

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CHUYÊN GEN CỦA TRANSPONSON *SLEEPING BEAUTY* TRÊN NGUYÊN BẢO SỢI THAI CHUỘT

Nguyễn Lai Thành, Nguyễn Tiến Lung, Đặng Văn Đức

Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Các vector transposon *Sleeping Beauty* đã được sử dụng để chuyển gen trên nhiều loại tế bào khác nhau của cá, gà, chuột và người. Chúng tôi đã tiến hành chuyển tổ hợp gen mã hóa peptide kháng khuẩn cecropin B (CB) và gen *EGFP* vào nguyên bào sợi thai chuột thông qua vector transposon *Sleeping Beauty*. Gen chuyển đã được duy trì trong hệ gen tế bào tương đối ổn định, được phát hiện bằng phản ứng PCR cũng như biểu hiện thành sản phẩm protein có hoạt tính sinh học. Kết quả này đã chứng minh khả năng hoạt động của vector transposon *Sleeping Beauty* trên nguyên bào sợi thai chuột, đồng thời mở ra tiềm năng cho việc sản xuất cecropin B tại tổ hợp bằng nguyên bào sợi chuột nuôi cấy ở Việt Nam.

Từ khóa: transposon *Sleeping Beauty*, nguyên bào sợi thai chuột, cecropin B.

MỞ ĐẦU

Transposon *Sleeping Beauty* là vector chuyển gen được thiết kế trên cơ sở tổ hợp 12 yếu tố di truyền vận động họ *Tc1/mariner* (thuộc lớp transposon ADN) từ 8 loài cá khác nhau (Ivics, Hackett, 1997). Mặc dù vậy, hệ thống vector này có khả năng hoạt động trên nhiều loại tế bào ở nhiều loài khác nhau như tế bào ung thư biểu mô phổi người, tế bào gan chuột, nguyên bào sợi gà bắt lửa... (Izsvák, Ivics, 2004; Kong và cs, 2008).

Các vector này có cấu trúc tương đối đơn giản, bao gồm một số trình tự gen bị chặn hai đầu bởi các đoạn lặp lại ngược chiều (inverted repeat – IR) và gen mã hóa enzyme transposase hoạt động để cắt transposon ra khỏi nguồn ADN, dán nó vào vị trí khác. Những vector transposon độc lập (kiểu *cis*) mang gen transposase bên trong nó trong khi những vector transposon phụ thuộc (kiểu *trans*) cần đến một nguồn transposase khác cho sự vận động (Cui và cs, 2002). Tận cùng mỗi IR (đài khoảng 200–250bp) chứa cặp đoạn lặp lại xuôi chiều (directed repeat – DR) dài 15–20bp, là vị trí liên kết của enzyme transposase (Ivics và cs, 1997).

Khi transposase này hoạt động, chúng liên kết với các trình tự tương ứng trên IR/DR và cắt các transposon ở cuối mỗi IR/DR. Các phân đoạn gen nằm giữa 2 vùng này được tích hợp vào một nơi khác trong nhiễm sắc thể nhận. Sự tích hợp xảy ra tại vị trí chứa 2 nucleotide TA, được nhân đôi ở 2 đầu transposon sau khi chèn (Belur và cs, 2007).

Các hệ thống vector transposon *Sleeping Beauty* có ưu điểm: (i) hoạt động được dưới tác động của enzyme transposase, năng cao hiệu quả tích hợp gen chuyển vào hệ gen vật chủ, (ii) vị trí chèn trên hệ gen độc trung bởi trình tự đích chứa 2 nucleotide liên tiếp TA, và (iii) sau khi chèn vào hệ gen, gen chuyển có khả năng được duy trì ổn định qua các thế hệ mà không bị đào thải (Harms và cs, 2002). Nhờ đó, chúng có triển vọng lớn như một công cụ chuyển gen, tạo đột biến thêm đoạn và bẫy gen trong động vật có xương sống cũng như liệu pháp gen ở người (Cui và cs, 2002; Izsvák, Ivics, 2004). Một số transposon hoạt động thuộc họ *Tc1/mariner* đã được tạo dòng và nghiên cứu về tiềm năng sử dụng cho những mục đích đó (Harris và cs, 2002; Izsvák và cs, 2000).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng vector transposon *Sleeping Beauty* để chuyển tổ hợp gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh lá cây (*EGFP*) và peptide kháng khuẩn cecropin B (CB) vào nguyên bào sợi thai chuột (mouse Embryonic Fibroblasts – mEFs).

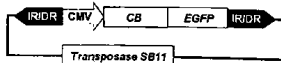
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp phân lập và nuôi cấy nguyên bào sợi thai chuột

Phương pháp phân lập và nhân nuôi mEFs được thực hiện theo mô tả của Nagy và đồng tác giả (Nagy và cs, 2003), có một số biến đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. cESCs được thu nhận bằng cách phân tách thân của thai chuột 13,5–14,5 ngày tuổi trong Trypsin 0,25%/EDTA 0,025% (Sigma), sau đó ly tâm 200g trong 15 phút. Tế bào sau khi thu nhận được huyền phù hóa trong môi trường nuôi cấy và chuyển vào các chai nuôi cấy T25 (Corning) với số lượng tế bào tương đương 1 chai/chai. Môi trường nuôi cấy mEFs bao gồm Opti-MEM® (Gibco) bổ sung 10% thể tích FBS (Invitrogen), 100U/ml Peniciline, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco). 24 giờ sau khi phân lập tiến hành thay môi trường, những ngày sau đó thay môi trường 3 ngày/lần.

Phương pháp chuyển gen bằng liposome FuGENE® HD

Trong nghiên cứu này, vector sử dụng được xây dựng từ transposon *Sleeping Beauty* pT2/IRH-CVpf-SB11 đã được chứng minh khả năng hoạt động ở một số nghiên cứu đã công bố (Lê Thị Tuyết và cs, 2010; Nguyễn Thị Hồng Hạnh và cs, 2010) trong đó gen CB (cecropin B) được đưa vào tổ hợp cùng gen *EGFP* trong transposon (Hình 1).



Hình 1. Mô hình cấu trúc vector transposon *Sleeping Beauty* được sử dụng

Khu tế bào che phủ khoảng 80% bề mặt chai nuôi cấy thì cấy chuyển tế bào sang đĩa nuôi cấy 35mm (Corning) với môi

độ khoảng 4×10^4 tế bào/cm², sử dụng môi trường không có kháng sinh, 24 giờ sau có thể tiến hành chuyển nhiễm. Phục hệ chuyển gen (dùng cho mỗi đĩa nuôi cấy) được chuẩn bị bằng cách ủ 4μg DNA và 5μl FuGENE® HD (Roche) trong 100μl Opti-MEM® với thời gian 30–45 phút. Loại bỏ hoàn toàn môi trường trong đĩa tế bào, rửa lại bằng PBS, bổ sung 0,5ml Opti-MEM® và phục hệ lipoplex, ủ qua đêm. Ngày hôm sau tiến hành thay môi trường, những ngày sau đó thay môi trường 3 ngày/lần.

Phương pháp phát hiện gen chuyển trong hệ gen mEFs bằng phản ứng PCR

Một phần những tế bào sau khi chuyển gen 5–7 ngày được thu nhận để tách chiết ADN hệ gen bằng DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Roche) và phân tích PCR kiểm tra sự có mặt gen chuyển. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các cặp mồi đặc hiệu nhân bản đoạn ADN 189bp của gen chuyển CB (CBF: 5' – TTC TCA AGG ATA TTT TTC TTC GTG TTC GCT – 3'; CBR: 5' – TTA AAG AGT TCC TAT AAA AAG AAG CAC AAG – 3'), và đoạn ADN 321bp của gen 18S làm chứng nội (18SFor: 5' – GTC GGC GTC CAA CTT CTT – 3'; 18SRev: 5' – CGA TCC GAG GAC CTC ACT – 3'). Sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose (Sigma) 1% ở 80V, 400mA trong 60 phút và nhuộm bằng Ethidium bromide (Invitrogen) nồng độ 2μg/ml.

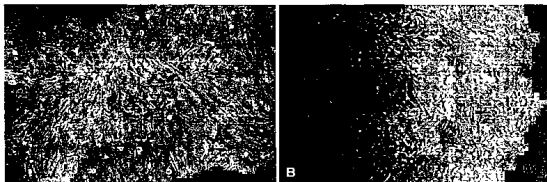
Phương pháp kiểm tra biểu hiện gen

mEFs sau chuyển gen được cấy chuyển sang đĩa nuôi cấy có đặt sẵn các phiên kính tròn. Sau 2–3 ngày, các phiên kính này được đặt trên lam kính lõm có sẵn giọt môi trường nuôi cấy và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan 2 (Carl Zeiss).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và nuôi cấy mEFs

Tế bào mEFs được phân lập từ thân của thai chuột 13,5 – 14,5 ngày. Ở thể hệ nguyên phát (P0), mEFs thu nhận được ở dạng hoạt động hình thoi, dài, có tua tua: nhọn hai đầu và bám dính xuống bề mặt chai nuôi cấy. Trong chai nuôi cấy còn có lẫn một số loại tế bào không phải nguyên bào sợi (chủ yếu là tế bào máu) có hình tròn, bám dính đáy hoặc lơ lửng trong môi trường nuôi cấy. Các tế bào này đều bị loại bỏ hoàn toàn một cách dễ dàng qua 1–2 lần cấy chuyển.



Hình 2. Tế bào mEFs nuôi cấy nguyên phát sau khi phân lập

(A) 24 giờ sau phân lập (P0), trong chai nuôi cấy gồm cả nguyên bào sợi (1) và các loại tế bào khác (2); (B) Ở thể hệ được cấy chuyển lần thứ 3 (P3), chai nuôi cấy chỉ còn lại mEFs.

Từ thể hệ nguyên phát (P0) cho tới 4–5 lần cấy chuyển (P4–P5), mEFs tăng sinh khá mạnh. Tuy nhiên đến P6–P9, mEFs bước vào giai đoạn già hóa, tăng sinh rất chậm và xuất hiện nhiều tế bào chết. Những tế bào thu được ở lần cấy chuyển 3–4 sẽ được sử dụng để chuyển tổ hợp gen *EGFP* và cecropin B (CB) thông qua vector transposon nhờ liposome FuGENE® HD.

Kiểm tra sự có mặt gen chuyển trong hệ gen

Những tế bào sau chuyển gen 5 ngày được thu một phần để tách chiết ADN hệ gen và phân tích PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR thể hiện ở Hình 3, gen chuyển CB đã được phát hiện trong mẫu mEFs chuyển gen. Trong quá trình nghiên cứu, đã có 5 mẫu tế bào trong tổng số 12 mẫu được sàng lọc đã phát hiện được gen chuyển bằng phương pháp này.



Hình 3. Kết quả phân tích PCR phát hiện gen chuyển trong tế bào

(-) Đối chứng âm; (+) Đối chứng dương; (M) Thang chuẩn 0,5kb; (18S) Phân tích với cặp mồi khuếch đại đoạn gen chứng nội 18S (321bp); (CB) Phân tích với cặp mồi khuếch đại đoạn gen chuyển CB (200bp); (mEFs DC) Mẫu tế bào đối chứng; (mEFs TN1811) Mẫu tế bào chuyển gen

Vector transposon *Sleeping Beauty* được sử dụng trong nghiên cứu này không thể nhận lên trong tế bào chất do không chứa tâm tái bản của sinh vật nhân chuẩn nên bị phân hủy nhanh chóng nếu gen không được chèn vào nhiễm sắc thể mEFs. Đồng thời, các mẫu ADN đều được tách bằng Kit đặc hiệu đối với ADN hệ gen. Do vậy, có thể tin tưởng rằng các mẫu dương tính trong phản ứng PCR, gen CB đã chèn được vào hệ gen của mEFs.

Sự biểu hiện EGFP trong các mẫu tế bào chuyển gen

Trên vector được sử dụng trong nghiên cứu này, gen chuyển CB được tổ hợp cùng gen EGFP và hoạt động cùng nhau, nên nếu gen chuyển được biểu hiện, mEFs có khả năng phát huỳnh quang màu xanh lá cây dưới ánh sáng kích thích thích hợp. Những tế bào sau khi chuyển gen 5 ngày được kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang (bộ lọc FITC). Kết quả, đã có 3 mẫu tế bào phát ánh sáng màu xanh lục đặc trưng (đều là những mẫu đã phát hiện gen chuyển bằng phản ứng PCR). Tuy có lượng đáng kể mEFs phát huỳnh quang khi được kích thích nhưng cũng còn nhiều tế bào không có khả năng đó. Điều này có thể giải thích do trước khi được quan sát, mEFs sau khi chuyển nhiễm chưa được sàng lọc những tế bào mang gen chuyển, đồng thời một số tế bào đã mang gen EGFP nhưng lượng protein được dịch mã tương đối ít cũng khó có thể nhận biết được. Như vậy gen EGFP (được tổ hợp cùng gen chuyển CB) sau khi hội nhập vào hệ gen mEFs đã được biểu hiện thành sản phẩm có hoạt tính



Hình 4. Sự biểu hiện EGFP trong mẫu tế bào chuyển gen

KẾT LUẬN

Những kết quả thu được cho thấy tính khả thi trong việc sử dụng vector transposon *Sleeping Beauty* để chuyển gen vào nguyên bào sợi chuột nuôi cấy. Gen chuyển đã được phát hiện trong hệ gen tế bào bằng phản ứng PCR, cũng như biểu hiện thành sản phẩm protein có hoạt động chức năng. Đồng thời, những nghiên cứu sâu hơn có thể mang lại tiềm năng cho việc sản xuất peptide kháng khuẩn Cecropin B tái tổ hợp trên hệ thống tế bào động vật tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ ĐHQG Hà Nội; Chúng tôi xin chân thành cảm ơn nhóm nghiên cứu thuộc Bộ môn Di truyền, ĐH Tổng hợp Malaga, Tây Ban Nha và Phòng thí nghiệm Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Enzyme - Protein (ĐHKHTN, ĐHQGHN) đã giúp đỡ hoàn thiện vector chuyển gen sử dụng cho nghiên cứu này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Belur LR, Padetz-Pedersen K, Frandsen J, Mctivor RS (2007), Lung-directed gene therapy in mice using the nonviral *Sleeping Beauty* transposon system. *Nature Protocols* 2: 3146–3152.
- Cui Z, Geurts AM, Liu G, Kaufman CD, Hackett PB (2002), Structure – function analysis of the inverted terminal repeats of the *Sleeping Beauty* transposon. *Journal of Molecular Biology* 318(5): 1221–1235.
- Harris JW, Strong DD, Armour M, Baylink DJ, Lau KHW (2002), Construction of a *Tc1*-like transposon *Sleeping Beauty* – based gene transfer plasmid vector for generation of stable transgenic mammalian cell clones. *Analytical Biochemistry* 310(1): 15–26.
- Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z (1997), Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91(4): 501–510.
- Izsvák Z, Ivics Z (2004), *Sleeping Beauty* transposition: biology and applications for molecular therapy. *Molecular Therapy* 9(2): 147–156.
- Izsvák Z, Ivics Z, Plasterk RH (2000), *Sleeping Beauty*, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 302(1): 93–102.
- Kong BW, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Foster DN (2008), Application of the *Sleeping Beauty* transposon system to avian cells. *Animal Genetics* 39(2): 180–186.
- Lê Thị Tuyết, Nguyễn Lai Thành, Nguyễn Duy Điều, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Phạm Nguyệt Hằng (2010), Thử nghiệm chuyển gen GFP trên gà (*Gallus gallus domesticus*) sử dụng vector pTZ/BH-CVpf-SB11 bằng phương pháp chuyển gen qua tinh trùng. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 26(2): 266–273.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer RR (2003), *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, 3 ed.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Lai Thành, Nguyễn Duy Điều, Thân Thị Trang Uyên, Lê Thị Tuyết, Thân Thị Linh Quyên (2010), Thử nghiệm chuyển gen EGFP trên gà (*Gallus gallus domesticus*) sử dụng vector pTZ/BH-CVpf-SB11 bằng phương pháp vi tiêm vào phôi

giá 0 giờ áp. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 26(2S): 124-131.

EVALUATING EFFECTION OF TRANSFERING GENE OF *SLEEPING BEAUTY* TRANSPOSON ONTO MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS

Nguyen Lai Thanh, Nguyen Tien Lung, Dang Van Duc

Faculty of Biology, VNU University of Science

SUMMARY

Sleeping Beauty transposon vector was used to transfer gene into many different cell types of like fish, chicken, mouse and human. We introduced an expression cassette encoding for the fusion of antimicrobial peptide cecropin B (CB) and *EGFP* gene into mouse embryonic fibroblasts via *Sleeping Beauty* transposon vector. PCR results and fluorescent microscopic images showed that transgene was maintained relatively stable in mEFs cells after several passages. These results demonstrated the potential of transgenic mouse cell production using transposon in Vietnam.

Keywords: *Sleeping Beauty* transposon, mouse embryonic fibroblasts, cecropin B.