

# NHÂN DÒNG, PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ VÀ ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ PHIÊN MÃ CỦA GENE *Igf2* TRÊN CHUỘT

Trần Văn Giang<sup>1\*</sup>, Guy Cathala<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Huế

<sup>2</sup> Viện Di truyền Phân tử - Cộng hòa Pháp

## TÓM TẮT

Trên chuột, nhiều gene in dấu được phát hiện trong đó có gene *Igf2*. Gene *Igf2* (*Insulin-like growth factor 2*) là gene chỉ biểu hiện trên *allele* có nguồn gốc từ bố, kiểm soát yếu tố tăng sinh, tăng trưởng và phát triển của thai và nhau thai. Gene được biểu hiện bởi nhiều promoter (P3, P2, P1, Pm, Pm2, Pu2, P0), trong giới hạn bài báo này, Pm được tập trung nghiên cứu, promoter Pm biểu hiện ổn định trong mô biểu bì. Promoter Pm đã được tách chiết, khuếch đại, tinh sạch và nhân dòng từ mô biểu bì là mô lưỡi, mô cơ và mô thận. Trình tự promoter có chiều dài là 159 nucleotid. Mức độ biểu hiện của promoter từ các mô lưỡi, cơ và thận đã được đánh giá, Pm có mức độ biểu hiện thấp hơn *Igf2* tổng số, P3, P2 và cao hơn một số promoter khác của gene *Igf2*.

*Từ khóa:* Biểu hiện gen, nhân dòng gen, *Igf2*, promoter, chuột.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Đối với động vật có vú, về mặt di truyền, đời con thừa hưởng bộ nhiễm sắc thể của cả bố và mẹ. Theo quy luật Mendel, thông thường cả hai bản sao từ bố hoặc mẹ của mỗi gene đều có sự biểu hiện như nhau. Thế nhưng, 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*). Có hơn 100 gene in dấu (*Imprinting gene*), trong đó điển hình là gene *Igf2* (*Insulin-like growth factor 2*) nằm trên nhiễm sắc thể số 7 của chuột và số 11 ở người (Markljung, 2007). Ở người, gene in dấu này chỉ biểu hiện trên *allele* có nguồn gốc từ bố, còn bản sao này từ cơ thể mẹ truyền cho con thì không được biểu hiện (Constância *et al.*, 2002). Ở động vật có vú cũng như ở người, gene này mã hóa một protein hoạt động như một yếu tố điều hòa sinh trưởng, đặc biệt hoạt động mạnh trong giai đoạn phôi thai. 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. 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, ở cơ thể trưởng thành, gene này biểu hiện thấp. Điều hòa biểu hiện liên quan đến gene *H19* và ARN 91H: Gene *H19* cũng là gene in dấu, nằm cùng locus với gene *Igf2* và chúng có quá trình biểu hiện thuận nghịch, Forné và đồng tác giả (1997) đã chỉ ra rằng, sự vắng mặt gene *H19* trong mô gan chuột đã có 2 tác động lên các promoter của gene *Igf2*; (1) giai đoạn chuột 5 ngày có sự biểu hiện cao nhất của gene *Igf2*; (2) có sự biểu hiện mạnh của promoter P2. ARN 91H là một antisens của ARN *H19*, phân tử ARN này được Bertaux và đồng tác giả (2008) phát hiện. Nó là một ARN dài không mã hóa và có khả năng điều hòa *Igf2* thông qua một promoter (Pm) (Tran *et al.*, 2012). Ngoài ra, các trình tự vùng bảo thủ (CS4, CS5) nằm phía sau gene *H19* cũng tham gia điều hòa biểu hiện gene *Igf2*.

Gene này được điều khiển bởi 4 promoter khác nhau và các promoter này có trình tự bảo thủ cao giữa gene *Igf2* trên chuột và người (DeChiara *et al.*, 1991). Mức độ biểu hiện của gene này chủ yếu do các promoter quyết định, trên người, trong tất cả các mô, trong mô biểu bì thì Pm hoạt động mạnh. Vì vậy, xác định được trình tự cũng như đánh giá mức độ biểu hiện của Pm để so sánh với sự biểu hiện của các promoter khác thực sự là cần thiết để từ đó nghiên cứu chính xác mức độ biểu hiện của gene *Igf2*.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu và hóa chất

#### Nguyên liệu

Các mẫu mô được lấy từ chuột con hoang dại (*Mus musculus*) khi sinh 2,5 ngày, xử lý với nitơ lỏng và bảo quản ở nhiệt độ -20°C để tiến hành tách chiết ADN, và ARN. Các cặp môi đặc được thiết kế để thực hiện quá trình khuếch đại và nhân dòng và đánh giá sự phiên mã của các promoter và của gene *Igf2* (Bảng 1). Các loại môi thử thiết kế dựa trên trình tự *Igf2* có trên ngân hàng gene.

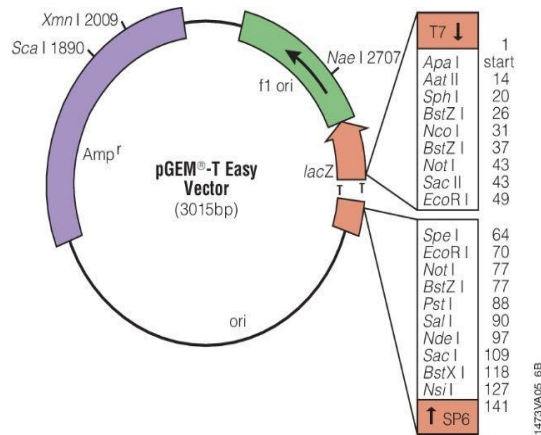
Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α do Phòng nghiên cứu điều hòa biểu hiện gene, Viện Di truyền phân tử, Cộng hòa Pháp cung cấp. Vector tạo dòng pGEM-T Easy (Promega) (Hình 1).

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

Mỗi	Mỗi xuôi (5'-3')	Mỗi ngược (5'-3')	Kích thước (bp)
<i>Gadph</i>	ACAGTCCATGCCATCACTG	GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	102
<i>Igf2</i>	GAGCGATCGAACGCTCTGTG	ACGCCAGCGAGTGTGTCCTTC'	201
<i>P1</i>	5'-CTCGTCACTTCTCCTACGGTG	CCCAGTCGTTTTCTGACAC'	132
<i>P2</i>	5'-GTTCTGTCCCCTCGCACATT-3'	5'-GGTATGCAAACCGAACAGCG-3'	135
<i>P3</i>	5'-CTGGACATTAGCTTCTCCTG-3'	5'-CTGAAGTTGGGTAAGGAGGC-3'	96
<i>PU2</i>	5'-AGCGAGCCTTCTGCTGAGCT-3'	5'-CATTCACTTCTGGGAGCGTGG C-3'	112
<i>Pm2</i>	5'-CTGTGAAGGGCCTTAGGAGAG-3'	5'-CCAAACAGCAGAGCTTCTCCTG-3'	145
<i>Pm</i>	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'	5'-CCCAGCATGCTTCTCCTCATG-3'	159
5'-Nested	5'- <b>GGACACTG</b> ACATGGACTGAAGGAGTA-3'		
<i>P0</i>	5'-ATTGACCCAGCCAGCGGATC-3'	5'-CTGTACTCTAGTCGTTTCGTAG-3'	120
<i>P0L</i>	5'-AACCCAGGGTTCTGAGTCTC-3'	5'-GAGACTCAGAACCTGGGTT-3'	189

Ghi chú: Các loại mỗi được đặt từ công ty cung cấp mỗi Life science, Đức.

Mỗi 5'-Nested chỉ có một mỗi, không xác định được kích thước đoạn khuếch đại



**Hình 1. Cấu tạo vector pGEM-T Easy (Promega)**

**Hóa chất và thiết bị**

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu: 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 - Isoamylchloroform: 25:24:1), đệm TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0), cồn rửa (EtOH 70%). Tris, EDTA, SDS, ammonium acetate, proteinase K, agarose, chloroform, ethanol, loading dye (5X), ampicillin... Các bộ kit đã sử dụng: PCR master Mix, kit tách chiết plasmid, kit tổng hợp cDNA, kit RT-PCR, kit 5'-RACE (Invitrogen, Mỹ).

Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu như: Máy PCR (Mỹ), máy ly tâm lạnh (Đức), máy vortex (Đức), hệ thống đọc UV trực tiếp (Mỹ), hệ thống điện di (Mỹ). Máy pH tự động (Thụy Sĩ), nồi khử trùng (Nhật Bản), tủ lạnh (Nhật Bản), tủ lãc (Đức), tủ cấy (Japan), tủ âm (Japan), cân phân tích, máy real time - PCR (Đức).

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

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

**Tách chiết ADN tổng số**

2 mL dịch mô tế bào được giải đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 40 µL proteinase (20 µg/mL) đã được hòa tan trong đệm pK 2X. 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 (6000v/1 phút). Dịch nổi được rửa bằng 8 mL EtOH 70% và 300 µL NaCl 5 M ở nhiệt độ -20°C trong 12 giờ hoặc qua đêm. Ly tâm thu lấy rửa, rửa rửa bằng 500 µL EtOH 70%. Ly tâm, làm khô ADN ở nhiệt độ phòng.

### Điện di gel agarose

Chuẩn bị gel agarose 0,8%, sau khi gel đã đông, tra mẫu vào các giếng, chạy với điện trường 100 V trong 30 phút. 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 (12  $\mu$ L) bao gồm: 1  $\mu$ L ADN; 6  $\mu$ L 2X PCR master mix (2,4 mM dNTP mỗi loại; 0,3 đơn vị *Taq* ADN polymerase), 0,5  $\mu$ L mỗi muối, 0,5  $\mu$ L mỗi ngược. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt (iCycler, Bio - Rad) theo chu trình sau: biến tính 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 (Sambrook *et al.*, 2001).

### 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  $\mu$ L vector, 5  $\mu$ L đệm 2X (2X Rapid Ligation Buffer), 1  $\mu$ L T4 ADN ligase, 1  $\mu$ L sản phẩm, sau đó bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10  $\mu$ L, phản ứng được ủ ở 4°C qua đêm.

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

Vector mang sản phẩm PCR được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp shock nhiệt. Hỗn hợp biến nạp bao gồm: 10  $\mu$ L dung dịch gắn chứa vector mang sản phẩm PCR, 200  $\mu$ L dung dịch tế bào khả biến DH5 $\alpha$ . Hỗn hợp được trộn nhẹ nhàng, ủ 30 phút trong tủ đá, sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây, ngay lập tức chuyển sang khay đá, ủ 3 phút. Sau đó, hỗn hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng (800  $\mu$ L) (không có kháng sinh), ủ ở 37°C, lắc 200 vòng/phút trong 1 giờ. Lấy 200  $\mu$ L dung dịch biến nạp trải trên môi trường LB đặc có bổ sung 50  $\mu$ g/mL ampicillin, 30  $\mu$ L X - Gal 40  $\mu$ g/mL.

### Tách chiết và tinh sạch plasmid tái tổ hợp

Lấy 1 mL dịch nuôi cấy các plasmid tái tổ hợp đưa vào ống Eppendorf 1,5 mL, ly tâm 6000 vòng/phút trong 2 phút để thu tế bào. Sau ly tâm bỏ dịch phía trên, giữ cặn tế bào bên dưới. Thêm 600  $\mu$ L nước cất vào để hòa tan cặn, dùng pipet hút nhẹ lên xuống vài lần cho đều. Quá trình tách chiết và tinh sạch plasmid dùng Kit của hãng Invitrogen (Mỹ). Thêm 100  $\mu$ L dung dịch phá tế bào vào hỗn dịch trên để phá màng tế bào, đảo nhẹ nhàng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Thêm 350  $\mu$ L dung dịch rửa (nhiệt độ 4 - 8°C), trộn nhẹ nhàng, sau đó ly tâm trong 10 phút, nhiệt độ 4°C. Lấy dịch trong bên trên đưa lên màng của cột lọc. Ly tâm trong 1 phút, bỏ dịch dưới. Bổ sung 200  $\mu$ L dung dịch rửa lên trên màng lọc, sau đó ly tâm, bỏ dịch bên dưới. Rửa với 400  $\mu$ L dịch rửa, ly tâm tiếp trong 1 phút. Làm khô cột bằng ly tâm trong 2 phút. Cuối cùng, chuyển cột lọc sang ống Eppendorf mới, thêm 50  $\mu$ L dung dịch thôi rửa lên trên màng lọc, để ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm trong 30 giây, bỏ cột lọc và thu được dịch chứa ADN plasmid tinh sạch ở dưới. Toàn bộ quá trình thực hiện với tốc độ ly tâm là 12.000 vòng/phút.

### Phân tích trình tự phân đoạn gene *Igf2*

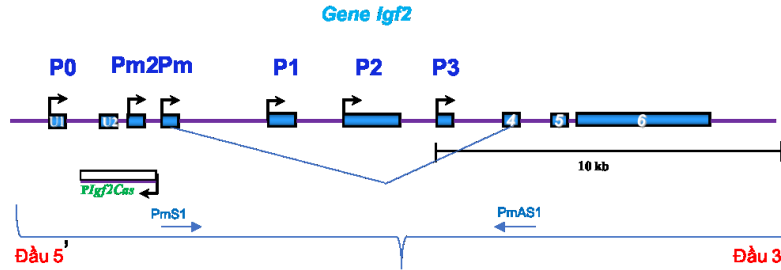
Các trình tự phân đoạn gene *Igf2* sau khi gửi đọc trình tự từ sản phẩm nhân dòng tinh sạch, được phân tích bằng chương trình BLAST. Các trình tự được chỉnh sửa và sắp xếp bằng phần mềm BioEdit 7.0.

### Tạo dòng cDNA

Chuẩn bị 200 ng ARN sau khi xác định bằng máy định lượng ARN và đã xử lý với DNase. Cho vào ống Eppendorf 1,5 mL đã khử trùng 1  $\mu$ L Random primer hoặc mỗi đặc hiệu và 10  $\mu$ L H<sub>2</sub>O cất khử trùng), ủ ở 70°C/10 phút, sau đó đặt trong đá tuyết 5 phút. Thêm 4  $\mu$ L Buffer 5x (FS), 2  $\mu$ L DTT 0,1 M, 1  $\mu$ L dNTP 2,5 mM, 0,7  $\mu$ L enzyme sao chép ngược. Ổn định hỗn hợp khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng trước khi ủ 42°C trong 1 giờ. cDNA được tinh sạch bằng các viên bi thủy tinh và dung dịch rửa. Pha loãng cDNA 10 lần để thực hiện PCR định lượng hoặc bảo quản ở -20°C.

### Phương pháp RT-PCR

Trong phương pháp này, gene tham chiếu *Gapdh* được sử dụng để tính toán hàm lượng mRNA từ gene đích được biểu hiện trong mẫu thử. Hỗn hợp phản ứng gồm: 1  $\mu$ L cDNA (5 ng/1  $\mu$ L), 1  $\mu$ L mix qPCR (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, đệm qPCR 10X đã được pha theo tỷ lệ thích hợp), 0,5  $\mu$ L (10  $\mu$ M) mỗi loại muối, 7  $\mu$ L nước khử trùng. Vị trí các cặp muối được sử dụng trong thí nghiệm thể hiện qua (Hình 2).



Hình 2. Vị trí các promoter và các cặp mồi được sử dụng trong thí nghiệm. Cặp mồi *Igf2* tổng số được thiết kế trên exon chung (exon 4) cho tất cả các promoter  
 Chu kỳ nhiệt: 95°C; 2 phút; 41 chu kỳ: (95°C/5 giây; 52°C/15 giây; 72°C/30 giây)

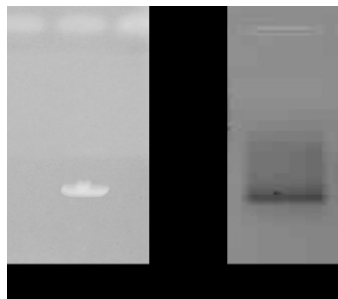
**Phương pháp 5'RACE**

Phương pháp này được sử dụng để sàng lọc các promoter mới (nếu có). 2 µg ARN sau khi xử lý với DNase, cho vào ống Eppendorf 1,5 mL 1 µL Buffer CIP (Calf Intestine Alakine Phosphatase) 10x, 1 µL RNAOut (40 U/1 µL), 1 µL CIP (10 U/1 µL) và 5 µL nước DEPC, trộn đều, ủ ở 50°C/1 giờ, sau đó thêm 90 µL DEPC và 100 µL phenol:chloroform, vortex mạnh (30 giây). Ly tâm 16000 g/phút trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng, thu lấy dịch nổi, thêm 2 µL 10 mg/mL glycogen, 10 µL 3 M sodium acetate, pH 5,2 và trộn đều, thêm 220 µL 95% ethanol, vortex nhẹ, để trong đá tuyết khoảng 10 phút. Ly tâm lạnh (4°C) trong 20 phút (16000 g/phút) để thu tủa, rửa tủa bằng 500 µL 70% ethanol, ly tâm, làm khô và hòa tủa trong 7 µL nước xử lý bằng DEPC. Tiếp tục thêm 1 µL Buffer TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 10X, 1 µL RNaseOut (40 U/µL), 1 µL TAP (0,5 U/µL), tổng thể tích lúc này là 10 µL, lắc nhẹ và ủ ở 37°C/1 giờ. Sau đó, tiến hành ly tâm thu lấy tủa ARN, hòa tan trong 7 µL nước xử lý bằng DEPC. Tiếp theo, hút dịch này cho vào ống đã chứa GeneRacer RNA Oligo (0,25 µg), dùng pipet đảo đều dung dịch, ủ ở 65°C/5 phút, làm lạnh bằng đá tuyết trong 2 phút, thêm vào 1 µL Buffer ligase10X, 1 µL ATP (10 mM), 1 µL RnaseOut (40 U/µL), 1 µL ARN T4 ligase (5 U/µL), ủ hỗn hợp ở 37°C/1 giờ, sau đó ly tâm thu tủa ARN, hòa tan tủa bằng 10 µL nước xử lý bằng DEPC, bảo quản ở -20°C.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Kết quả tách chiết ADN và ARN tổng số**

ADN và ARN tổng số được tách chiết theo phương pháp mô tả ở trên. Độ tinh sạch của ADN được đánh giá tương đối qua điện di trên gel agarose (Hình 3 A). Điện di cho thấy ADN tổng số không bị gãy và tương đối sạch, sản phẩm tốt để thực hiện các phản ứng tiếp theo. Đối với ARN, được điện di kiểm tra (Hình 3 B) trước khi định lượng bằng máy quang phổ ở bước sóng 260 nm. Nồng độ được xác định là 25 µg/mL.

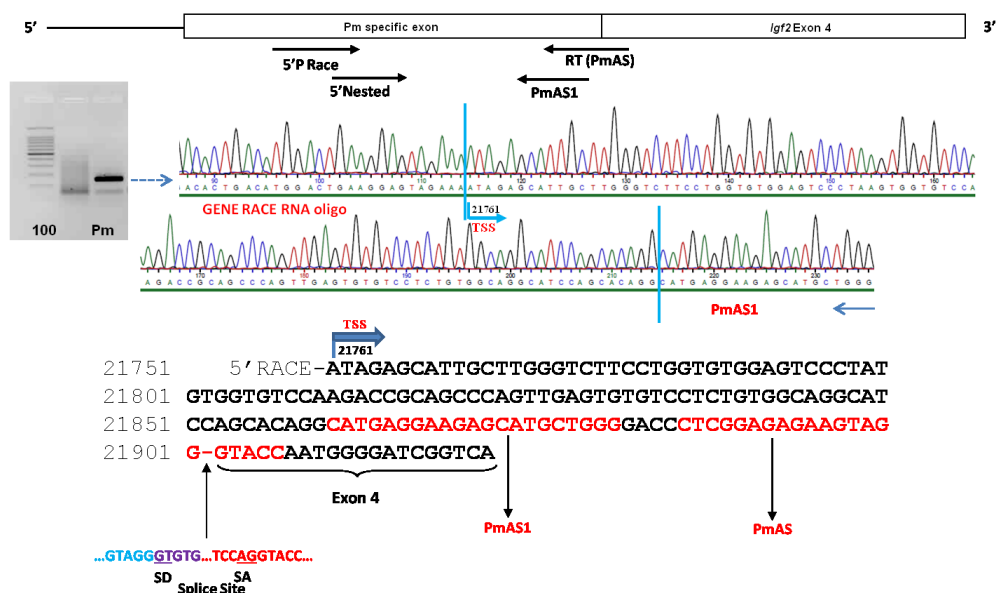


Hình 3. Điện di đồ ADN tổng số (A), ARN tổng số (B)

**Kích thước đoạn khuếch đại và phân tích trình tự của promotor Pm**

Gene *Igf2* nằm trên nhiễm sắc thể số 7 của chuột, gene này có cấu trúc phức tạp gồm 6 exon (U1, U2, 4,5,6) và 4 promoter (P0, P1, P2, P3) đã được phát hiện trước đó và Pm mới được phát hiện gần đây và biểu hiện rất thấp trong mô nội bì (Tran, 2012), trong đó có 3 exon chung (4,5,6) và điểm khởi đầu phiên mã nằm trên exon chung đầu tiên, từ mỗi promoter tạo ra một bản sao có kích thước khác nhau tùy theo độ dài đặc hiệu của mỗi promoter (Meinsma D. et al., 1991).

Với kỹ thuật oligo-RACE5', các vùng đặc hiệu này được khuếch đại chính xác từ cDNA của chuột, kích thước đoạn khuếch đại và đã được giải trình tự với chiều dài 159 bp (Hình 4). Điều đó chứng tỏ các cặp mồi được thiết kế đặc hiệu đối với các promoter và các cDNA.

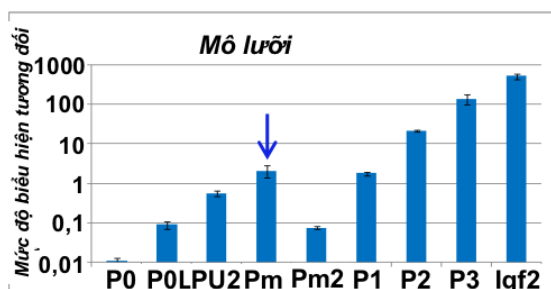


Hình 4. Điện di đồ khuếch đại và phân tích trình tự của promoter Pm đặc hiệu của *Igf2* M (Marker 100 bp)

Các cặp môi này tiếp tục được sử dụng để định lượng mức độ biểu hiện của các promoter khác nhau, ở các loại mô khác nhau của chuột.

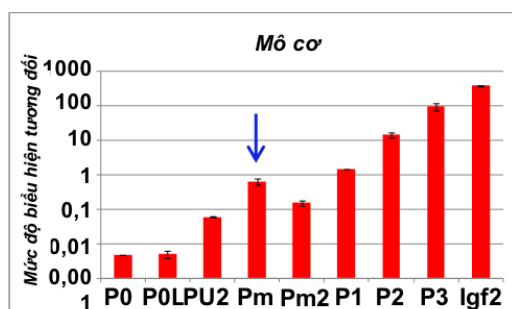
**Mức độ biểu hiện các promoter đặc hiệu của gene *Igf2***

Từ các mô được thu nhận từ chuột, ARN được tách chiết, tinh sạch và được đánh giá mức độ biểu hiện của các promoter. Mức độ biểu hiện các promoter khác nhau khi so sánh tương quan với biểu hiện của ARN *Igf2* tổng số, kết quả cho thấy: Trong mô lưới, P3 biểu hiện cao nhất, đến P2, tiếp đến P1 và Pm, các promoter còn lại biểu hiện thấp (Pm2, Pu2, PoL, P0) (Hình 5).



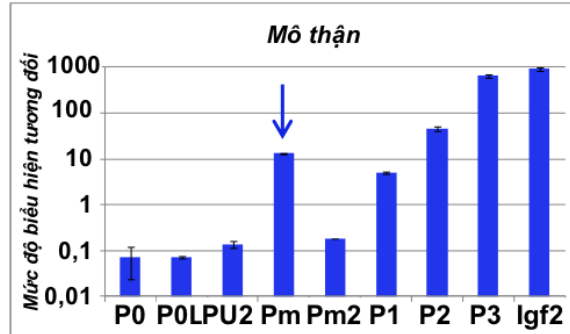
Hình 5. Mức độ biểu hiện Pm trong mô lưới so với các promoter ở chuột trong sự tương quan với sự biểu hiện của *Igf2* tổng số

Mức độ biểu hiện các promoter được đánh giá trên mô cơ, P3 vẫn biểu hiện biểu hiện cao nhất, đến P2, tiếp đến P1 và Pm, các promoter còn lại biểu hiện thấp (Pm2, Pu2, PoL, P0) (Hình 6).



Hình 6. Mức độ biểu hiện Pm trong mô cơ so với các promoter ở chuột trong sự tương quan với sự biểu hiện của *Igf2* tổng số

Kết quả tương tự khi đánh giá mức độ biểu hiện các promoter được đánh giá trên mô thận, P3 vẫn biểu hiện cao nhất, đến P2, tiếp đến Pm và P1, các promoter còn lại biểu hiện thấp (Pm2, Pu2, PoL, P0) (Hình 7).



Hình 7. Mức độ biểu hiện Pm trong mô thận so với các promoter ở chuột trong sự tương quan với sự biểu hiện của *Igf2* tổng số

Khi nghiên cứu biểu hiện ARN *Igf2* không chỉ nghiên cứu trên các loại mô khác nhau, nhiều thời điểm khác nhau, mà còn nghiên cứu biểu hiện tại vùng nào trên phân tử đó, phân tử này được chia thành 3 vùng chính khi nghiên cứu biểu hiện đó là vùng các promoter, vùng chứa các exon chung và vùng đầu 3' chứa đuôi polyA. Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện mới chỉ được thực hiện trên các promoter khác nhau của *Igf2* và chỉ trong 3 loại mô bì là cơ, lưỡi và thận. Để nghiên cứu mức độ biểu hiện của gene thì ngoài phương pháp qPCR còn có thể sử dụng phương pháp Northern blot, tuy nhiên phương pháp Northern blot thường được sử dụng khi nghiên cứu biểu hiện đầy đủ toàn phân tử ARN. Khi định lượng mức độ biểu hiện của các promoter trong các loại mô khác nhau từ chuột, kết quả cho thấy rằng: tất cả các promoter đều biểu hiện trong mô nội bì và mô biểu bì, điều này liên quan đến chức năng điều hoà sự tăng sinh tăng trưởng của gene *Igf2*, trong đó P2 và P3 cao nhất và khá ổn định tất cả các loại mô, Pm chỉ biểu hiện ổn định trong mô biểu bì. Trong mô nhau thai, mức độ biểu hiện các promoter đều thấp và không biểu hiện, chỉ có promoter P0, là promoter đặc hiệu chỉ biểu hiện trong nhau thai (Constância *et al.*, 2002), đặc biệt. Các promoter còn lại đều biểu hiện thấp ở tất cả các mô.

## KẾT LUẬN

ADN và ARN tổng số được tách chiết từ mô biểu bì của chuột *Mus musculus* (nên đưa thông tin về dòng chuột vào phần nguyên vật liệu) có nồng độ cao, sạch, ít bị đứt gãy và tập trung thành băng rõ nét. Đã nhân dòng thành công và giải trình tự, phân tích trình tự của promoter Pm có 4 đảo CpG và chứa 159 nucleotide. Mỗi đặc hiệu cho Pm được thiết và đã khuếch đại chính xác kích thước từ cDNA (159 bp). Kết quả đánh giá sự biểu hiện của các promoter trong 3 loại mô bì (mô lưỡi, mô thận và mô cơ) cho thấy, promoter P3, P2, P1 có sự biểu hiện cao, promoter Pm biểu hiện cao và ổn định, các promoter còn lại biểu hiện thấp.

**Lời cảm ơn:** Xin chân thành cảm ơn Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử - Viện Di truyền Phân tử Montpellier, Phòng Thí nghiệm Luisa Dandolo, INSERM Paris - Cộng hoà Pháp đã cung cấp các dòng chuột, gene tham chiếu *Gapdh* khi định lượng ARN và một số hoá chất cần cho nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Biressi S, Molinaro M, Cossu G (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Devel Bio*: 308: 281-293.
- Bhusari S, Yang B, Kueck J, Huang W, Jarrard DF (2011) Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer prostate. *Prostate*: 71(15): 1621-1630.
- Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, 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.
- DeChiara T. M, Efstratiadis A, Robertson EJ (1990) A growth - deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin - like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*: 345(6270): 78-80.
- Joanne L, Thorvaldsen, Kristen L, Duran, Marisa S, Bartolomei (1998) Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and *Igf2*. *Gene Dev* 12(23): 369 -3702.
- Meinsma D, Holthuisen PE, Van den Brande JL, Sussenbach JS (1991) Specific endonucleolytic cleavage of IGF-II mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 179(3): 1509 - 1516.
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, NY.
- St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, Poirier P, Guay SP, Brisson D, Bouchard L (2012) IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics* 7(10): 1125-1132.

Tran V.G, Court F, Duputié A, Antoine E, Aptel N, Milligan L, Carbonell F, Lelay-Taha M.N, Piette J, Weber M, Montarras D, Pinset C, Dandolo L, Forné T, Cathala G (2012) *H19 antisense RNA can up-regulate Igf2 transcription by activation of a novel promoter in mouse myoblasts*. PLoS ONE 7: e37923.

Wolfgang H, Andreas W, Arend K, Steffen A, Steven G, Gray TJ, Torsten P (2011) Promoter - specific transcription of the IGF2 gene: a novel rapid, non-radioactive and highly sensitive protocol for mRNA analysis. *Virchows Arch*. 439: 803-807.

## CLONING, SEQUENCING AND GENE EXPRESSION OF *Igf2* IN MOUSE

Tran Van Giang<sup>1\*</sup>, Guy Cathala<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Education, Hue University

<sup>2</sup> IGMM - France

### SUMMARY

In mice, a lot of the imprinting genes have been discovered including *Igf2* gene. Gene *Igf2* (*Insulin - like growth factor 2*) is only one parental allele is expressed depending on allele specific origin. Imprinted genes *Igf2* encoded a growth factor regulator, which play an important role in embryonic development and formation of the placenta. The expression and regulation and expression of genes *Igf2* is carried out of different promoters (P3, P2, P1, Pm, Pm2, Pu2, P0). This paper, Pm is focused on research, Pm promoter is stable in epidermal tissue. Promoter Pm has been extracted, amplified, purified and cloning from the epidermal tissue, which is tongue, muscle and kidney tissue. The promoter sequence is 159 nucleotides. The results of the evaluation of promoter expression from tongue, muscle and kidney tissues showed that the expression of Pm was lower than that of the total *Igf2*, P3, P2 and higher than the others *Igf2* promoters.

**Keywords:** Cloning, gene expression, *Igf2*, mouse, promoter.

---

\* Author for correspondence: Tel: +84-2343822132, Email: tranvangiang@dhsphue.com