất 63°C. Nồng độ Mg^{2+} được khảo sát ở 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM. Nồng độ môi dùng cho phản ứng PCR được khảo sát ở 0,2 pmol/ μ l, 0,3 pmol/ μ l, 0,4 pmol/ μ l, 0,5 pmol/ μ l. Qua khảo sát nhiệt độ bắt cặp môi, chọn ra một hoặc hai nhiệt độ bắt cặp môi có thể dùng chung cho tất cả các phản ứng PCR thu DNA. Sau đó tiến hành phản ứng PCR thu nhận các đoạn DNA của từng cặp môi cụ thể với điều kiện đã tối ưu, sản phẩm PCR được điện di phân tách trên gel agarose 2% (Invitrogen) đã bổ sung Safe view (Invitrogen) trong dung dịch TAE 1X (40 mM Tris-acetate and 2 mM EDTA, pH 8.0) và được tinh sạch qua PCR purification kit (Qiagen). Các sản phẩm PCR sau đó sẽ được phối trộn với nhau tạo thành các thang DNA.

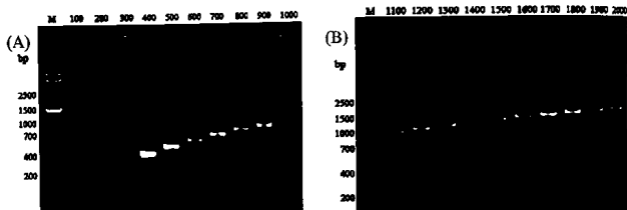
Bảng 2. Các cặp môi dùng cho phản ứng PCR cho sản phẩm với kích thước tròn trăm

Cặp môi		Sản phẩm PCR (bp)
Forward	Reverse	
ON1611	ON1618	100
ON1609	ON1610	200
ON1611	ON1622	300
ON1609	ON1614	400
ON1611	ON1616	500
ON1613	ON1618	600
ON1631	ON1618	700
ON1613	ON1622	800
ON1615	ON1618	900
ON1613	ON1616	1000

Cặp môi		Sản phẩm PCR (bp)
Forward	Reverse	
ON1631	ON1616	1100
ON1617	ON1626	1200
ON1615	ON1616	1300
ON1619	ON1628	1400
ON1621	ON1630	1500
ON1621	ON1626	1600
ON1623	ON1624	1700
ON1623	ON1620	1800
ON1625	ON1624	1900
ON1627	ON1628	2000

3. Kết quả - thảo luận

Dựa trên plasmid khuôn pHT254, 22 môi được thiết kế tạo thành 20 cặp môi đặt hiệu cho phản ứng PCR để thu nhận các sản phẩm có kích thước từ 100 – 2000 bp. Kết quả PCR đánh giá sơ bộ độ đặc hiệu và kích thước sản phẩm DNA của từng môi được điện di phân tích trên gel agarose có kích thước từ 100 – 2000 bp (Hình 2). Kết quả cho thấy quá trình thiết kế môi dựa trên khuôn pHT254 đã thành công, tất cả các phản ứng đều cho vạch sáng phù hợp với kích thước lý thuyết. Tuy nhiên, kết quả điện di trên gel cho thấy sản phẩm khuếch đại đoạn có kích thước 100bp, 200 bp và 300 bp cho vạch mờ hơn so với các vạch còn lại (Hình 2A).



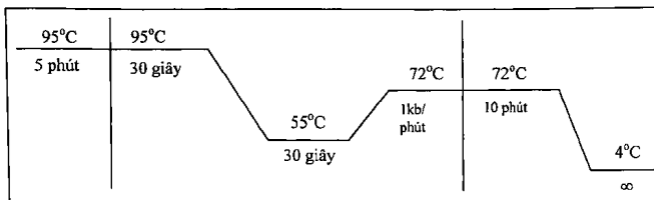
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ 100 – 2000 bp trên gel agarose 2%; (A): Sản phẩm PCR từ 100 – 1000 bp; (B): Sản phẩm PCR từ 1100 – 2000 bp; (M): thang DNA ZipRuler Express (Thermo Scientific)

Phản ứng PCR tiếp tục được khảo sát các điều kiện tối ưu để thu nhận sản phẩm PCR tốt nhất. Kết quả khảo sát đã chọn lựa được các điều kiện phù hợp cho các phản ứng PCR với thành phần phản ứng PCR như sau:

Bảng 3. Thành phần tối ưu cho phản ứng PCR

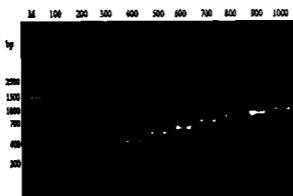
dNTP	200 μ M
Taq buffer	1X
Mg ²⁺	1,5 mM
Môi	0,4 pmol/ μ l
Taq enzyme	2 μ l/100 μ l phản ứng
Plasmid pHT254	100 ng/100 μ l

Chu kì nhiệt được biểu diễn trong Hình 3:



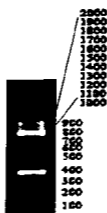
Hình 3. Sơ đồ chương trình chạy PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR với tổ hợp các điều kiện đã khảo sát cho thấy các vạch sáng rõ và duy nhất (Hình 4). Đặc biệt là sản phẩm có kích thước 100 bp, 200 bp và 300 bp đã được cải thiện và tương đương với các vạch có kích thước khác. Như vậy, đã thu nhận thành công các sản phẩm DNA mục tiêu, các sản phẩm này sau đó được tinh sạch bằng PCR purification kit và tiến hành phối trộn thành thang DNA.



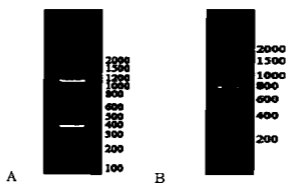
Hình 4. Kết quả điện di trên gel agarose các sản phẩm PCR với các điều kiện đã tối ưu. (M): thang DNA ZipRuler Express (Thermo Scientific)

Các sản phẩm DNA có kích thước từ 100 – 2000 bp sau khi tinh sạch được quy về các nồng độ khác nhau và tiến hành khảo sát nồng độ tối ưu cho mỗi kích thước DNA trong quá trình phối trộn (kết quả không được trình bày). Kết quả điện di sản phẩm phối trộn tổ hợp DNA có kích thước khác nhau với nồng độ tối ưu cho thấy các vạch DNA mục tiêu phù hợp với kích thước lí thuyết, trong đó vạch chỉ thị sáng hơn với nồng độ DNA cao hơn là vạch có kích thước 400 và 800 bp, tuy nhiên ở một số vạch có kích thước gần nhau không được phân tách rõ rệt trên gel agarose (Hình 4). Để phân tách các đoạn gen với kích thước gần nhau cần phải điện di trên băng gel lớn, thời gian điện di lâu hơn, lượng thang DNA nạp vào giếng cao. Do vậy cần phối trộn các đoạn có kích thước khác nhau và phù hợp để ra được thang có độ phân tách tốt mà không cần điện di lâu trên băng gel lớn.



Hình 4. Kết quả điện di trên gel agarose các vạch DNA có kích thước từ 100 – 200 bp

So với một số thang DNA đã được thương mại, sự chênh lệch giữa các vạch kích thước thông thường từ 200 – 300 bp, chính vì vậy chúng tôi tiến hành phối trộn có chọn lọc một số kích thước mục tiêu và xây dựng nên 2 thang HT100 và HT200 (Hình 4), trong đó vạch sáng chỉ thị là sản phẩm DNA có kích thước 400 bp và 1200 bp với thang HT100, vạch 800 bp với thang HT200. So với thang phối trộn đủ các sản phẩm DNA có kích thước từ 100 – 2000 bp, thì các thang HT100 và HT200 có các vạch phân tách rõ rệt và phù hợp hơn để ứng dụng làm thang trong các thí nghiệm phân tích về kích thước DNA. Năng độ cụ thể của các vạch DNA phối trộn được trình bày trong Bảng 4 và Bảng 5.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm phối trộn. (A): Thang HT100; (B): Thang HT200

Trong sinh học phân tử, kỹ thuật điện di trên gel agarose được sử dụng rất phổ biến, tuy nhiên hầu hết thang DNA được sử dụng trong nước hiện nay là sản phẩm thương mại từ các công ti nước ngoài với giá thành cao, chính vì vậy để thuận tiện cho quá trình nghiên cứu và giảm kinh phí, việc chủ động tự tạo thang DNA tại các phòng thí nghiệm và trung tâm nghiên cứu đang được quan tâm đến.

Bảng 3. Nồng độ phối trộn các vạch DNA trong thang HT100

Kích thước vạch DNA (bp)	Nồng độ (ng/ μ l)
2000	100
1500	100
1200	200
1000	100
800	100
600	100
500	100
400	250
300	100
200	150
100	200

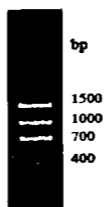
Bảng 4. Nồng độ phối trộn các vạch DNA trong thang HT200

Kích thước vạch DNA (bp)	Nồng độ (ng/ μ l)
2000	100
1500	100
1000	100
800	200
600	100
400	200
200	150

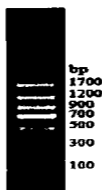
Dựa vào các nghiên cứu liên quan đã được công bố, quá trình xây dựng thang dựa trên việc dòng hóa đoạn DNA có kích thước xác định vào một vector khuôn, do vậy việc tiến hành dòng hóa tạo hàng loạt plasmid tái tổ hợp mang các đoạn DNA có kích thước khác nhau tốn nhiều thời gian và công sức [1, 2, 5]. Việc sử dụng kết hợp tin sinh học để thiết kế mỗi trên một khuôn pHT254 duy nhất và PCR thu các đoạn DNA có kích thước khác nhau đã khắc phục được những khuyết điểm còn tồn tại của chiến lược sử dụng kỹ thuật PCR tạo thang DNA.

Kết quả của nghiên cứu đã chứng minh khả năng ứng dụng cao của phương pháp vì qua quá trình khảo sát cho thấy điều kiện phản ứng PCR tương đối giống nhau ở mỗi cặp mỗi, tạo thuận lợi cho quá trình chuẩn bị cũng như tiến hành tất cả các phản ứng PCR thu các đoạn DNA, đem lại sự thuận tiện và hiệu quả cho người sử dụng. Bên cạnh đó, việc chủ động trong quá trình phối trộn có chọn lọc các vạch DNA với kích thước mong muốn giúp xây dựng các thang DNA phù hợp với mục đích nghiên cứu, thang DNA có thể chỉ bao gồm một vài vạch DNA có kích thước phù hợp với mục tiêu ứng dụng (Hình 7, Hình 8). Ở phương pháp cắt giới hạn DNA plasmid hay DNA bộ gene phage có kích thước sản phẩm cắt không thể kiểm soát như thang DNA lamda cắt bằng *Hind*III và *Eco*RI cho kích thước một số vạch như là 564, 831, 947 và 1375 bp.

Trong khi đó, phương pháp PCR thu DNA làm thang cho các vạch có thể kiểm soát như 100, 200, 300, 400, 500 bp... giúp thuận tiện hơn trong quá trình phân tích kết quả điện di, đặc biệt với các vạch có sự chênh lệch về kích thước không lớn.



Hình 7. Thang DNA với bốn vạch mục tiêu gồm 400, 700, 1000 và 1500 bp



Hình 8. Thang DNA HT100B với các vạch 100, 300, 500, 700, 900, 1200, 1700 bp

4. Kết luận

Đã thiết kế được 20 cặp mồi đặc hiệu trên plasmid pHT254. Chỉ với một khuôn plasmid pHT254 đã giúp thu nhận được các vạch cơ bản của thang từ 100 – 2000 bp trong cùng một điều kiện tối ưu. Quá trình phối trộn các thang theo nhiều kích thước và nồng độ khác nhau phù hợp với mục đích của người sử dụng.

Ghi chú: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh trong khuôn khổ nhiệm vụ thường xuyên theo chức năng, mã số TX2015-18-07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abbasian, M., Seyedi, H.A.E., Boroujeni, Z.K. and Mofid, M.R. (2015), "Easy method for production of a home-made DNA ladder in every laboratory", *Advanced Biomedical Research*, 4.
2. Chang, M., Wang, J.-H. and Lee, H.-J. (2008), "Laboratory production of 100 base pair DNA molecular weight markers", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(6), pp.1199-1202.
3. Cooney, C.A., Galbraith, J.L. and Bradbury, E.M. (1989), "A regularly spaced DNA size standard with 10 kbp resolution for pulsed field gel electrophoresis", *Nucleic Acids Research*, 17(13), pp.5412-5412.
4. Gitelman, I. and Davis, C.A. (1997), "A novel DNA molecular weight ladder", *Technical Tips Online*, 2(1), pp.82-83.
5. Lan, V.T.T., Loan, P.T.T., Duong, P.A.T., Thanh, L.T., Ha, N.T., Thuan, T.B., Lan, V.T.T., Loan, P.T.T., Duong, P.A.T., Thanh, L.T., Ha, N.T. and Thuan, T.B. (2012), "Straightforward Procedure for Laboratory Production of DNA Ladder, Straightforward Procedure for Laboratory Production of DNA Ladder", *Journal of Nucleic Acids. Journal of Nucleic Acids*, 2012, 2012, e254630.
6. Polyarush, S.V., Egamberdiev, S.S., Mansurov, D.R. and Azimova, S.S. (2003), "Preparation of DNA Markers Based on *E. coli* Plasmid DNA", *Chemistry of Natural Compounds*, 39(6), pp.592-594.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 06-01-2016; ngày phản biện đánh giá: 03-02-2016;
ngày chấp nhận đăng: 17-3-2016)