SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP MÁNG ĐƠN (TROUGHING) ĐỂ TINH SẠCH DNA METAGENOME HỆ VI SINH VẬT CỘNG SINH TRONG RUỘT MỐI

NGUYỄN THỊ THẢO[(a)], LÊ QUỲNH GIANG[(b)],
NGUYỄN THANH NGỌC[(b)], ĐỖ THỊ HUYỀN[(b)], TRƯƠNG NAM HẢI[(b)]

Tóm tắt. Sự tinh sạch DNA metagenome của các sinh vật trong môi trường tự nhiên đạt yêu cầu cho việc giải trình tự và xây dựng thư viện DNA là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, để tinh sạch DNA metagenome của hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong ruột mối, chúng tôi đã sử dụng phương pháp máng đơn của Harnpicharnchai và cộng sự [4] có cải biến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Phương pháp này đơn giản, ít tốn và hiệu quả. Kết quả cho thấy, DNA metagenome thu được có độ sạch cao (A_{260}/A_{280}= 1,86-1,9). Đặc biệt, hiệu suất thu hồi lớn hơn và DNA cũng ổn định hơn so với việc sử dụng bộ Kit QIAamp DNA mini kit (là bộ kit thương phẩm của hãng QIAGEN thường được dùng để tinh sạch DNA genome ở các phòng thí nghiệm trong nước cũng như trên thế giới).

1. MỞ ĐẦU

Gần đây, nhiều bài báo và bằng sáng chế đã chỉ ra rằng mối và hệ vi sinh vật cộng sinh trong ruột mối là nơi cung cấp nguồn gen rất phong phú đa dạng mã hóa cho các enzyme chuyển hóa nhanh và hiệu quả gỗ thành các sản phẩm đường đơn mà vi sinh vật cũng như mối có thể hấp thụ được [9]. Các enzyme này được xem là nguồn enzyme thích hợp để ứng dụng trong các ngành công nghiệp chuyển hóa sinh khối, phế phụ phẩm nông nghiệp [7]. Một số tác giả đã sử dụng kỹ thuật metagenomic xây dựng thư viện DNA và phân lập thành công gen mã hóa một số dòng cellulase mới bằng phương pháp metagenomic từ các môi trường khác nhau như mẫu đất [3], dạ cỏ trâu bò [1], hay phân thỏ [2]. Tuy nhiên, DNA metagenome được tách chiết từ các môi trường này thường chứa các tạp chất (chủ yếu là các cơ chất humic) [5], [6] và axit humic (là một hợp chất tự nhiên có mặt thường xuyên trong các mẫu DNA metagenome làm ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình giải trình tự DNA vì chúng luôn ức chế các phản ứng enzyme [5]. Để loại bỏ các chất ức chế này, các nhà nghiên cứu thường sử dụng kỹ thuật như ly tâm gradient, sắc ký cột, xử lý với hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) hoặc các bộ kit thương mại để tinh sạch DNA. Tuy nhiên, các kỹ thuật tinh sạch này (ngoại trừ sử dụng kit) tốn nhiều thời gian và sức lao động. Các bộ kit thương mại như QIAgenquick gel extraction kit…có ưu điểm là tiết kiệm thời gian nhưng lại rất tốn kém, đặc biệt là khi cần tinh chế một lượng lớn DNA metagenome [10]. Để đơn giản hóa quá trình tinh chế DNA metagenome, Harnpicharnchai và cộng sự [4] đã

giới thiệu phương pháp máng đơn. Đây là phương pháp tinh chế DNA metagenome hiệu quả (thu được 50%-70% DNA đã tinh sạch cao hơn tỷ lệ thu được khi sử dụng Kit thương phẩm), không tốn kém và dễ thực hiện. Phương pháp này dựa trên cơ sở của kỹ thuật điện di DNA trên gel. Trong đó, DNA ở môi trường trung tính mang điện tích âm sẽ di chuyển từ cực âm sang cực dương trong trong điện trường đều. Trên gel agarose, các đoạn DNA có kích thước lớn sẽ di chuyển chậm và tách biệt với các chất khác, kể cả các tạp chất. Khi đó, một giếng chứa đầy PEG 8000 (polyethyleneglycol, khối lượng phân tử 8000) sẽ được tạo ra ở ngay trước băng DNA để thu lấy hoàn toàn DNA sau khi điện di [4]. Do PEG 8000 có khả n ăng hoà tan trong nước, methanol, benzene và dichloromethane kết hợp với các phân tử hydrophobic sẽ tạo thành hợp chất có hoạt tính bề mặt không ion. Hợp chất này sẽ chuyển động dưới điện trường, do đó nó sẽ dừng lại tại vị trí của giếng trong gel agarose. Sau khi kết thúc điện di, dịch chứa DNA trong giếng được thu lại dễ dàng. Với những ưu thế của phương pháp Máng đơn, chúng tôi đã áp dụng phương pháp này trong nghiên cứu tinh sạch DNA metagenome hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong ruột mối.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Ruột mối thợ của chi mối *Coptotermes* do Viện Phòng trừ Mối và Bảo vệ công trình cung cấp.

Bộ Kit QIAamp DNA mini kit dùng để tách DNA metagenome được mua từ hãng QIAGEN.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết DNA metagenome hệ vi sinh vật ruột mối

Toàn bộ ruột mối thợ được lấy cẩn thận. Cứ 300 ruột mối được cho vào 1 ống eppendorf, bổ sung 0,34 g hạt thủy tinh và nghiền bằng chày nghiền mẫu trong ống eppendorf. Xác tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm tốc độ thấp (700 vòng/phút). Sau đó, vi khuẩn trong dịch nổi được thu lại bằng ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Tế bào vi khuẩn được rửa nhiều lần bằng PBS. DNA metagenome của vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp của Sambrook J và Russell DW [8].

2.2.2. Tinh sạch DNA metagenome hệ vi sinh vật ruột mối bằng Máng đơn

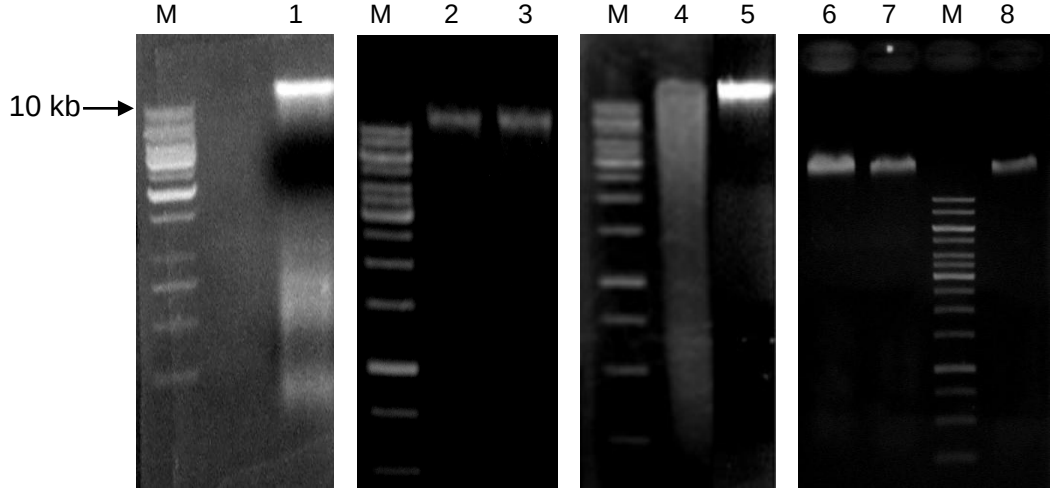
Mẫu DNA cần tinh sạch được cho vào giếng của bản gel agarose 0,8% (bản gel có 2 lớp được ngăn cách bởi tấm nhựa trong và mỏng, lớp dưới mỏng và không có ethidium bromide, còn lớp trên có chứa 0,1-0,5 μg/ml ethidium bromide) và điện di ở điện áp 50 V khoảng 30 phút. Vị trí băng DNA đích được xác định dưới đèn UV, sau đó một giếng rộng khoảng 1-1,5 cm được tạo ra ngay sau vị trí gen đích. Agarose thừa trong giếng được loại bỏ cẩn thận và giếng được làm đầy bằng đệm Máng đơn (25-30% PEG8000 trong TAE). Cả bản gel được điện di tiếp trong khoảng 15 phút để DNA đích đi vào trong giếng. Hút toàn bộ đệm chứa DNA trong giếng vào một

Eppendorf sạch. Sau đó DNA được chiết lại bằng chloroform : isoamyl alcohol (24:1) và được tủa lại bằng 2 lần thể tích cồn 100% + 2 µl glycogen (10 mg/ml) + 50 µl natri axetat 3 M, ở -80^{o}C trong 25 phút (hoặc 60 phút ở -20^{o}C). DNA được thu lại bằng cách ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút, rửa lại bằng cồn 70%, làm khô và hoà vào nước vô trùng và giữ ở -20^{o}C cho các thí nghiệm tiếp theo.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA metagenome hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong ruột mối

Để tách chiết được DNA metagenome của hệ vi sinh vật trong ruột mối không bị lẫn DNA metagenome của ruột mối, chúng tôi đã ly tâm mẫu ruột mối (sau khi nghiền cơ học) ở tốc độ 700 vòng/phút trong 10 phút để loại tủa (chính là tế bào mô ruột mối) và dịch là phần có chứa tế bào vi khuẩn quan tâm. Với quy trình tách chiết đã mô tả ở phần phương pháp, DNA metagenome của vi khuẩn trong ruột mối đã được tách chiết thành công, có kích thước cao hơn DNA 10 kb cuả thang DNA chuẩn (đường chạy 1 ở hình 1). Tuy nhiên, ngoài băng DNA metagenome còn có một số băng DNA và ARN khác không mong muốn. Hơn nữa, trong sản phẩm tách chiết này còn có các tạp chất và axit humic là những thành phần cần loại bỏ khỏi mẫu DNA metagenome.



Hình 1. Điện di đồ DNA metagenome của hệ vi sinh vật sống trong ruột mối. M: Thang chuẩn 1 kb (Fermentas); 1: DNA metagenome được tách chiết; 2 và 3: tương ứng là DNA metagenome được tinh sạch bằng Kit QIAamp DNA mini kit và bằng phương pháp Máng đơn; 4, 5: tương ứng là DNA metagenome hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong ruột mối được tinh sạch bằng Kit QIAamp DNA mini kit và tinh sạch bằng phương pháp Máng đơn sau 30 ngày cất giữ ở -20^{o}C; 6: 3 µl DNA metagenome trước khi tinh sạch; 7 và 8: tương ứng là 3 µl DNA metagenome được tinh sạch bằng phương pháp Máng đơn và bằng Kit QIAamp DNA mini kit

3.2. Khảo sát phương pháp tinh sạch DNA metagenome

Chúng tôi đã tiến hành tinh sạch DNA metagenome bằng 3 phương pháp: (1) sử dụng bộ Kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN); (2) bằng túi thẩm tích; (3) bằng Máng đơn. Trong ba phương pháp này, DNA metagenome thu được có kích thước nguyên vẹn khi sử dụng bộ kit của QUAGEN và bằng Máng đơn. DNA metagenome thu được từ túi thẩm tích bị phân cắt rất nhiều thành dải DNA có kích thước khác nhau. Trước đó, chúng tôi đã thử tách DNA metagenome bằng chế theo phương pháp Máng đơn gốc của Harnpicharnchai và cộng sự (Harnpicharnchai *et al.*, 2007), tuy nhiên, DNA bị mất nhiều nên hiệu quả thu hồi thấp. Sau đó, chúng tôi đã chuẩn bị gel theo hai cách (1) đổ gel hai lớp, giữa hai lớp gel là một tấm nhựa trong, mỏng đặt ở vị trí sẽ cắt tạo giếng sau khi chạy điện di; (2) đặt tấm nhựa mỏng ở dưới cùng và đổ lớp gel có chứa ethidium bromine dày ở trên. Kết quả cho thấy, hiệu quả thu hồi DNA cao hơn hẳn. Sản phẩm DNA metagenome tách bằng bộ kit của Quiagen và bằng Máng đơn là tương đương nhau (Đường chạy 2 và 3 ở hình 1). Độ sạch của mẫu (tính theo tỷ lệ A_{260}/A_{280}) tách bằng Máng đơn và bằng QIAamp DNA mini kit đều trong khoảng 1,86 đến 1,9 (đo bằng máy NanoDrop^{TM}). Những giá trị này cho thấy cả 2 sản phẩm đều đạt yêu cầu về độ sạch.

3.3. Kiểm tra độ ổn định của DNA metagenome sau khi tinh chế

Sau 30 ngày cất giữ ở -20^{o}C, mẫu DNA metagenome được đưa ra kiểm tra. Kết quả cho thấy sản phẩm tinh sạch bằng Kit QIAamp DNA mini kit bị cắt thành nhiều đoạn DNA có kích thước khác nhau, trải đều từ khoảng 100 bp đến các đoạn có kích thước tương đương với DNA metagemome ban đầu (Đường chạy 4 ở hình 1). Ngược lại, sản phẩm DNA metagenome được tinh sạch bằng phương pháp Máng đơn không bị cắt (Đường chạy 5 ở hình 1). Chúng tôi đã kiểm tra mẫu DNA metagenome này sau khi cất giữ 3 tháng đều thấy chúng hoàn toàn ổn định và không bị phân cắt. Như vậy, DNA metagenome tinh sạch bằng Kit không đủ tiêu chuẩn để làm thư viện DNA hoặc để giải trình tự.

3.4. Đánh giá hiệu quả thu hồi DNA metagenome trước và sau khi tinh chế

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra định tính DNA metagenome thu được sau khi được tinh sạch bằng Kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) và bằng Máng đơn. Để kết quả chính xác, 30 µl DNA metagenome đã được tinh sạch bằng phương pháp Máng đơn lần 1 được tinh sạch lại bằng cả 2 phương pháp, lượng DNA metagenome thu được sau khi tinh sạch lần 2 được hòa lại trong 30 µl nước cất vô trùng (đúng bằng lượng DNA metagenome ban đầu – đã được tinh sạch lần 1). 3 µl DNA metagenome mỗi mẫu được điện di để kiểm tra tỷ lệ DNA bị mất sau khi tinh sạch. Kết quả (Đường chạy 6,7 và 8 ở hình 1) cho thấy, băng DNA metagenome được tinh sạch bằng Máng đơn đậm hơn băng DNA metagenome được tinh sạch bằng Kit QIAamp DNA mini kit. Điều này chứng tỏ, phương pháp

tinh sạch Máng đơn hiệu quả hơn phương pháp tinh sạch bằng Kit. Kết quả này giống với kết quả của Harnpicharnchai và cộng sự [4].

Như vậy, phương pháp Máng đơn là phương pháp tối ưu được chúng tôi sử dụng để tinh sạch một lượng lớn (10 µg) cho việc giải trình tự trực tiếp DNA metagenome của hệ vi khuẩn trong ruột mối nhằm khai thác toàn bộ các gen mã hóa cho protein, enzyme liên quan đến quá trình chuyển hóa lignocellulose thành đường.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi áp dụng thành công phương pháp Máng đơn để tinh chế DNA metagenome từ hệ vi sinh vật sống trong ruột mối. Sản phẩm tinh sạch sẽ được sử dụng để giải trình tự toàn bộ metagenome, tạo thư viện metagenome nhằm khai thác nguồn gen.

Lời cảm ơn: *Công trình được thực hiện bằng kinh phí hỗ trợ của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam và đề tài Nghị định thư với Nhật Bản: "Phân lập hệ gen mã hóa cho enzyme thủy phân lignocellulose từ khu hệ vi sinh ruột mối Việt Nam bằng kỹ thuật Metagenomics". Công trình có sử dụng một số trạng thiết bị của phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gene.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Duan CJ, Xian L, Zhao GC, Feng Y, Pang H, Bai XL, Tang JL, Ma QS, Feng JX, *Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens*, J Appl Microbiol, Vol.107, No.6 (2009), 245-256.

[2] Feng Y, Duan CJ, Pang H, Mo XC, Wu CF, Yu Y, Hu YL, Wei J, Tang JL, Feng JX *Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases*, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol.75, No.2 (2007), 319-328.

[3] Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, Clardy J, Goodman RM, Handelsman J, *Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA*, Appl Environ Microbiol, Vol.68, No.9 (2002), 4301-4306.

[4] Harnpicharnchai P, Thongaram T, Sriprang R, Champreda V, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L, *An efficient purification and fractionation of genomic DNA from soil by modified máng đơn method*, Lett Appl Microbiol, Vol.45 (2007), 387-391.

[5] Harry M, Gambier B, Bourezgui Y, Garnier-Sillam E, *Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances*, Analusis, Vol.27 (1999), 439-442.

[6] Kauffmann IM, Schmitt J, Schmid RD, *DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts*, Appl Microbiol Biotechnol, Vol.64 (2004), 665-670.

[7] Matsui T, Tokuda G, Shinzato N, *Termites as functional gene resources*, Rec Patents Biotechnol, Vol.3, No.1 (2009), 10-18.

[8] Sambrook J and Russell DW, *Molecular cloning: a laboratory manual* , *(*2001) CSHL Press

[9] Tartar A, Wheeler M, Zhou X, Coy MR, Boucias DG, Scharf ME, *Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite Reticulitermes flavipes*, Biotechnol Biofuel,Vol.2, No.25 (2009), 1754-6834.

[10] Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, Golyshin PN, Ferrer M, *Molecular methods to study complex microbial communities*, Methods Mol Biol, Vol.668 (2010), 1-37.

SUMMARY

APPLICATION OF TROUGHING METHOD FOR PURIFICATION OF METAGENOMIC DNA FROM THE TERMITE GUT BACTERIAL SYMBIONTS

DNA metagenome purification of organisms in nature enviroments for sequence and library construction is very important. In this study, to purify DNA metagenome of termite gut symbiotic bacteria, we used Trouging method of Harnpicharnchai *et al* [4] with modification for more suitable with our lab condition. This method is simple, inexpensive and effective. The results indicated that, the purified bacterial metagenomic DNA was pure (A_{260}/A_{280}= 1,86-1,9). Specially, DNA is more stable than (not cleaved by contaminants) and recovery efficiency was higher than the DNA purified by QIAamp DNA mini kit (is a commercial Kit of QIAGEN, usually used in the labs in Vietnam and the world).

(a) KHOA SINH HỌC, TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH
(b) VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC