

NHÂN DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ PHÂN ĐOẠN GENE *Igf2* TỪ MÔ GAN CHUỘT NHÀ (*Mus musculus*)

TRẦN THỊ ÊLY¹, TRẦN VĂN GIANG¹
TRẦN THUY CẨM HÀ², TRỊNH HỮU TẤN³

¹ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế
Email: vtran.giang@gmail.com.

² Trường Cao đẳng Sư phạm Huế

³ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

Tóm tắt: In dấu hệ gene (*Genomic imprinting*) là trong bộ gene của loài chứa nhiều gene in dấu (*Imprinting gene*). Gene *Igf2* (*Insulin - like growth factor 2*) ở chuột là một trong những gene in dấu, gene này chỉ biểu hiện trên *allele* có nguồn gốc từ cá thể đực (bố). Gene *Igf2* giữ nhiều chức năng quan trọng liên quan đến sự phát triển của cơ thể và kiểm soát cơ chế biểu hiện của gene *Igf2* khá phức tạp, liên quan đến cơ quan, từng mô và từng giai đoạn phát triển. Phân đoạn gene *Igf2* đã được nhân dòng thành công từ mô gan chuột nhà (*M. musculus* (Linnaeus, 1758)) 1 tháng tuổi. Trình tự phân đoạn gene *Igf2* có chiều dài 163 nucleotid, trình tự có độ tương đồng 100% với trình tự trên Genbank (ref|AC_000029.1|), trình tự chuỗi polypeptide suy diễn gồm 52 acid amin bao gồm acid amin mở đầu.

Từ khóa: Gene in dấu, *Igf2*, mô gan, nhân dòng, trình tự.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chuột là loài có bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội, đời con thừa hưởng bộ nhiễm sắc thể của cả bố và mẹ. Theo quy luật di truyền Mendel, chúng có hai bản sao của mỗi gene và cả hai bản sao từ bố hoặc mẹ của mỗi gene đều có sự biểu hiện như nhau. Trên thực tế, ở một số gene chỉ biểu hiện bản sao có nguồn gốc từ bố hoặc mẹ. Hiện tượng đó được gọi là in dấu hệ gene (*Genomic imprinting*). Khoảng 100 gene in dấu (*Imprinting gene*), nằm trên nhiễm sắc thể số 7 của chuột và số 11 của người [4, 5], trong đó điển hình là gene *Igf2* (*Insulin - like growth factor 2*). Gene in dấu này chỉ biểu hiện trên *allele* có nguồn gốc từ cá thể đực (bố) [3]. Nó mã hóa một yếu tố điều hòa sinh trưởng, đặc biệt hoạt động mạnh trong giai đoạn phôi thai và cơ thể còn non, ở chuột nói riêng và ở động vật có vú nói chung. Gene *Igf2* kiểm soát sự tăng sinh, sinh trưởng và biệt hóa của tế bào và đặc biệt là liên quan đến sự điều hòa phát triển phôi và sự phát triển của nhau thai ở động vật... Với chức năng đó, gene *Igf2* biểu hiện sớm trong quá trình phát triển phôi ở tất cả các loại mô nội bì, ngoại bì và trung bì, mức độ biểu hiện giảm dần đến lúc cơ thể trưởng thành [1].

Khi bất hoạt gene *Igf2* trên phôi chuột, dẫn đến chuột con giảm 40% trọng lượng so với chuột con bình thường cùng một lứa. Khi bất hoạt promotor P0 của gene *Igf2* (một promotor đặc hiệu trong nhau thai) dẫn đến giảm kích thước nhau thai cũng như giảm khả năng trao đổi chất dinh dưỡng từ mẹ sang nhau thai [2]. Ở người, sự biểu hiện bất

thường của gene *Igf2* dẫn đến một số hội chứng như Beckwith - Wiedemann (BWS) là một hội chứng bẩm sinh về sự tăng trưởng quá mức bình thường, có thể ảnh hưởng đến tất cả các hệ cơ quan của cơ thể [6]. Điều hòa biểu hiện của gene này còn liên quan đến Hội chứng Russell - Silver (RSS) trên người là một rối loạn chậm tăng trưởng trước và sau sinh do sự biểu hiện quá mức của gene *Igf2* [7]. Ngoài ra, biểu hiện bất thường của gene này còn liên quan đến một số bệnh ung thư ở người, mặc dù trong các mô ung thư này đều liên quan đến sự biểu hiện cao của *Igf2*, nhưng để đo được chính xác mức độ biểu hiện thì còn nhiều khó khăn [9]. Tuy nhiên, để xác định đầy đủ cấu trúc của gene *Igf2*, đặc biệt là mức độ biểu hiện của gene *Igf2* cũng như vai trò của các promoter đặc hiệu thì chưa được nghiên cứu nhiều. Để hiểu rõ cấu trúc và chức năng của gene *Igf2* thì quá trình nhân dòng và phân tích trình tự gene *Igf2* từ mô gan của chuột nhà (*M. musculus*) là cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thiết bị và hóa chất

Vật liệu

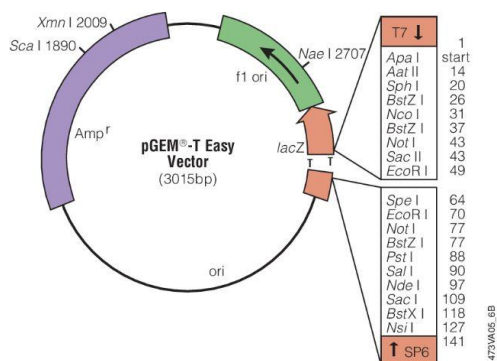
Các mẫu gan chuột nhà (*M. musculus*) 1 tháng tuổi được tách tại khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Huế và xử lý với nitor lỏng, bảo quản ở nhiệt độ -20°C để tiến hành tách chiết ADN. Cặp mồi đặc hiệu tự thiết kế E4F và E4R được sử dụng để thực hiện quá trình nhân dòng.

Bảng 1. Trình tự cặp mồi đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự	Chiều dài
E4F	5'-AGCCTGCGTTTCTTTCTCCAG-3'	21 N
E4R	5'-CCACCTCTCTGGAGTTACAT-3'	20 N

- Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* Top 10 do viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế cung cấp.

- Vector nhân dòng pGEM-T Easy (Promega).



Hình 1. Cấu trúc vector nhân dòng pGEM-T Easy (Promega).

Hóa chất và thiết bị

Các hóa chất được sử dụng: Tris, EDTA, SDS, ammonium acetate, protein K, agarose, chloroform, ethanol, loading dye (5X), ampicillin...

Các môi trường: LB lỏng, LB đặc.

Các dung dịch: phá tế bào (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 2% SDS, pH 8.0), dung dịch rửa protein (7,5 M ammonium acetate), PCI (Phenol - Chloroform - Isoamyl chloroform: 25: 24: 1), Đệm TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0), cồn rửa (70% EtOH).

Các thiết bị được sử dụng: Máy đo pH tự động (Thụy Sĩ), Nồi khử trùng (Nhật Bản), Tủ lạnh (Nhật Bản), Tủ lắc (Đức), Tủ cấy (Nhật Bản), tủ ẩm (Nhật Bản), Cân phân tích (Đức), Máy PCR (Mỹ), Máy ly tâm lạnh (Đức), Máy vortex (Đức), Hệ thống đọc UV trực tiếp (Mỹ), Hệ thống điện di (Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp sinh học phân tử chính được tham khảo theo Sambrook và Ruesel (2001) có cải tiến [8].

Tách chiết ADN tổng số

2 ml dịch mô tế bào được giải đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 40 μ l proteinase (20 μ g/ml) đã được hòa tan trong đệm pK 2 X. Sau 4 giờ ủ ở nhiệt độ 50°C, dịch tế bào được chiết với 4 ml phenol/chloroform (1:1). Ly tâm dịch chiết trong 30 phút ở 20°C với tốc độ 6000 g/1phút. Dịch nổi được rửa bằng 8ml (EtOH) 100% và 300 μ l NaCl 5 M ở nhiệt độ -20°C trong 12 giờ hoặc qua đêm. Ly tâm thu lấy rửa, rửa rửa bằng 500 μ l (EtOH) 70%. Ly tâm, làm khô ADN ở nhiệt độ phòng.

Điện di agarose gel

Chuẩn bị agarogel 0,8%, sau khi gel đã đông, tra mẫu vào các giếng, chạy với điện trường 100 V trong 30 phút. Đọc kết quả: sau khi kết thúc điện di, nhuộm bản gel với ethidium bromide (EtBr) có nồng độ 0,5 g/ml trong 15 phút, rửa lại bằng nước cất và cho vào hệ thống máy đọc gel. Chụp ảnh và phân tích kết quả.

Phản ứng PCR

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 1 μ l ADN; 6 μ l đệm 2X PCR master mix (2,4 mM dNTP mỗi loại; 0,3 đơn vị *Taq* ADN polymerase), 0,5 μ l mỗi xuôi, 0,5 μ l mỗi ngược và bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích phản ứng là 12 μ l. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy PCR (Bio – Rad, Đà Loan) theo chu trình sau: biến tính ADN 95°C/5 phút; tiếp đến là 30 chu kỳ (95°C/1 phút, 48°C/30 giây, 72°C/1 phút); cuối cùng là 72°C/10 phút.

Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng kit EZ - 10 Spin Column PCR Purification kit (Bio Basic), tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Gắn phân đoạn gene *Igf2* vào vector

Sản phẩm PCR được gắn trong vector pGEM®-T Easy (Promega), thành phần phản ứng gắn bao gồm: 1 µl vector, 5 µl đệm 2 X (2 X Rapid Ligation Buffer), 1 µl ADN T4 ligase, 1 µl sản phẩm, sau đó bổ sung 2 µl nước cất để đạt thể tích cuối cùng 10 µl, phản ứng được ủ ở 4°C qua đêm.

Biến nạp vector vào tế bào khả biến *E.coli* Top 10

Vector mang sản phẩm PCR được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* Top 10 bằng phương pháp shock nhiệt. Hỗn hợp biến nạp bao gồm: 10 µl dung dịch gắn chứa vector tái tổ hợp, 200 µl dung dịch tế bào khả biến Top 10. Hỗn hợp được trộn nhẹ nhàng, ủ 30 phút trong tủ đá, sốc nhiệt 42°C trong 45 giây, ngay lập tức chuyển sang khay đá, ủ 3 phút. Sau đó hỗn hợp được bổ sung 800 µl môi trường LB (không có kháng sinh) lỏng, ủ ở 37°C, lắc 200 rpm trong 1 giờ. 200 µl dung dịch biến nạp được trải trên môi trường LB rắn có bổ sung 50 µg/ml ampicillin, 30 µl X - Gal 40 µg/ml, 30 µl IPTG 100 mM.

Tách chiết và tinh sạch ADN plasmid

Chuyển dịch nuôi cấy ở trên sang ống Eppendorf 1,5 ml, ly tâm 8000 vòng/phút trong 2 phút để thu tế bào. Sau đó ly tâm bỏ dịch phía trên, giữ cặn tế bào bên dưới. Thêm 600 µl nước cất vào để hòa tan cặn, dùng pipet hút nhẹ lên xuống vài lần cho đều. Thêm 100 µl dung dịch phá tế bào vào hỗn dịch trên để phá màng tế bào,ậy nắp, nhẹ nhàng trộn vài lần, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Tiếp tục thêm 350 µl dung dịch rửa (nhiệt độ 4 - 8°C), trộn nhẹ nhàng, sau đó đem ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút, nhiệt độ 4°C. Sau đó chuyển toàn bộ phần dịch trong bên trên lên màng của cột lọc. Ly tâm 12000 vòng trong 1 phút, bỏ dịch dưới. Thêm 200 µl dung dịch rửa lên trên màng lọc, sau đó ly tâm 16000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới. Rửa với 400 µl dung dịch CWS lên màng lọc, ly tâm 12000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch dưới. Ly tâm làm khô cột. Cuối cùng, chuyển cột lọc sang ống Eppendorf mới, thêm 50 µl dung dịch thôi rửa lên trên màng lọc, để ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 giây, bỏ cột lọc và thu được dịch chứa ADN plasmid ở dưới.

Giải trình tự ADN

Giải trình tự ADN theo nguyên lý của phương pháp Sanger dựa trên các dideoxyl. ADN polymerase xúc tác gắn các deoxynucleotide vào đầu 3'-OH của mạch đơn ADN đang tổng hợp, khi gặp các deoxynucleotide không có nhóm 3'-OH phản ứng tổng hợp sẽ bị ngừng lại. Kết quả là hỗn hợp sản phẩm sau phản ứng bao gồm các polynucleotide có kích thước hơn kém nhau 1 nucleotide được phát hiện bằng đầu dò huỳnh quang trên máy đọc chương trình tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Các phản ứng tổng hợp bị dừng bằng cách bổ sung formamite ngăn không cho các sợi ADN bắt cặp với nhau, các phân tử ADN mới được tổng hợp được điện di trên gel polyacrylamite để tách nhau ra. 500 µl dịch mẫu được gửi đi đọc trình tự tại công ty BASE DNA Sequencing Division, Malaysia, mẫu được đọc với mỗi xuôi trên vector nhân dòng.

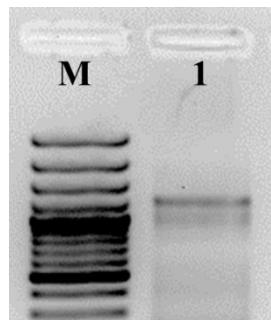
Phân tích trình tự phân đoạn gene *Igf2*

Các trình tự phân đoạn gene *Igf2* trong mô gan chuột *M. musculus* được kiểm chứng bằng chương trình BLAST. Các trình tự được chỉnh sửa và sắp xếp bằng phần mềm BioEdit 7.0, Biolab.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN tổng số *Igf2*

Mẫu gan của chuột *M. musculus* 1 tháng tuổi được sử dụng để tách chiết ADN tổng số. ADN tổng số sau khi được tách chiết được điện di trên agarose gel 0,8 % (Hình 2).

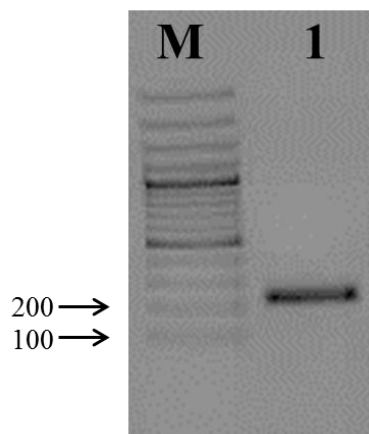


Hình 2. Điện di đồ ADN tổng số từ mô gan chuột ADN marker 1 kb (Promega) (M)

Kết quả điện di cho thấy ADN tổng số của mẫu gan chuột *M. musculus* 1 tháng tuổi tách chiết được nồng độ cao, tương đối sạch, không bị đứt gãy, đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Nhân dòng phân đoạn gene *Igf2*

Phân đoạn gene *Igf2* được nhân lên từ ADN mô gan bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR tập trung một băng duy nhất, rõ nét, không có băng phụ, với kích thước khoảng hơn 200 bp (Hình 3).

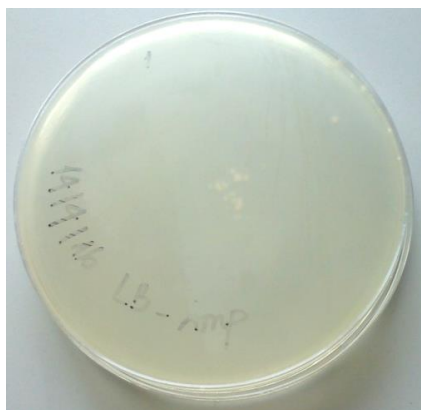


Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR phân đoạn gene *Igf2* mô gan (1), ADN marker 1 kb (Promega) (M)

Kích thước phân đoạn được nhân lên tương đương với kích thước của exon 4 *Igf2* được tính toán trên lý thuyết. Sản phẩm PCR trên điện di đồ cho thấy khá tinh sạch, rõ nét, đảm bảo cho quá trình nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Gắn phân đoạn gene *Igf2* và biến nạp vào tế bào khả biến

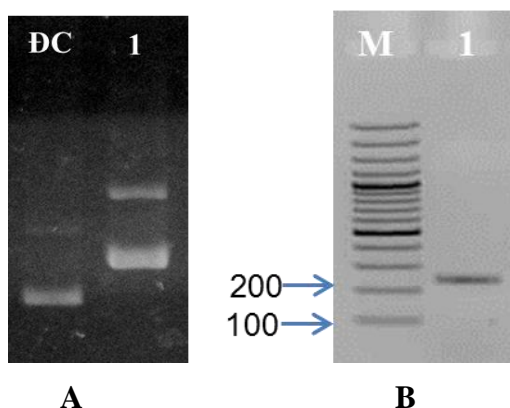
Sản phẩm PCR được gắn vào vector pGEM- T Easy, sau đó biến nạp vào tế bào tế bào khả biến *E. coli* Top 10. Các khuẩn lạc này được nuôi trong môi trường LB lỏng bổ sung ampicillin và qua đêm sau đó khuẩn lạc màu trắng được chọn để tách chiết plasmid theo phương pháp như mô tả trên (Hình 4).



Hình 4. Khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch

3.4. Tách chiết plasmid tái tổ hợp

Dịch huyền phù khuẩn lạc được nuôi trong môi trường LB lỏng có chứa 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin và tiến hành tách plasmid. Plasmid sau khi được tách chiết được điện di kiểm tra với khuẩn lạc chỉ có vector không mang gene chèn làm đối chứng và tiến hành PCR kiểm tra (Hình 5).



Hình 5. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp. (ĐC) plasmid đối chứng. (1) plasmid có mang gene chèn (A). Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng PCR. Đoạn gene chèn (1), ADN marker 1 kb (Promega) (M), (B).

Plasmid tách chiết từ khuẩn lạc có chênh so với đối chứng, nghĩa là các plasmid này có khả năng mang đoạn gene chên, nên kích thước lớn hơn và di chuyển chậm hơn plasmid chỉ là vector được làm đối chứng âm (Hình 5A). Sau đó, plasmid số 1 được tách chiết để kiểm tra lại bằng phương pháp PCR với mỗi đặc hiệu để kiểm tra (Hình 5B), sau khi tinh sạch, dung dịch chứa plasmid này được giải trình tự.

3.5. Giải trình tự phân đoạn gene *Igf2*

Mẫu plasmid tái tổ hợp mang phân đoạn gene *Igf2* từ mô gan của chuột *M. musculus* sau khi tinh sạch được giải trình tự (Hình 6). Độ dài của exon 4 là 163 nucleotid, có 6 nucleotid nằm phía trước bộ ba mở đầu.



Hình 6. Trình tự exon 4 từ mô gan

```

Query 1      GTACCAATGGGGATCCCAGTGGGGAAGTCGATGTTGGTGCTTCTCATCTCTTTGGCCTTC 60
Sbjct 142412152 GTACCAATGGGGATCCCAGTGGGGAAGTCGATGTTGGTGCTTCTCATCTCTTTGGCCTTC 142412093

Query 61     GCCTTGCTGCTGCATCGCTGCTTACGGCCCCGGAGAGACTCTGTGCGGAGGGGAGCTTGT 120
Sbjct 142412092 GCCTTGCTGCTGCATCGCTGCTTACGGCCCCGGAGAGACTCTGTGCGGAGGGGAGCTTGT 142412033

Query 121    GACACGCTTCAGTTTGTCTGTTCCGGACCGCGGCTTCTACTTCA 163
Sbjct 142412032 GACACGCTTCAGTTTGTCTGTTCCGGACCGCGGCTTCTACTTCA 142411990
    
```

Hình 7. Kết quả so sánh với trình tự trên GenBank

Sau khi giải trình tự, chúng tôi đã so sánh trình tự này với trình tự trên Genbank (ref|AC_000029.1|) cho thấy trình tự phân đoạn gene *Igf2* ở nhau thai có sự tương đồng là 100% (Hình 7). Chương trình BLAST được sử dụng để xác định trình tự acid amin suy diễn trong chuỗi polypeptide, exon này mã hoá chuỗi polypeptide gồm 52 acid amin kể cả acid amin mở đầu (Hình 8).

M	G	I	P	V	G	K	S	M	L
V	L	L	I	S	L	A	F	A	L
C	C	I	A	A	Y	G	P	G	E
T	L	C	G	G	E	L	V	D	T
L	Q	F	V	C	S	D	R	G	F
Y	F								

Hình 8. Trình tự acid amin suy diễn

4. KẾT LUẬN

ADN tổng số từ mô gan chuột *M. musculus* (Linnaeus, 1758) 1 tháng tuổi được tách chiết và khuếch đại phân đoạn gene *Igf2* với kích thước 206 bp, trong đó chứa exon 4 với chiều dài 163 bp. Trình tự này có độ tương đồng 100% với trình tự trên GenBank (ref|AC_000029.1|). Trình tự chuỗi polypeptide suy diễn từ trình tự ADN gồm 52 acid amin bao gồm cả acid amin mở đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Barberini, F. Familiari, G. Vittori, I. Carpino, F. Melis, M. (1984). Morphological and statistical investigation of the occurrence of Tubule-like cells' in the renal corpuscle of the mouse kidney induced by sex hormones, *Renal. Physiol.* 7: 227 - 236.
- [2] Constância, H. Hughes, J. Dean, W. Ferguson, S. Fundele, R. Stewart, F. Kelsey, G. Fowden, A. Sibley, C. Reik, W. (2002), Placental - Specific IGF - II is a Major Modulator of Placental and Fetal growth. *Nature.* 417(6892): 945 - 948.
- [3] DeChiara, Robertson, E. J. Efstratiadis, A. (1991), Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell.* 64(4): 849 - 859.
- [4] Elly-Holthuisen (2003), The many levels of control of *Igf2* expression. *Nature.* 5: 91 - 102.
- [5] Firth, M. Ganeshprasad, U. Baxter, R. C. (1998), Structural determinants of ligand and cell surface binding of insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.*, 273(5): 2631 - 2638.
- [6] Pils, D. Tong, D. G. Hager, E. Obermayr, S. Aust, G. Heinze, M. Kohl, E. Schuster, A. Wolf, J. Sehouli, I. Braicu, I. Vergote, T. Van Gorp, S. Mahner, N. Concin, P. Speiser, and R. Zeillinger (2013) "A Combined Blood Based Gene Expression and Plasma Protein Abundance Signature for Diagnosis of Epithelial Ovarian Cancer--a Study of the OVCAD Consortium." *BMC cancer.* 13(178): 1 - 13.
- [7] Rossignol, S. I. Netchine, Y. Le Bouc, C. Gicquel (2008) "Epigenetics in Silver-Russell Syndrome." *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism.* 22(3): 403 - 414.
- [8] Sambrook, J. Russel, D. W. (2001), Molecular cloning: A laboratory manual, cold spring harbor laboratory press.

- [9] Timothy A. Hore, Robert W. Rapkins, Jennifer A. Marshall Graves (2006), Construction and evolution of imprinter loci in mammals. *Trends in genetics*. 23(9): 440 - 447.

Title: CLONING AND CHARACTERISTIC OF PARTIAL SEQUENCE OF *Igf2* GENE FROM THE LIVER TISSUE OF HOUSE MOUSE (*Mus musculus*)

Abstract: Genomic imprinting contains a lot of imprinting genes. *Igf2* (Insulin - like growth factor 2) is imprinted gene which is expressed from only one of the parental chromosomes. This gene has a lot of important functions and controlling the mechanism of *Igf2* expression is complex. *Igf2* relates in each tissue, organs, stages, abnormal expression leads to a number of diseases in humans. *Igf2* is successfully cloned from liver tissue of house mice one month (*Mus musculus*). *Igf2* genome sequence with a length of 163 nucleotides, is 100% homology with sequences in GenBank (ref|AC_000029.1|), deduced sequence polypeptide chain consists of 52 amino acids including start amino acid.

Keywords: Imprinting gene, *Igf2*, liver tissue, cloning, sequence.