

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG CỦA BỘ KIT TẠO DÒNG DỰA TRÊN TRÌNH TỰ TƯƠNG ĐỒNG eClone

Nguyễn Thị Mỹ Trinh*, Nguyễn Văn Hậu

Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Hiện nay, tạo dòng DNA trở thành một phương pháp cơ bản trong các nghiên cứu thuộc lĩnh vực sinh học và công nghệ sinh học, và do đó, nhiều phương pháp tạo dòng đã được phát triển nhằm tăng hiệu suất tạo dòng. Cũng trong xu thế này, phòng thí nghiệm CNSH Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã phát triển thành công bộ kit tạo dòng eClone dựa trên sự tái tổ hợp tương đồng giữa các đoạn trình tự tương đồng trên vector và DNA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả của bộ kit trong việc nối ba đoạn gene có độ dài 300 bp, 1000 bp, 1500 bp vào vector pET-28a(+) nhờ sự có mặt của các trình tự tương đồng dài 10-20 nu ở hai đầu của gene và vector. Đồng thời, khi so sánh hiệu quả với bộ kit thương mại GeneBuilder (GenScript, Hoa Kỳ), chúng tôi nhận thấy mặc dù số lượng khuẩn lạc thu nhận được từ bộ kit tạo dòng eClone có thấp hơn so với bộ kit thương mại nhưng tỷ lệ khuẩn lạc dương tính không khác biệt đáng kể. Bên cạnh đó, cho đến nay đã có trên 200 gene đã được tạo dòng thành công bằng phương pháp eClone tại nhiều đơn vị kinh doanh và nghiên cứu khác nhau. Các kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của bộ kit eClone trong các nghiên cứu liên quan đến tạo dòng phân tử.

Từ khóa: eClone, trình tự tương đồng, tạo dòng DNA, pET-28a(+), hiệu suất tạo dòng.

MỞ ĐẦU

Tạo dòng phân tử hoặc tạo dòng DNA là quá trình chèn một đoạn DNA vào một vector, sau đó biến nạp vào tế bào chủ để khuếch đại đoạn DNA mục tiêu hoặc biểu hiện protein tái tổ hợp. Từ khi thành công vào năm 1972, tạo dòng DNA ngày càng được sử dụng rộng rãi, nhanh chóng trở thành một kĩ thuật cơ bản, quan trọng trong lĩnh vực sinh học và công nghệ sinh học (Cohen, 2013). Do đó, nhiều phương pháp tạo dòng đã được các phòng thí nghiệm phát triển để nâng cao hiệu quả và giảm chi phí.

Phương pháp tạo dòng truyền thống sử dụng enzyme cắt giới hạn (Restriction enzyme - RE) và DNA ligase, bao gồm các bước chính: 1, sử dụng các RE để cắt đoạn DNA mục tiêu và vector; 2, khuếch đại DNA mục tiêu và chèn vào vector đã cắt mở vòng bằng cách sử dụng enzyme DNA ligase; 3, Biến nạp hỗn hợp nối vào tế bào chủ; và 4, sàng lọc dòng mục tiêu (Lorsch, 2013). Mặc dù phương pháp này đơn giản, linh hoạt, chi phí thấp, nhưng có nhiều hạn chế như một số trường hợp không thể tìm được RE phù hợp do đoạn gene mục tiêu chứa nhiều vị trí nhận biết của RE; điều kiện phản ứng của các RE khác nhau nên làm giảm hiệu suất tạo dòng nếu chọn chiến lược cắt vector bằng 2 enzyme và thu nhận nhiều khuẩn lạc không chứa gene do vector tự nối.

Để cải thiện hiệu quả tạo dòng DNA, các nhà khoa học sử dụng các bộ kit tạo dòng đã được phát triển và hiện có trên thị trường như Cloning Independent Cloning (New England Biolabs, Hoa Kỳ), In-fusion kit (Takara, Nhật Bản), Cold-fusion kit (System Biosciences, Hoa Kỳ), hoặc Genbuilder™ DNA Assembly (Genscript Biotech, Hoa Kỳ) thay vì sử dụng ligase. Các kit tạo dòng này hoạt động dựa trên sự hiện diện của vùng tương đồng ở mỗi đầu của đoạn DNA mục tiêu và vector đã cắt mở vòng dưới tác động của các enzyme đặc hiệu (Valla *et al.*, 2014). Ưu điểm của phương pháp này so với các phương pháp truyền thống là đạt hiệu quả tạo dòng cao, không cần cắt trình tự mục tiêu với RE và tiết kiệm thời gian. Tuy nhiên, do sử dụng các enzyme tinh sạch, các bộ kit này hiện được bán với giá cao nên vẫn chưa được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm tại Việt Nam.

Với mục đích thúc đẩy nghiên cứu Sinh học và Công nghệ sinh học trong nước, Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã nghiên cứu và phát triển bộ kit tạo dòng eClone dựa trên quá trình tái tổ hợp tương đồng, giúp việc tạo dòng gene trở nên đơn giản, hiệu quả và tiết kiệm chi phí. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích đánh giá hiệu quả tạo dòng của bộ kit eClone.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

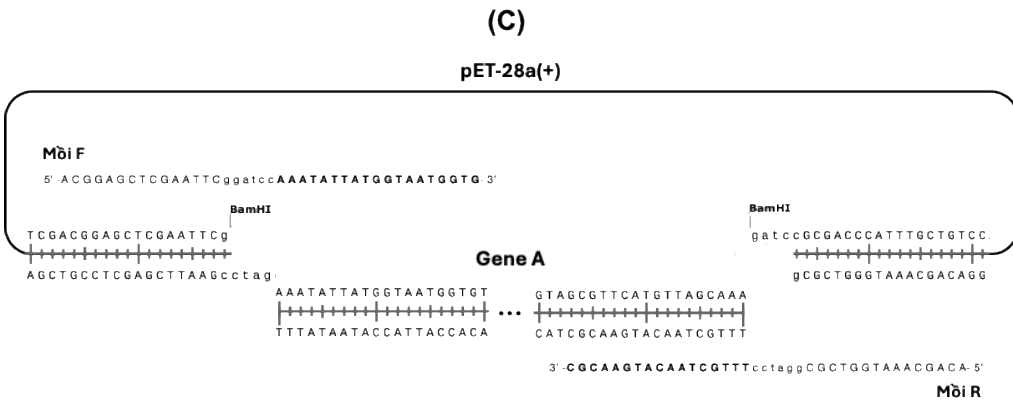
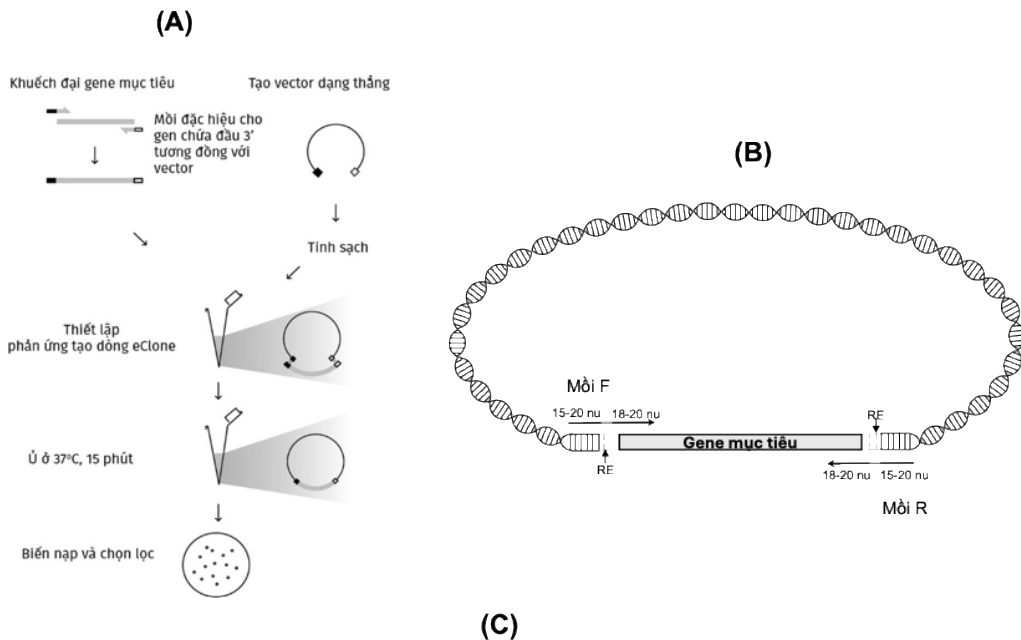
Bộ kit tạo dòng eClone được sản xuất và cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Bộ kit gồm 2 thành phần: enzyme

eClone và buffer 10X. Plasmid pET-28a(+) (Merck Biosciences, Hoa Kỳ) được thu nhận từ tế bào *E. coli* DH5 α /pET-28a(+). Tế bào *E. coli* DH5 α (Thermofisher Scientific, Hoa Kỳ) được sử dụng cho mục đích tạo dòng. Thang DNA 1 kb được cung cấp bởi hãng Bioline (Canada).

Chiến lược tạo dòng

Bộ kit eClone cho phép nối một đoạn gene bất kỳ vào plasmid theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng theo quy trình được trình bày ở Hình 1A. Trong đó, plasmid sẽ được cắt mở vòng bằng 1 hoặc 2 enzyme cắt giới hạn. Trong nghiên cứu này, plasmid pET-28a(+) được sử dụng và được cắt mở vòng bằng enzyme *Bam*HI. Song song đó, gene mục tiêu được khuếch đại bằng phương pháp PCR với cặp mỗi đặc hiệu, trong đó mỗi mỗi sẽ chứa 3 trình tự đặc trưng theo thứ tự từ đầu 5' đến đầu 3' như sau: 1) 10-20 nucleotide (nu) giống với trình tự ở đầu tương ứng trên plasmid đã cắt mở vòng; 2) trình tự của RE được dùng để cắt mở vòng plasmid; và 3) 18-20 nu đặc hiệu với gene để khuếch đại gene mục tiêu (Hình 1B). Trong nghiên cứu này, 3 gene có độ dài khác nhau A (~300 bp), B (~1000 bp) và C (~1500 bp) được sử dụng để đánh giá hiệu quả tạo dòng của bộ kit eClone.

Sau đó, gene mục tiêu được nối vào plasmid thông qua quá trình tái tổ hợp giữa các trình tự tương đồng ở 2 đầu của gene và plasmid dưới sự xúc tác của enzyme eClone. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* khả nạp. Cuối cùng, hỗn hợp biến nạp được trải trên đĩa chứa môi trường LB có bổ sung nhân tố chọn lọc (Kanamycin). Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc và xác nhận lại bằng phương pháp PCR plasmid.



Hình 1. Quy trình tạo dòng (A), nguyên tắc thiết kế mỗi (B) của phương pháp tạo dòng eClone và cách thiết kế mỗi dùng để khuếch đại gene A với độ dài trình tự tương đồng là 15 nucleotide (C)

Chuẩn bị gene mục tiêu và plasmid

Ba gene A, B, C được khuếch đại từ mạch khuôn được đặt tổng hợp bằng phương pháp PCR với các cặp mỗi tương ứng được thiết kế theo nguyên tắc đã trình bày ở trên dưới sự xúc tác của Taq DNA polymerase (Bioline,

Canada). Để làm rõ hơn về cách thiết kế mồi, trình tự cặp mồi dùng để khuếch đại gene A mang 15 nu tương đồng với plasmid được lấy làm ví dụ và thể hiện ở Hình 1C, gồm mồi F: 5'-ACGGAGCTCGAATTCgg atccAAATATTATGGTAATGGTG-3' và mồi R: 5'-ACAGCAAATGGTTCGC ggatccTTTGCTAACATGAACGC-3' (Ký tự chữ hoa: trình tự giống với plasmid, ký tự chữ thường: vị trí nhận diện của BamHI, và ký tự chữ hoa đậm: trình tự đặc hiệu với gene). Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng phương pháp phenol/choloroform. Nồng độ DNA sau đó được xác định dựa trên độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm bằng máy Nanodrop (Thermo Fisher, Hoa Kỳ).

Để cắt mở vòng plasmid, phản ứng gồm Buffer Tango 1X, 0,3 U/μL BamHI, và 4000 ng/μL plasmid pET-28a(+) được chuẩn bị và ủ ở 37°C trong 16 giờ. Sau khi hoàn thành, phản ứng được ủ ở 65°C trong 10 phút để bất hoạt enzyme BamHI. Cuối cùng, sản phẩm cắt được tinh sạch bằng bộ kit EZ-10 Spin Column DNA PCR purification (Bio Basic, Canada).

Thực hiện phản ứng nối gene vào plasmid bằng bộ kit eClone

Thiết lập 10 μL phản ứng nối gồm 37,5 ng/μL plasmid pET-28a(+) đã cắt mở vòng, gene mục tiêu, 1X eClone buffer, 1 μL enzyme eClone. Trong đó, lượng gene mục tiêu được bổ sung để đạt tỷ lệ gene:plasmid là 3:1. Phản ứng nối được tiến hành ở 37°C trong 15 phút.

Chuẩn bị tế bào khả nạp

Tế bào *E. coli* DH5α khả nạp được chuẩn bị theo quy trình đã được mô tả trước đó (Tu, 2008). Tính khả nạp của tế bào được đánh giá bằng cách biến nạp 1 μg plasmid pET-28a(+) vào 100 μL dịch tế bào khả nạp. Sau đó, trải tế bào trên đĩa Luria Bertani có bổ sung 30 μg/mL Kanamycin (LB-Kan) và đếm tổng số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa. Hiệu quả biến nạp của tế bào được ghi nhận bằng số khuẩn lạc xuất hiện trên 1 μg plasmid (cfu/μg).

Biến nạp và đánh giá hiệu quả tạo dòng của bộ kit eClone

Bổ sung toàn bộ 10 μL phản ứng nối vào 1 eppendorf chứa 100 μL tế bào khả nạp theo quy trình được mô tả bởi Tu (2008). Hỗn hợp biến nạp được trải trên đĩa môi trường LB-Kan, sau đó đĩa được ủ ở 37°C trong 16-20 giờ. Số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa được đếm và ghi nhận lại.

Sau đó, 10 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra sự hiện diện của plasmid tái tổ hợp pET-28a(+)-A/B/C bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với các cặp mồi đặc hiệu đã được sử dụng để thu nhận gene. Các khuẩn lạc cho kết quả dương tính sẽ được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB-Kan và plasmid được thu nhận bằng phương pháp SDS-Kiểm. Sự hiện diện của gene mục tiêu trong plasmid được kiểm tra lại bằng phương pháp PCR plasmid với cặp mồi gồm mồi F trên gene (mồi dùng để thu gene) và mồi R trên T7 terminator của plasmid.

Tỷ lệ khuẩn lạc dương tính được tính theo công thức: Tỷ lệ khuẩn lạc dương tính (%) = (b/a) x (d/c), trong đó: a là số lượng khuẩn lạc được chọn để tiến hành PCR khuẩn lạc, b là số lượng khuẩn lạc cho kết quả dương tính với PCR khuẩn lạc, c là số lượng plasmid được kiểm tra bằng phương pháp PCR plasmid, d là số lượng plasmid cho kết quả dương tính với PCR plasmid

So sánh hiệu quả tạo dòng của bộ kit eClone và GenBuilder

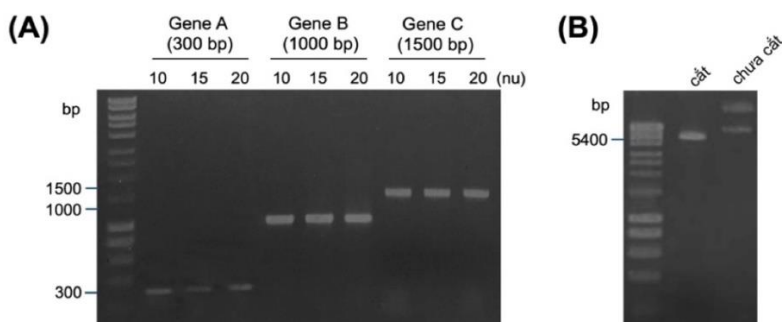
Gene A được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu chứa 15 nucleotide tương đồng với plasmid. Quá trình tạo dòng được thực hiện như quy trình được đề cập ở trên, trong đó phản ứng nối gene vào plasmid bằng eClone được thực hiện ở 37°C trong 15 phút trong khi phản ứng nối bằng GenBuilder được thực hiện ở 50°C trong 15 phút. Sự khác nhau giữa số khuẩn lạc thu nhận được và tỷ lệ dương tính của bộ kit eClone và GenBuilder được phân tích thống kê bằng phần mềm Graphpad prism 7.0 sử dụng phép kiểm định unpaired T-test.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận gene và plasmid

Ba gene A (300bp), B (1000bp) và C (1500bp) được khuếch đại với mồi đặc hiệu chứa vùng trình tự tương đồng lần lượt là 10 nu, 15 nu và 20 nu. Kết quả điện di trên gel agarose 1,2% (Hình 2A) cho thấy một vạch ở mỗi giếng có kích thước phù hợp với kích thước lý thuyết của gene và không xuất hiện vạch phụ, cho thấy chúng tôi đã khuếch đại thành công các gene mục tiêu với các mồi được thiết kế và phản ứng PCR đặc hiệu cho các gene.

Song song đó, chúng tôi cũng tiến hành thu nhận và cắt mở vòng plasmid pET-28a(+) bằng enzyme cắt giới hạn BamHI. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy plasmid sau khi cắt mở vòng cho một vạch duy nhất và sắc nét nằm trong khoảng giữa hai vạch 5000 bp và 6000 bp của thang DNA, tương ứng với kích thước lý thuyết là 5369 bp (Hình 2B). Như vậy, bước đầu chúng tôi khẳng định được đã thành công trong việc cắt mở vòng plasmid. Tuy nhiên, do hạn chế về giới hạn phát hiện DNA của phương pháp điện di trên gel agarose và nhuộm DNA bằng ethidium bromide, chúng tôi tiến hành bước kiểm tra sâu hơn để đánh giá hiệu quả của phản ứng cắt bằng cách biến nạp sản phẩm cắt vào tế bào *E. coli* DH5α. Kết quả biến nạp cho thấy số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa LB-Kan rất ít, chỉ 0-1 khuẩn lạc ở mỗi lần lặp lại. Như vậy, chúng tôi khẳng định được phản ứng cắt mở vòng plasmid thành công với hiệu suất cao.



Hình 2. Kết quả thu nhận gene A, B, C (A) và cắt mở vòng plasmid pET-28a(+) bằng enzyme *Bam*HI (B)

Kiểm tra hiệu quả biến nạp của tế bào khả nạp

Do hiệu quả tạo dòng phụ thuộc nhiều vào tính chất của tế bào khả nạp nên chúng tôi tiến hành đánh giá sức sống cũng như tính khả nạp của tế bào. Sức sống của tế bào được đánh giá bằng cách nuôi cấy trên đĩa môi trường LB không chứa kháng sinh và LB-Kan. Tính khả nạp của tế bào được đánh giá thông qua số lượng thể biến nạp xuất hiện trên môi trường LB - Kan sau khi được biến nạp plasmid pET-28a(+). Kết quả cho thấy tế bào khả nạp *E. coli* DH5 α có hiệu quả biến nạp $1,6 \times 10^6$ cfu/ μ g. Hiệu quả biến nạp của tế bào *E. coli* DH5 α trong sản phẩm thương mại của một số công ty như Thermo Fisher, Abmgood từ khoảng 10^6 đến 10^8 cfu/ μ g. Như vậy, chúng tôi đã chuẩn bị tế bào khả nạp có hiệu quả biến nạp cao và thích hợp để tạo dòng gene mục tiêu.

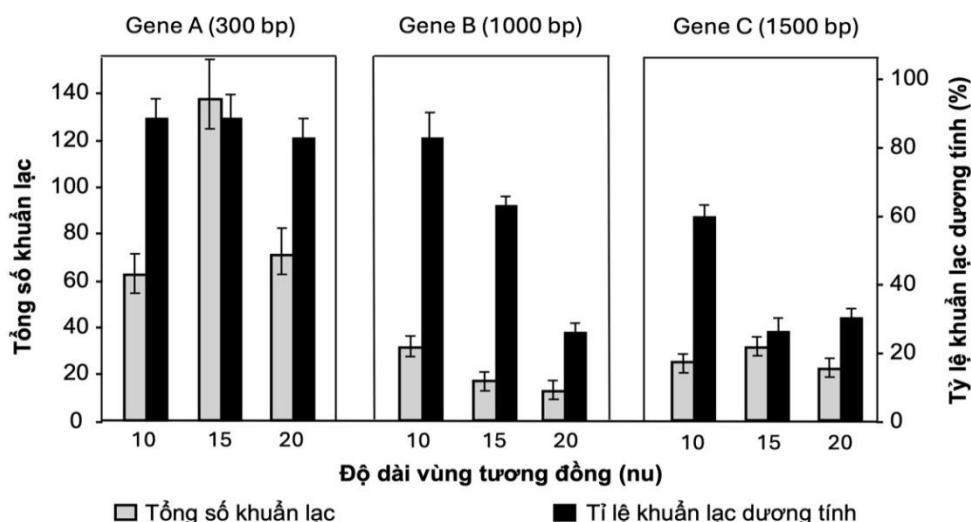
Đánh giá hiệu quả tạo dòng của bộ kit eClone đối với các gene có kích thước khác nhau và chiều dài vùng trình tự tương đồng khác nhau

Nghiên cứu Shen và Huang (1986) cho thấy hiệu suất của quá trình tái tổ hợp tương đồng phụ thuộc vào độ dài của trình tự tương đồng. Các nghiên cứu sau này, điển hình là nghiên cứu năm 1995 của Fujitani và đồng tác giả (1995) chỉ ra mối quan hệ tuyến tính giữa chiều dài vùng tương đồng và hiệu suất quá trình tái tổ hợp. Do đó, chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả tạo dòng của bộ kit eClone đối với các gene có chiều dài khác nhau (300bp, 1000bp và 1500bp) và độ dài đoạn tương đồng khác nhau (10 nu, 15 nu và 20 nu). Hiệu quả tạo dòng được đánh giá dựa trên 2 tiêu chí: số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa biến nạp và tỉ lệ khuẩn lạc dương tính được tính.

Kết quả tạo dòng (Hình 3) cho thấy đối với gene A có kích thước 300bp, việc sử dụng mỗi có kích thước vùng tương đồng 15 nucleotide cho số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa LB-Kan cũng như tỷ lệ khuẩn lạc dương tính cao nhất. Nhìn chung, đối với cả 3 độ tương đồng, tỷ lệ khuẩn lạc dương tính mang gene A đều trên 85%. Đối với gene B có kích thước 1000 bp, số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa LB-Kan cũng như tỷ lệ khuẩn lạc dương tính cao nhất ứng với mỗi có kích thước vùng tương đồng 10 nu và tỷ lệ khuẩn lạc dương tính đều trên 60% đối với việc sử dụng mỗi có chiều dài vùng tương đồng ngắn (10 và 15 nu). Đối với gene C có kích thước 1500 bp, việc sử dụng mỗi có kích thước vùng tương đồng 10 nucleotide cho số lượng khuẩn lạc tương đối cao và tỷ lệ khuẩn lạc dương tính cao nhất, nhưng chỉ thu được 25 khuẩn lạc với tỉ lệ dương tính $63,33 \pm 6,22\%$.

Như vậy, trong phạm vi khảo sát ở nghiên cứu này, chúng tôi kết luận được: đối với gene có kích thước 300 bp, độ dài đoạn tương đồng tối ưu là 15 nu, trong khi đối với gene có kích thước cao hơn (1000 nu và 1500 nu), kích thước vùng tương đồng tối ưu là 10 nu. Về kích thước gene, gene có kích thước nhỏ cho hiệu suất (số khuẩn lạc và tỷ lệ dương tính) cao hơn gene có kích thước lớn. Nhưng nhìn chung, với việc sử dụng bộ kit eClone, chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng gene có kích thước lên đến 1500 bp với độ dài vùng trình tự tương đồng là 10-20 nu. Bên cạnh đó, 3 plasmid mang gene A, B, C được lựa chọn ngẫu nhiên để kiểm tra độ chính xác của trình tự được chèn bằng phương pháp giải trình tự Sanger, kết quả cho thấy cả 3 đoạn gene A, B, C được chèn vào các plasmid này có độ chính xác 100% so với trình tự lý thuyết.

Nghiên cứu của Jacobus và đồng tác giả (2015) cho thấy tỉ lệ khuẩn lạc dương tính tăng khi tăng chiều dài vùng tương đồng và thích hợp nhất với đoạn 20 bp. Nghiên cứu của Jacobus sử dụng gene có kích thước 500bp và vector pUC19 (2314 bp), nồng độ plasmid từ 100 ng - 250 ng với tỉ lệ 2:1. Đối chiếu với những khảo sát trong đề tài này, cho thấy sự khác nhau trên hai kết quả thu được là khó tránh khỏi khi sử dụng những điều kiện nghiên cứu khác nhau. Một mặt, nghiên cứu của tác giả trên sử dụng tế bào khả nạp có hiệu suất khả nạp và số lượng khuẩn lạc sàng lọc cao hơn. Mặt khác, kích thước plasmid khi biến nạp vào tế bào chủ *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt có thể ảnh hưởng đến hiệu suất biến nạp (Hanahan, 1983). Đề tài của chúng tôi khảo sát trên các kích thước gene khác nhau cho góc nhìn rộng hơn khi so sánh các kích thước của vùng tương đồng. Vì vậy, với kết quả tạo dòng trong đề tài, chúng tôi xác nhận được bộ kit tạo dòng eClone để tạo dòng với kích thước vùng tương đồng là 10 nu (hoặc 15 nu trong trường hợp đoạn gene có kích thước ngắn). Kết quả của chúng tôi cũng có khác biệt so với kết quả nghiên cứu của Fujitani (1995), tác giả kết luận rằng hiệu suất tái tổ hợp tuyến tính với chiều dài đoạn tương đồng. Mặc dù nguyên nhân khác biệt vẫn chưa rõ, chúng tôi giả thiết rằng khi DNA mạch đơn được tạo thành ở bước đầu của quá trình tái tổ hợp, việc kéo dài đoạn tương đồng trong nghiên cứu của chúng tôi đã làm xuất hiện các cấu trúc thứ cấp ở đoạn DNA mạch đơn này dẫn tới hiện tượng giảm hiệu suất tạo dòng.



Hình 3. Ảnh hưởng của chiều dài gene và chiều dài vùng tương đồng đến hiệu quả tạo dòng

So sánh hiệu quả tạo dòng giữa bộ kit đang phát triển và bộ kit GenBuilder

Kết quả so sánh hiệu quả tạo dòng bằng bộ kit eClone và bộ kit tái tổ hợp tương đồng thương mại GenBuilder (Genscript) cho thấy số khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc khi sử dụng bộ kit thương mại GenBuilder nhiều hơn so với bộ kit eClone, tuy nhiên tỷ lệ dương tính của cả 2 phương pháp đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 1).

Bảng 1. So sánh hiệu quả tạo dòng với bộ kit thương mại

	Số khuẩn lạc	Tỷ lệ dương tính (%)
Bộ kit thương mại GenBuilder	241 ± 15,9	83 ± 5,8
Bộ kit hiện tại	83 ± 9,8****	87 ± 11,5 ^{ns}

Ký hiệu: ns: p>0,5, không khác biệt có ý nghĩa thống kê; ****: p<0.001.

Thống kê số lượng gene đã tạo dòng thành công bằng bộ kit eClone

Bộ kit tạo dòng eClone được chúng tôi sử dụng thường xuyên trong việc tạo dòng DNA, đồng thời gửi đi một số đơn vị nghiên cứu khác để đánh giá hiệu quả tạo dòng của bộ kit này. Cho đến nay, theo kết quả thống kê chúng tôi thu nhận được, đã có 222 dòng được tạo thành công nhờ bộ kit eClone, với kích thước gene từ 162 bp cho đến 5000 bp và kích thước plasmid từ 2686 bp đến khoảng 7500 bp (Bảng 2). Trong đó, tất cả các dòng đã được tạo ra tại Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM đã được giải trình tự, kết quả cho thấy tất cả các đoạn DNA được chèn vào plasmid có trình tự chính xác 100% so với trình tự lý thuyết. Tỷ lệ dương tính có nhiều biến động lớn, từ 8-100%, chủ yếu do nguyên liệu dùng để tạo dòng như plasmid cắt mở vòng, gene mục tiêu và tế bào *E. coli* khả năng chưa được chuẩn hoá như trong các thí nghiệm trước. Bên cạnh đó, kết quả thử nghiệm tại công ty sinh hoá Phù Sa Biochem cho thấy đã thành công trong việc chia một đoạn gene kích thước 3022 bp thành 3 mảnh nhỏ khác nhau và tiến hành nối đồng thời vào plasmid pUC19 để tạo ra plasmid tái tổ hợp chứa toàn bộ gene này (Bảng 3, STT 18). Kết quả này chứng minh được rằng bộ kit eClone có khả năng nối nhiều đoạn gene vào một plasmid dựa trên trình tự tái tổ hợp tương đồng giữa chúng, một hiệu quả khó có thể có khi sử dụng phương pháp tạo dòng dựa trên DNA ligase truyền thống.

Bảng 2. Bảng thống kê kết quả tạo dòng với nhiều gene và plasmid khác nhau

STT	Kích thước gene (bp)	Plasmid	Kích thước plasmid (bp)	Số khuẩn lạc	Tỷ lệ dương tính
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. Hồ Chí Minh					
1	162	pET-22b(+)	5493	19	67%
2	1008	pET-22b(+)	5493	62	40%
3	1008	pYSag	6378	18	60%
Công ty Phù Sa Biochem					
<i>Kết quả QC</i>					
16	600	pUC19	2686	74-144	90-100%
17	435	pJET1.2	2974	54-85	100%

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

4	1032	pET-22b	5493	1	100%
5	528	pQE60	3431	>300	40%
6	420	pPICZαA	3593	117	60%
7	109	pET-28a(+)	5369	4	50%
8	2274	pET-22b(+)	5493	6	17%
9	2274	pYSag	6378	3	100%
10	441	pPICZαA	6378	6	83%
11	900	pYSag	6378	24	100%
12	1371	pYSag	6378	40	100%
13	723	pPICZαA	6378	109	17%
14	267	p427-TEF	7464	17	100%
15	75	p427-TEF	7464	44	86%

<i>Khảo sát nối nhiều đoạn (nối 3 đoạn gene vào 1 vector)</i>					
18	3022	pUC19	2686	300	8%
<i>Tạo dòng cho mục đích thương mại</i>					
19-220	Tạo dòng thành công 202 gene có kích thước từ 200-5000 bp				
Trường Đại học Quốc tế, ĐHQG TP. Hồ Chí Minh					
221	300		3000	20-250	60-100%
Trung tâm Công nghệ sinh học Tp. Hồ Chí Minh					
222	714	5335			100%

KẾT LUẬN

Các kết quả đánh giá về hiệu quả tạo dòng bằng bộ kit eClone của chúng tôi cho thấy chúng tôi đã tạo dòng thành công 3 gene có kích thước khác nhau 300 bp, 1000 bp và 1500 bp vào plasmid pET-28a(+) với hiệu quả khác nhau tùy theo kích thước gene và kích thước vùng tương đồng. Khi so sánh hiệu quả tạo dòng giữa bộ kit eClone với bộ kit thương mại GenBuilder (Genscript), chúng tôi nhận thấy tuy bộ kit eClone cho số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa sàng lọc thấp hơn nhưng tỷ lệ dương tính của 2 phương pháp này là tương tự nhau. Các kết quả đánh giá độc lập tại các đơn vị nghiên cứu khác cũng cho thấy họ đã tạo dòng thành công rất nhiều đoạn gene khác nhau khi sử dụng bộ kit này. Những kết quả này cũng cấp những bằng chứng cho thấy tiềm năng thương mại lớn của bộ kit eClone.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số DS2020-18-01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cohen SN (2013) DNA cloning: a personal view after 40 years. *PNAS* 110(39): 15521-15529.
- Fujitani Y, Yamamoto K, Kobayashi I (1995) Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length. *Genetics* 140(2): 797-809. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498755>
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>
- Jacobus AP, Gross J (2015) Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. *PLoS One* 10(3): e0119221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119221>
- Lorsch J (2013) *Laboratory methods in enzymology: RNA* (Vol. 530). Academic Press.
- Shen P, Huang HV (1986) Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics* 112(3): 441-457. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3007275>
- Tu AHT (2008) Transformation of *Escherichia coli* made competent by calcium chloride protocol. *Am Soc Microbiol* 8: 1542-1546.
- Valla S, Lale R (2014) *DNA cloning and assembly methods* (Vol. 119). Springer.

EVALUATING THE EFFICIENCY OF HOMOLOGY-BASED CLONING KIT eClone

Nguyen Thi My Trinh^{*}, Nguyen Van Hau

Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, Vietnam National University – Ho Chi Minh city

SUMMARY

Nowadays, DNA cloning has been widely used as the basic and critical technique in biology and biotechnology. Due to its importance, a great number of methods has been being developed by multiple laboratories to improve the efficiency and reduce the cost of cloning. For the same purpose, the Laboratory of Molecular Biotechnology, VNUHCM-University of Science has developed an easy, effective and economical cloning kit, named eClone. This kit provides a simple cloning method that allows you to insert one or more DNA fragment(s) into a linearized vector due to the presence of homologous sequences on them. In this study, we investigated the cloning efficiency of this kit. Using eClone kit, we succeeded in cloning 3 genes of 300 bp, 1000 bp, and 1500 bp long containing 10-20 nu homologous sequences into vector pET-28a(+). Besides, when comparing the cloning efficiency of eClone kit and the commercial kit GenBuilder (Genscript, USA), we found that although the eClone kit yielded a lower number of colonies in the selective medium than Genbuilder kit, the positive rates of these two kits were similar. Importantly, more than 200 genes were successfully cloned into different vectors using the eClone kit, as reported by some other research groups. Taken together, these results suggested the commercial potential of this cloning kit.

Keywords: eClone kit, homologous sequence, DNA cloning, pET-28a(+), cloning efficiency.

^{*} Author for correspondence: Tel: 0937750861; Email: ntmtrinh@hcmus.edu.vn