

TỔNG HỢP ĐẦU ĐÒ GẮN HUỖNH QUANG PHỤC VỤ LAI FISH SỬ DỤNG KỸ THUẬT DOP-PCR

Nguyễn Tiến Lung, Hoàng Thị Xoan, Nguyễn Lai Thành

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

TÓM TẮT

Lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) là một kỹ thuật di truyền tế bào được sử dụng để phát hiện và xác định vị trí của trình tự ADN cụ thể trong tế bào FISH sử dụng đầu dò gắn huỳnh quang liên kết với những vị trí đặc hiệu của nhiễm sắc thể tế bào đích. Trong nghiên cứu này chúng tôi thiết kế mỗi và chuẩn hóa điều kiện phản ứng DOP-PCR để tổng hợp đầu dò gắn Alexa 568 đặc hiệu với gen interleukin-6 ở người. Đầu dò đã được tổng hợp và cường độ tín hiệu huỳnh quang cao, đồng thời đã bước đầu được sử dụng để phát hiện gen tương ứng trong tế bào gốc phôi gà chuyển gen. Kết quả nghiên cứu góp phần phát triển việc ứng dụng kỹ thuật FISH trong nghiên cứu cơ bản cũng như ứng dụng tại Việt Nam.

Từ khóa: lai huỳnh quang tại chỗ (FISH), đầu dò gắn huỳnh quang, DOP-PCR.

MỞ ĐẦU

Lai huỳnh quang tại chỗ (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH) là một trong những phương pháp lai ADN được sử dụng phổ biến hiện nay. Trong phản ứng FISH, đầu dò đặc hiệu với một trình tự đích nào đó được đánh dấu bằng chất phát huỳnh quang, được phân tích dưới kính hiển vi huỳnh quang, cho phép phát hiện và xác định vị trí của gen đích trên mẫu nghiên cứu. Kỹ thuật này được sử dụng phổ biến trong sinh học phân tử và chẩn đoán điều trị nhằm phát hiện những bất thường trên nhiễm sắc thể, nghiên cứu về khối u, lập bản đồ kiểu nhân, xây dựng hệ thống phát sinh loài... Có thể nói FISH là cầu nối giữa lĩnh vực di truyền học cổ điển với di truyền học hiện đại, kết hợp sự chính xác của các kỹ thuật di truyền phân tử và sự quan sát trực quan bằng kính hiển vi (Bishop, 2010; Wolman, 1997).

Ở Việt Nam hiện nay, một số bệnh viện lớn như Bệnh viện K, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Bệnh viện Nhi Trung ương... đã sử dụng FISH để chẩn đoán một số bệnh di truyền ở người (Đặng Thị Hoàng Nhung, Nguyễn Duy Ngọc, 2008; Nguyễn Thị Tân Sinh *et al.*, 2011). Tuy nhiên, trong nghiên cứu cơ bản, việc ứng dụng này còn rất hạn chế. Đến nay, chưa có báo cáo nào về việc sử dụng phương pháp này để đánh giá sự chèn gen ngoại lai vào tế bào gốc của tế bào động vật. Mặt khác, trong những nghiên cứu trên, đầu dò sử dụng đầu là các sản phẩm thương mại, hoặc được tự thiết kế nhưng đặt tổng hợp tại các hãng nổi tiếng, chưa tự tổng hợp tại phòng thí nghiệm sử dụng chúng (Đặng Thị Hoàng Nhung, Nguyễn Duy Ngọc, 2008; Nguyễn Thị Tân Sinh *et al.*, 2011; Nguyễn Văn Nguyễn *et al.*, 2011). Trước đây, chúng tôi đã tiến hành chuyển gen mã hóa interleukin-6 (IL-6) vào tế bào gốc phôi gà thông qua vector chuyển gen pL6/IL6 (dựa trên vector pLenti6/V5-DEST (Gateway), đã chèn thêm gen IL-6), gen chuyển đã được phát hiện trong tế bào bằng phản ứng PCR. Tuy nhiên khi tiêm những tế bào này vào phôi nhận, hiệu quả thu được không cao, nguyên nhân có thể do gen được chuyển chèn vào các vị trí gen hoạt động của tế bào, từ đó gây nên những biến động bất thường làm tế bào không thể hội nhập vào phôi nhận hoặc phôi bị chết (Nguyễn Tiến Lung, Nguyễn Lai Thành, 2012). Vì vậy việc xác định vị trí chèn gen ngoại lai trên nhiễm sắc thể của tế bào, từ đó dự đoán ảnh hưởng của chúng là việc làm cần thiết. Nghiên cứu này tập trung theo hướng tổng hợp đầu dò đặc hiệu gen IL-6 người ngay tại phòng thí nghiệm làm nguyên liệu cho phản ứng lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết kế cặp mồi để tổng hợp đầu dò đặc hiệu gen IL-6 người

Các cặp mồi tổng hợp đầu dò (kích thước khoảng 300bp) đặc hiệu gen IL-6 người được thiết kế dựa trên trình tự cDNA bằng chương trình thiết kế mồi Primer3. Cặp mồi (IL6-F và IL6-R) có các thông số phù hợp nhất được kiểm tra khả năng tổng hợp với vector chuyển gen và ADN hệ gen tế bào chủ (hệ gen gà *Gallus gallus domesticus*) bằng công cụ tìm kiếm BLAST tại cơ sở dữ liệu NCBI. Sau khi kiểm tra, cặp mồi được đặt tổng hợp bởi hãng BioBasic.

Tối ưu hóa điều kiện phản ứng PCR tổng hợp đầu dò

Trong nghiên cứu này, hai điều kiện được chuẩn hóa là nhiệt độ bất cặp mồi và nồng độ Mg^{2+} của phản ứng (nồng độ Mg^{2+} càng cao, nhiệt độ bất cặp càng thấp thì càng tăng hiệu suất PCR nhưng làm giảm độ đặc hiệu). Nồng độ các chất trong các phản ứng PCR bao gồm: dNTP 0,15 mM mỗi loại; các mồi IL6-F và IL6-R 0,5 mM mỗi loại; 0,1 U/μl Taq DNA polymerase; PCR buffer 1X (không chứa $MgCl_2$); 0,3 ng/μl khuôn (vector pL6/IL6); $MgCl_2$ ở dải nồng độ 1–4 mM. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR: 94°C trong 7 phút trước chu kỳ đầu tiên; 35 chu kỳ: biến tính 94°C trong 30 giây, gắn mồi với gradient nhiệt độ 45–55°C trong 30 giây, tổng hợp 72°C trong 30 giây; 72°C trong 7 phút sau chu kỳ cuối cùng. Sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,5% và nhuộm ethidium bromide 2 μg/ml để đánh giá hàm lượng ADN được tổng hợp. Ngoài ra, các mẫu sản phẩm cũng được giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3130 Sequencer nhằm đánh giá mức độ tương đồng của sản phẩm tổng hợp với trình tự đầu dò theo thiết kế.

Tổng hợp đầu dò bằng phản ứng DOP-PCR

Thành phần phản ứng PCR tương tự như trên, trong đó nồng độ Mg^{2+} đã chuẩn hóa, nồng độ dTTP giảm xuống 0,05 mM, bổ sung Alexa 568-5-dUTP (Invitrogen) 1mM sao cho nồng độ cuối cùng là 0,10 mM. Chu kỳ nhiệt của phản ứng DOP-PCR: 94°C trong 7 phút trước chu kỳ đầu tiên, 35 chu kỳ: biến tính 94°C trong 30 giây, gắn mồi theo nhiệt độ tối ưu trong 60 giây, tổng hợp 72°C trong 60 giây và tăng thêm 2 giây sau mỗi chu kỳ; 72°C trong 7 phút sau chu kỳ cuối cùng. Sản phẩm tổng hợp được tinh sạch để sử dụng cho phản ứng lai FISH.

Đánh giá khả năng lai của đầu dò

Đem lai chưa đầu dò được chuẩn bị với các thành phần có nồng độ như sau: 0,5–1,5 ng/μl đầu dò; formamide 50%.

SDS 0,1%; 300 ng/ml ADN tinh trùng cá; pha trong SSC 2X (NaCl 300 mM; sodium citrate 30 mM). Tế bào gốc phối giả chuyển gen IL-6 được gắn lên lam. xử lý qua RNase và trypsin, sau đó ủ cùng 10 μ l đệm tại, biến tính ở 70°C trong 10 phút và lai ở 65°C qua đêm (ít nhất 12 giờ). Sau khi lai, tiêu bản được hạ từ từ nhiệt độ xuống 37°C, rửa qua formamide 20%/SSC 0,1X và SSC 2x, tiếp tục ủ cùng đệm phát hiện (BSA 5%; Tween 20 nồng độ 0,2%; pha trong SSC 4X) trong 30 phút. Các mẫu được nhuộm DAPI 2 μ g/ml trong 10 phút trước khi phân tích bằng hệ thống hiển vi huỳnh quang Axiovert 100M Confocal LSM (Zeiss).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho gen IL-6 của người

Sử dụng chương trình Primer3, dựa trên trình tự cDNA của gen IL-6, chúng tôi thiết kế được 5 cặp mồi với các sản phẩm tương ứng có kích thước 288–336 bp có thể sử dụng làm đầu dò, trong đó cặp mồi có chất lượng tốt nhất theo kết quả xử lý của chương trình Primer 3 (kích thước sản phẩm 289bp) là:

IL6-F: TGC TCC TGG TGT TG (nhiệt độ tách mồi $T_m = 46,2^\circ\text{C}$)

IL6-R: TTC ACC AGG CAA GT ($T_m = 44,6^\circ\text{C}$)

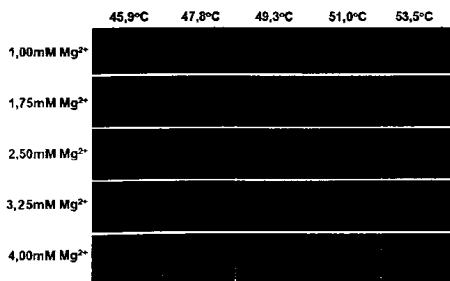
Kết quả kiểm tra bằng công cụ Nucleotide – BLAST (BLASTn) cho thấy cặp mồi được thiết kế có độ đặc hiệu và độ nhạy cao với cDNA của gen IL-6 (độ tương đồng đạt 100%). Sử dụng trình tự đầu dò được nhận lên theo lý thuyết (kích thước 289bp), chúng tôi đánh giá khả năng bắt cặp của nó với vector pL6/IL6 và với hệ gen tế bào chủ (gà Lương Phượng *Gallus gallus domesticus*). Kết quả cho thấy đầu dò bắt cặp đặc hiệu với vector ở vị trí 2537–2835, nằm trong vị trí của gen chuyển IL-6 (ở vị trí 2485 – 3123), cho thấy khi tổng hợp đầu dò bằng vector pL6/IL6 sẽ thu được sản phẩm duy nhất trong gen IL-6. Khi kiểm tra với hệ gen gà *Gallus gallus domesticus*, đầu dò không bắt cặp được với vị trí nào, nên có thể sử dụng để kiểm tra khả năng chuyển gen IL-6 trên tế bào gà.

Kết quả tối ưu hóa điều kiện phản ứng

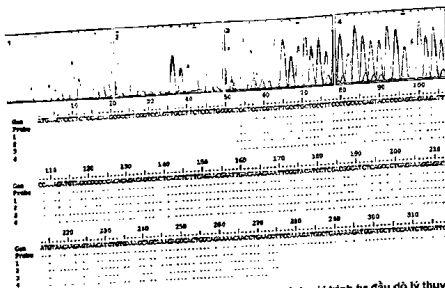
Nồng độ Mg²⁺ thường được sử dụng trong phản ứng PCR là 1,00 – 4,00 mM, trong khi nhiệt độ bắt cặp mồi thường cao hơn nhiệt độ biến tính 5–10°C. Trong nghiên cứu này chúng tôi tối ưu hóa điều kiện phản ứng với các thông số nhiệt độ bắt cặp mồi 45°C – 55°C và nồng độ ion Mg²⁺ 1,00 – 4,00 mM.

Kết quả đánh giá hiệu suất phản ứng bằng cách điện di sản phẩm PCR cho thấy, khi nồng độ Mg²⁺ tăng dần (1,00–3,25 mM), lượng sản phẩm sinh ra càng nhiều, nhưng khi nồng độ Mg²⁺ lên quá cao (4 mM) thì phản ứng PCR bị ức chế, lượng sản phẩm thu được ít hơn. Nhiệt độ gắn mồi 49,3°C cho kết quả khuếch đại gen tốt nhất trong các nhiệt độ được thử nghiệm. Trong tất cả các mẫu, mẫu ở nồng độ Mg²⁺ 3,25 mM và nhiệt độ gắn mồi 49,3°C thu được nhiều sản phẩm PCR nhất, tức băng điện di có độ sáng lớn nhất (Hình 1).

Yêu cầu quan trọng trong việc tổng hợp đầu dò là trình tự đoạn được khuếch đại phải đảm bảo chính xác. Vì vậy chúng tôi thu một số mẫu có độ sáng băng điện di khác nhau để tiến hành giải trình tự: nồng độ Mg²⁺ 1,75M và 3,25M, mỗi nồng độ đó chọn 2 mẫu có nhiệt độ gắn mồi 45,9°C và 49,3°C. Kết quả giải trình tự và so sánh trình tự thu được với trình tự đầu dò theo lý thuyết cho thấy các sản phẩm PCR đều có trình tự và vị trí tương đồng cao (trên 90%) với trình tự đầu dò theo lý thuyết. Mặc dù vậy, các mẫu đo cho mức độ tín hiệu khác nhau: mẫu tổng hợp ở điều kiện nồng độ Mg²⁺ 3,25M, nhiệt độ gắn mồi 49,3°C cho tín hiệu rõ nét nhất, độ nhiễu thấp; các mẫu còn lại có độ nhiễu cao hơn hoặc tín hiệu không rõ bằng (Hình 2).



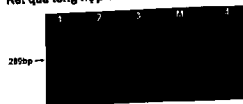
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ gắn mồi và nồng độ Mg²⁺ tới hiệu suất phản ứng



Hình 2. Kết quả giải trình tự các sản phẩm PCR và so sánh với trình tự đầu dò lý thuyết

Kết quả giải trình tự các mẫu (hình trên) và kết quả so sánh với trình tự đầu dò theo lý thuyết (hình dưới); Các mẫu tổng hợp ở các điều kiện khác nhau: Mg²⁺ 1,75 M; T_a = 45,9°C (1); Mg²⁺ 1,75 M; T_a = 49,3°C (2); Mg²⁺ 3,25 M; T_a = 45,9°C (3); Mg²⁺ 3,25 M; T_a = 49,3°C (4).

Kết quả tổng hợp đầu dò bằng phản ứng DOP-PCR



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR tổng hợp đầu dò

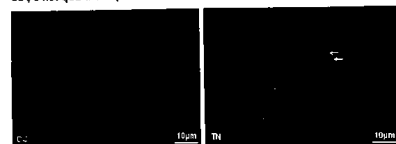
Các giếng 1-3 các mẫu đối chứng sau khi nhuộm ethidium bromide, tổng hợp với dNTP thường, khuôn tổng hợp: giếng 1 - H₂O (đối chứng âm); giếng 2 - vector pL6/IL6; giếng 3 - ADN gà. Giếng 4: mẫu tổng hợp từ vector pL6/IL6 với thành phần phản ứng bổ sung dUTP đánh dấu, không nhuộm ethidium bromide.

Đầu dò được tổng hợp bằng phản ứng DOP-PCR, với thời gian tổng hợp ở 72°C được kéo dài sau mỗi chu kỳ, do nguyên liệu tổng hợp chứa thêm dUTP gắn Alexa 568 có cấu trúc vòng kềm, cần thời gian dài hơn để vận chuyển cũng như gắn vào chuỗi tổng hợp.

Kết quả điện di cho thấy: băng kích thước 289bp (kích thước gần bằng băng 300bp ở thang chuẩn) thu được ở mẫu PCR sử dụng khuôn là vector chuyển gen pL6/IL6, trong khi không xuất hiện ở mẫu ADN hệ gen gà, chứng minh bằng thực nghiệm và độ đặc hiệu của cặp mỗi với gen IL-6 người trên vector. Mẫu tổng hợp sử dụng dUTP đánh dấu Alexa 568 thu được băng có kích thước tương đương, độ sáng đủ quan sát bằng mắt thường khi không nhuộm qua các thuốc nhuộm đặc hiệu, cho thấy sản phẩm đã được đánh dấu với mức độ tương đối lớn (Hình 3). Sản phẩm này được tinh sạch nhằm chuẩn bị cho những nghiên cứu tiếp theo. Các mẫu đầu dò này đều có cường độ huỳnh quang (theo chỉ số đơn vị huỳnh quang tương đối - RFU) ở bước sóng 665 nm là 102,1-106,5.

Kết quả lai FISH sử dụng đầu dò

Sử dụng đầu dò đã tổng hợp thực hiện phản ứng lai FISH với tế bào gốc phôi gà chuyển gen IL-6 người, chúng tôi thu được kết quả thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Kết quả lai FISH trên tế bào gốc phôi gà chuyển gen IL-6 người sử dụng đầu dò đã tổng hợp

(ĐC) Mẫu đối chứng, (TN) mẫu chuyển gen. Nhân tế bào được nhuộm với DAPI bắt màu xanh lam. Các vị trí bắt cặp đặc hiệu giữa đầu dò đánh dấu Alexa 568 và ADN nhân tế bào có màu đỏ (vị trí mũi lên).

Thảo luận về tiềm năng ứng dụng của đầu dò tổng hợp tại chỗ bằng DOP-PCR

Ở Việt Nam, kỹ thuật FISH đã được ứng dụng ở một số bệnh viện lớn cũng như viện nghiên cứu hải sản, tuy nhiên đầu dò sử dụng đều là các sản phẩm thương mại, hoặc được tự thiết kế nhưng đặt tổng hợp tại các hãng nổi tiếng (Đặng

Thị Hồng Nhung, Nguyễn Duy Ngọc, 2008; Nguyễn Thị Tân Sinh *et al*, 2011; Nguyễn Văn Nguyễn *et al*, 2011). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành thiết kế mồi và tự tổng hợp đầu dò đánh dấu Alexa 568 bằng phản ứng DOP-PCR ngay tại phòng thí nghiệm.

Thực nghiệm cho thấy công việc này không hề đơn giản. dUTP gắn Alexa 568 có cấu trúc công kênh gây nhiều khó khăn cho quá trình tổng hợp ở điều kiện phòng thí nghiệm. Tỷ lệ nồng độ dUTP : dTTP trong phản ứng PCR theo chỉ dẫn của nhà sản xuất là 1:3, nhưng phải đến khi chúng tôi phải nâng dần lên 2:1 thì thu được kết quả tương đối khả quan. Khả năng tổng hợp của Taq DNA polymerase cũng cần được xét đến. Thực tế là một số loại Taq của Promega (GoTaq®), Invitrogen, hoặc được cung cấp bởi một số đơn vị trong nước đã được thử nghiệm nhưng không thu được hiệu quả mong muốn, cho đến khi sử dụng DNA Taq Polymerase (Cat. No. M0267L, New England Bio Lab). Nguyễn nhân văn còn là ẩn số đối với chúng tôi.

Trong nghiên cứu này, đầu dò được thiết kế sao cho có kích thước khoảng 300bp để đủ tín hiệu huỳnh quang phát hiện được dưới kính hiển vi, nhưng đây là con số tương đối lớn khi sử dụng. Chúng tôi phải tiến hành phân ứng lại ở nhiệt độ khá cao (65°C, so với đầu dò oligo thường mại là 37°C) mới bước đầu thu được kết quả.

Trong những nghiên cứu đang tiến hành, chúng tôi tiếp tục tối ưu hóa các điều kiện để giảm hàm lượng dUTP sử dụng trong phản ứng PCR, cũng như các thử nghiệm tổng hợp đầu dò mạch đơn, hoặc bề gây đầu dò nhằm nâng cao hiệu suất của phản ứng FISH. Đầu dò đã tổng hợp cũng được tiếp tục sử dụng nhằm xác định vị trí chính xác hơn (vị trí nào, trên nhiễm sắc thể nào) của gen chuyển IL-6 trong tế bào gốc phôi gà.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế cặp mồi và chuẩn hóa các điều kiện để tổng hợp được đầu dò gắn Alexa 568 đặc hiệu với gen IL-6 của người. Cặp mồi được thiết kế có trình tự TGC TCC TGG TGT TG (IL6-F) và TTC ACC AGG CAA GT (IL6-R), nhân bản đoạn ADN có kích thước 289bp từ cDNA của gen IL-6. Điều kiện PCR thích hợp nhất về nhiệt độ gắn mồi và nồng độ Mg^{2+} để tổng hợp tương ứng là 49,3°C và 3,25 mM. Sử dụng phương pháp DOP-PCR, chúng tôi đã tổng hợp được đầu dò đặc hiệu cho gen IL-6 của người và đã chứng minh được rằng có thể sử dụng để phát hiện gen tương ứng trong tế bào gốc phôi gà chuyển gen. Lần đầu tiên ở Việt Nam, chúng tôi đã tự tổng hợp đầu dò ngay tại phòng thí nghiệm sử dụng cho lai FISH. Điều này có ý nghĩa quan trọng cho các nhà nghiên cứu có thể chủ động tạo nguồn đầu dò tương ứng với bất kỳ gen nào được quan tâm ở từng thí nghiệm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này là một phần kết quả của đề tài "Sử dụng kỹ thuật FISH để kiểm tra sự hội nhập của gen IL-6 phân lập từ người trong tế bào gốc phôi gà chuyển gen" được Trung tâm Hỗ trợ Nghiên cứu Châu Á – ĐHQG Hà Nội tài trợ kinh phí. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn nhóm nghiên cứu Phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ Sinh học đã giúp đỡ hoàn thiện vector chuyển gen sử dụng cho nghiên cứu

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bishop R (2010), *Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance*, Bioscience Horizons 3(1): 85-95.
- Đặng Thị Hồng Nhung, Nguyễn Duy Ngọc (2008), *Áp dụng kỹ thuật huỳnh quang tại chỗ trong phát hiện bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể tại Bệnh viện Nhi Trung ương*. Tạp chí nghiên cứu y học 57: 57-62.
- Nguyễn Thị Tân Sinh, Ngô Diễm Ngọc, An Thuý Lan, Đinh Thị Hồng Nhung, Lê Thị Liễu, Nguyễn Thanh Liém (2011), *Ứng dụng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ trong chẩn đoán trước sinh các lệch bội nhiễm sắc thể thường gặp*. Tạp chí Y học lâm sàng Số đặc biệt tháng 2/2011: 253-258.
- Nguyễn Tiến Lung, Nguyễn Lai Thành (2012), *Thử nghiệm chuyển gen IL-6 người bằng lentivirus vào tế bào gốc phôi gà*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam 50(3C): 401-406
- Nguyễn Văn Nguyễn, Lê Thanh Tùng, Lưu Xuân Hòa, Vũ Tuấn Nam, Vũ Minh Hào, Đinh Thái Bình (2011), *Thử nghiệm kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ F.I.S.H nhận diện nhanh và chuẩn xác một số loài tảo giáp độc hại*, in *Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học và công nghệ biển toàn quốc lần thứ V*, p. 261-268
- Wolman SR (1997), *Applications of fluorescence in situ hybridization techniques in cytopathology*. Cancer Cytopathology 81(4): 193-197

PRODUCE FLUORESCENT-LABELING PROBE FOR FISH USING DOP-PCR ASSAY

Nguyen Tien Lung, Hoang Thi Xoan, Nguyen Lai Thanh

Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

SUMMARY

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a cytogenetic technique that is used to detect and localize specific DNA sequences in cells. FISH uses fluorescent-labeling probes that specifically bind to those parts of a chromosome in target cell. In this study, we design and optimize condition of DOP-PCR reaction to produce Alexa 568-labeling probe which specifically bind with human interleukin-6 gene. Probe was produced with high fluorescent intensity, and used to detect corresponding gene in transgenic chicken embryonic stem cells. This result contributes to the development of the FISH technique applied basic research and application in Vietnam.

Keywords: fluorescence in situ hybridization (FISH), fluorescent-labeling probe, DOP-PCR.