

## ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP THỂ MỠ ĐỂ CHUYỂN NẠP GIEN VÀO TẾ BÀO CỦA LOÀI VI TẢO LAM *SPIRULINA PLATENSIS*

NGÔ HOÀI THU, ĐẶNG ĐIỂM HỒNG

*Viện Công nghệ sinh học*

SEI-ICHI AIBA, YOSHIKAZU KAWATA

*Viện nghiên cứu Khoa học và Công nghệ tiên tiến, Osaka, Nhật Bản*

*Spirulina platensis* là một trong các loài vi tảo lam có tính thương mại cao. Hàng năm, sản lượng nuôi trồng và thu hoạch của loài vi tảo lam này trên toàn thế giới đạt khoảng 3000 tấn/năm. Việc phân tích thành phần dinh dưỡng của *S. platensis* cho thấy hàm lượng protein chiếm khoảng 50-70%, lipit chiếm 16%, hydratcacbon chiếm khoảng 15% trọng lượng khô của tế bào [2]. *S. platensis* còn là nguồn cung cấp các vitamin, trong đó chủ yếu là vitamin B [1]. Vì thế, *S. platensis* đã được dùng làm thực phẩm chức năng cho con người và động vật. Ngoài ra, *S. platensis* còn được dùng để cung cấp một số hợp chất có hoạt tính sinh học như phycoxianin, các axit béo không bão hòa cần thiết cho cơ thể như axit linolenic (C18:2) và axit  $\gamma$ -linolenic (axit 6, 9, 12-octadecatrienoic-C18:3). Với tiềm năng ứng dụng như trên thì việc mở rộng khả năng ứng dụng *S. platensis* trong các lĩnh vực như xử lý môi trường, cung cấp các hoạt chất sinh học có giá trị như axit  $\gamma$ -linolenic hay chất dẻo sinh học (bioplastic) là điều khả thi. Hiện nay, kỹ thuật ADN tái tổ hợp là phương pháp chính trong việc nâng cao khả năng tổng hợp của các chất có hoạt tính sinh học này. Để chuyển nạp các gen đó vào tế bào của *S. platensis*, người ta mới chỉ sử dụng phương pháp biến nạp bằng xung điện, tuy nhiên phương pháp này vẫn còn nhiều hạn chế như gây độc cho tế bào, khả năng sinh sản của tế bào sau đó là thấp do màng tế bào bị tổn thương, không thuận tiện và kém hiệu quả [8, 9].

Hiện nay, có một số phương pháp chuyển nạp đã được áp dụng rộng rãi như: DEAE dextran, photphát canxi, vi tiêm, xung điện, lipofection-liposome hay thể mỡ.... Trong đó,

chuyển nạp bằng xung điện [3] và thể mỡ cho hiệu quả cao nhất. Phương pháp thể mỡ đã được sử dụng rộng rãi cho sự chuyển nạp; nhưng nó mới được áp dụng chủ yếu cho các tế bào động vật, các tế bào trần. Phương pháp này cho hiệu quả và an toàn hơn so với phương pháp biến nạp truyền thống- phương pháp xung điện [5]. Trong phương pháp thể mỡ, có sử dụng DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-metylsunphát trimetylammonium) thể mỡ được gắn trên bề mặt plasmit, do tích điện âm nên chúng có vai trò hỗ trợ cho việc vận chuyển plasmit vào tế bào thông qua các lỗ trên bề mặt của màng tế bào. Chính vì vậy, nó ít ảnh hưởng đến cấu trúc của màng tế bào.

Gần đây, chúng tôi đã phát hiện thấy có thể sử dụng phương pháp này đối với tế bào *Escherichia coli* [4, 5]. Khi so sánh hiệu suất chuyển nạp ở tế bào *E. coli* cho thấy phương pháp thể mỡ có hiệu suất chuyển nạp cao hơn gấp 10 lần so với phương pháp xung điện [5, 6]. *S. platensis* lại có cấu trúc của màng tế bào cũng gần tương tự như *E. coli*, đều là sinh vật chưa có nhân chuẩn, do vậy chúng tôi đã áp dụng phương pháp thể mỡ trên đối tượng *S. platensis*. Vectơ pHSG397- được thiết kế dựa trên vectơ gốc pBR322 và pUC18-/pUC19 [7], có kích thước tương ứng khoảng 2,2 kb, là vectơ tách dòng: có gen chỉ thị-*cat* (chloramphenicol axetyltransferaza) kháng chất kháng sinh chloramphenicol (Cm), vùng đa nối tách dòng chứa các điểm cắt của các enzym cắt giới hạn, có khả năng nhân đôi hoàn toàn độc lập, không phụ thuộc vào quá trình nhân đôi của vi khuẩn *E. coli* cũng như của tế bào *S. platensis*, đã được chúng tôi sử dụng.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả bước đầu về ứng dụng phương pháp thể mỡ để chuyển nạp gen vào tế bào của *S. platensis*, đồng thời so sánh với phương pháp chuyển nạp truyền thống bằng xung điện thông qua hiệu suất chuyển nạp.

## I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu

- Véc tơ pHSG397 do hãng TaKaRa (Nhật Bản) cung cấp, có chứa gen chỉ thị *cat*, kháng chất kháng sinh chloramphenicol (Cm). Véc tơ pHSG397 được cắt mở vòng nhờ enzym cắt giới hạn là *EcoRI*, có ký hiệu là pHSG397/*EcoRI*.

- Hai chủng vi tảo lam *Spirulina platensis* C1 do Viện Bảo tồn giống Pasteur cung cấp và *S. platensis* VN1 do phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

- Hoá chất dùng cho việc biến nạp bằng phương pháp thể mỡ do hãng Roche cung cấp. DOTAP (N-[1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl]-N, N, N-metylsunphát trimetylammonium) thể mỡ (Roche, Basel, Switzerland 1,0 µg/µl).

- Cặp mồi nhân gen *cat* với kích thước tương ứng khoảng 700 bp, có trình tự nucleotit như sau:

CT-a: accaccttgatatacca

CT-2b: tgtccacgactacggcgac

### 2. Phương pháp

a. *Tạo tế bào Spirulina platensis khả biến theo phương pháp của Toyomizu M. và cs. [8]*

Tế bào *S. platensis* được nuôi lác trên môi trường SOT (150 vòng/phút), ở nhiệt độ 28-30°C, với ánh sáng 1500 lux, cho đến khi OD<sub>600</sub> đạt 0,5-0,8. Vì *S. platensis* là loài tảo lam đa bào, có dạng sợi và màng tế bào không có xenluloza, nên để thu được dịch đồng thể của từng tế bào một, chúng tôi đã sử dụng máy cắt sợi tảo thành từng phần nhỏ hơn hoặc là tế bào (US-300, Nippon Seki Co., Tokyo, Japan, ở điều kiện 50W trong 30 giây). Ly tâm 6000 v/p trong 10 phút để thu sinh khối của tế bào. Sau đó, tế bào tảo được hoà tan trở lại trong 10 ml môi trường SOT, được nuôi tĩnh trong khoảng thời gian 12 giờ, ở nhiệt độ phòng (28°-30°C) và với ánh sáng yếu. Sau đó, lại ly tâm 8000 v/p trong 3 phút, ở

4°C để thu sinh khối của tảo. Rửa tế bào thu được 2 lần bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng, hoà tan tế bào tảo bằng 1 ml dung dịch HEPES (1 mM, pH = 7) sao cho mật độ tế bào đạt khoảng  $3,75 \times 10^8$  đến  $5 \times 10^8$  tế bào/ml [9]. Dịch tế bào khả biến được giữ trên đá cho đến khi sử dụng (trong vòng 24 giờ).

Phản ứng nối ghép gen: trộn 5 µl véc tơ pHSG397 hoặc véc tơ pHSG397/*EcoRI* (200 ng/µl) và 8 µl DOTAP (1 µg/µl) với nhau, theo tỉ lệ về hàm lượng ADN là 1: 8. Sau đó, phản ứng được ủ ở 25°C trong 5 phút.

b. *Biến nạp gen vào tế bào S. platensis bằng phương pháp thể mỡ*

Bổ sung 1 µg véc tơ vào 50 µl tế bào *S. platensis* khả biến, đặt trên đá khoảng 5 phút. Sau đó bổ sung 1 ml môi trường SOT, nuôi dịch trên ở 25°C trong 1 giờ, không lắc. Các tế bào *S. platensis* tái tổ hợp sẽ được sàng lọc trên môi trường rắn và lỏng có bổ sung chất kháng sinh Cm ở các nồng độ tương ứng là: 0, 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 và 10 µg/ml. Sau 3 tuần nuôi cấy, các thể *S. platensis* tái tổ hợp có thể quan sát và thu nhận được.

c. *Biến nạp gen vào tế bào S. platensis bằng phương pháp xung điện*

Bổ sung 1 µg véc tơ pHSG397 hoặc véc tơ pHSG397/*EcoRI* (200ng/ml) vào 50 µl tế bào *S. platensis* khả biến. Giữ dịch trên đá khoảng 5-10 phút, sau đó chuyển dịch vào cuvet đã được giữ trong lạnh (có khoảng cách giữa 2 điện cực là 2 mm). Biến nạp bằng xung điện ở điều kiện 200 Ω, 25 µF, 4 kV/cm trong thời gian từ 4-5 mini giây. Sau khi biến nạp, dịch *S. platensis* tái tổ hợp được giữ trên đá 2 phút và bổ sung 1 ml môi trường SOT. Tiếp tục nuôi dịch trên ở điều kiện 25°C trong 1 giờ. Sau đó, cấy trải dịch thu được trên môi trường rắn và nuôi trên môi trường lỏng có bổ sung Cm với các nồng độ tương ứng từ 0-10 µg/ml.

- Tạo các dòng không chuyển động trên môi trường thạch: bổ sung SDS (sodium dodecyl sulphate) với các nồng độ khác nhau từ 0,001% đến 1,0% vào môi trường nuôi cấy tảo *S. platensis*. Sau 7 ngày nuôi cấy ở 150 lux và 30°C, nồng độ SDS mà ở đó *S. platensis* có khả năng sống sót cao nhất sẽ được xác định dựa trên giá

trị OD<sub>600</sub>. Tiếp theo, nồng độ SDS tương ứng đó được dùng để bổ sung vào môi trường rắn (1,2% thạch) và tiếp tục nuôi cấy trong 10-15 ngày.

Trong bài báo này, chúng tôi đã sử dụng cả 2 phương pháp biến nạp nêu trên với 2 chủng tảo lam *S. platensis* C1 và VN1. Hiệu quả

chuyển nạp của 2 phương pháp này được đánh giá thông qua hiệu suất chuyển nạp và nồng độ chất kháng sinh Cm cao nhất mà ở đó tế bào *S. platensis* tái tổ hợp sống sót nhiều nhất. Các công thức thí nghiệm được sử dụng trong bài báo này được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1

Các công thức thí nghiệm được sử dụng trong bài báo

Ký hiệu mẫu	Tên mẫu	<i>S. platensis</i>	pHSG397	pHSG397/ <i>EcoRI</i>	DOTAP thể mỡ
1	ĐC âm	+			
2	ĐC âm	+			+
3	ĐC âm	+	+		
4	Mẫu thử nghiệm	+	+		+
5	Mẫu thử nghiệm	+		+	+

Ghi chú: ĐC. đối chứng.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Sàng lọc các tế bào *S. platensis* tái tổ hợp trên môi trường lỏng

*S. platensis* có cấu tạo dạng sợi, xoắn và có khả năng di chuyển trong môi trường lỏng cũng như trên môi trường rắn. Vì vậy, khi chuyển gen vào *S. platensis*, chúng tôi đã gặp khó khăn khi cần xác định các dòng mang gen tái tổ hợp. Do đó, trước khi chuyển gen vào *S. platensis*, chúng tôi cần phải sàng lọc được các chủng có khả năng tạo dòng không chuyển động trên bề mặt thạch nhờ sử dụng SDS. SDS là chất tẩy rửa, có vai trò phá vỡ màng tế bào; song, ở những nồng độ nhất định, chúng lại có vai trò ngăn cản sự chuyển động của các tế bào *S. platensis*. Để kiểm tra khả năng sống sót của hai chủng C1 và VN1 ở các nồng độ SDS khác nhau, dải nồng độ từ 0,001% đến 1% đã được sử dụng. Kết quả thu được cho thấy, *S. platensis* có khả năng sống sót cao nhất ở nồng độ SDS 0,002% (kết quả không chỉ ra ở đây). Ở nồng độ này, chỉ có chủng *S. platensis* C1 là có khả năng tạo được các dòng cố định trên bề mặt thạch, sau 10-15 ngày nuôi cấy.

### 2. Chuyển nạp gen ở *S. platensis*

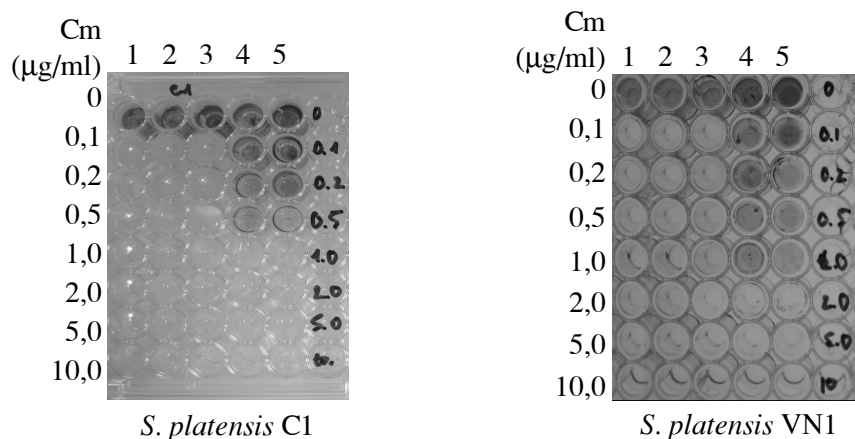
Với mô hình thí nghiệm như đã nêu trên, chúng tôi đã tiến hành biến nạp vectơ pHSG397

và pHSG397 đã được mở vòng bằng *EcoRI* (pHSG397/*EcoRI*) vào tế bào của hai chủng *S. platensis* C1 và VN1 theo phương pháp thể mỡ. Kết quả sau một tháng chuyển nạp, chúng tôi nhận thấy ở các mẫu đối chứng âm, các tế bào *S. platensis* tái tổ hợp không có khả năng sống sót trên môi trường có bổ sung Cm. Điều này chứng tỏ trong tế bào của *S. platensis* không chứa gen kháng Cm vì vectơ pHSG397 đã không được chuyển vào tế bào của *S. platensis* do không có sự hỗ trợ của DOTAP thể mỡ. Đối với các mẫu thử nghiệm (bảng 1), các tế bào *S. platensis* C1 và VN1 tái tổ hợp có khả năng sống sót được trên môi trường SOT có bổ sung Cm với nồng độ từ 0,1 đến 0,5 µg/ml và từ 0,1 đến 1,0 µg/ml, tương ứng. Kết quả này đã cho thấy vectơ pHSG397 có thể đã được chuyển nạp vào tế bào *S. platensis* với sự hỗ trợ của DOTAP thể mỡ. Kết quả thu được được chỉ ra ở hình 1.

Với các tế bào *S. platensis* C1 và VN1 tái tổ hợp sống sót ở nồng độ Cm 0,5 µg/ml, chúng tôi đã tiến hành cố định các dòng tế bào *S. platensis* tái tổ hợp trên môi trường rắn với sự có mặt của 0,002% SDS. Sau 4 tuần nuôi cấy, chúng tôi chỉ nhận được các dòng tái tổ hợp cố định của chủng C1 trên môi trường thạch. Còn với các tế bào của chủng VN1 tái tổ hợp mặc dù có khả năng sống sót trên môi trường chọn lọc có nồng độ Cm 0,5 µg/ml nhưng chúng lại không tạo

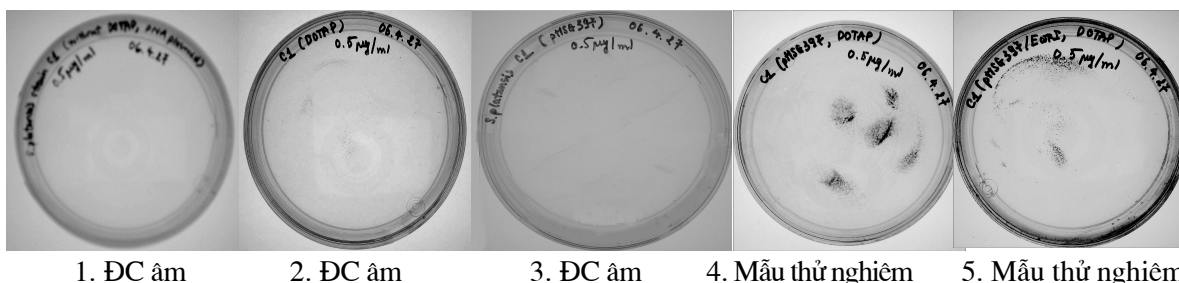
được các dòng cố định trên bề mặt thạch. Do vậy, việc xác định các dòng tế bào có mang gen tái tổ hợp sẽ rất khó khăn. Kết quả thu được được chỉ ra ở hình 2, cho thấy ở nồng độ

0,5µg/ml Cm, sau một tháng chuyển nạp, các đĩa petri thứ 4 và thứ 5 trên bề mặt đĩa có xuất hiện các dòng *S. platensis* tái tổ hợp cố định và có màu xanh.



**Hình 1.** Tế bào *S. platensis* C1 và *S. platensis* VN1 tái tổ hợp sau một tháng chuyển nạp ở các nồng độ Cm khác nhau

1. tế bào *Spirulina platensis*.....ĐC âm
2. tế bào *S. platensis* + DOTAP thể mỡ.....ĐC âm
3. tế bào *S. platensis* + vectơ pHSG397.....ĐC âm
4. tế bào *S. platensis* + vectơ pHSG397 ..... + DOTAP thể mỡ.....Mẫu thử nghiệm
5. tế bào *S. platensis* + vectơ pHSG397/*EcoRI* + DOTAP thể mỡ..... .Mẫu thử nghiệm

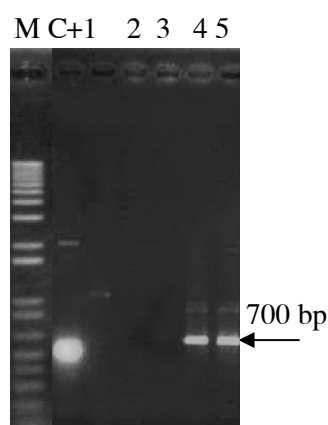


**Hình 2.** Tế bào của chủng *S. platensis* C1 tái tổ hợp tạo dòng cố định trên bề mặt thạch với nồng độ 0,5 µg/ml Cm sau một tháng chuyển nạp

Để khẳng định một cách chính xác hơn nữa vectơ pHSG397 đã được chuyển nạp vào tế bào của *S. platensis* hay không, chúng tôi đã tiến hành phân tích ở mức độ ADN của các dòng tái tổ hợp thu được ở hình 2. Vì trong cấu trúc của vectơ pHSG397 có chứa gen chỉ thị - *cat*, có vai trò kháng Cm nên chúng tôi đã kiểm tra sự có mặt của vectơ này trong tế bào *S. platensis* tái tổ hợp nhờ vào sự có mặt của gen *cat*. Kết quả, với cặp mồi CT-a và CT-2b, chúng tôi đã khuếch đại được gen *cat* của vectơ pHSG397 trong các

tế bào *S. platensis* tái tổ hợp với kích thước của gen khoảng 700 bp (hình 3).

Kết quả ở hình 3 cho thấy, ở các công thức đối chứng âm (các giếng 1, 2 và 3) đã không thu được băng có kích thước 700 bp. Trong khi đó băng này đã thu được ở các công thức mẫu thử nghiệm (các giếng 4 và 5). Điều này đã góp phần khẳng định vectơ pHSG397 đã được chuyển nạp vào tế bào của *S. platensis* với sự hỗ trợ của DOTAP thể mỡ.



**Hình 3.** Kết quả phân tích gen *cat* trong các tế bào vi tảo lam tái tổ hợp

*Ghi chú:* **giếng M.** Chỉ thị phân tử 1 Kb Plus DNA Ladder; **giếng C+.** gen *cat* trong vectơ pHSG397; **các giếng 1, 2, 3, 4, 5.** gen *cat* trong các tế bào *S. platensis* tái tổ hợp sau 1 tháng chuyển nạp tương ứng với các công thức thí nghiệm ở bảng 1.

Khi so sánh hiệu suất chuyển nạp của hai phương pháp thể mỡ và xung điện, chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp thể mỡ có hiệu quả

chuyển nạp cao hơn gấp 4 lần so với phương pháp xung điện thông thường khi vectơ pHSG397 không được cắt mở vòng ( $3,00.10^3/7,45.10^2$ ). Còn khi vectơ này được cắt và mở vòng bằng *EcoRI* thì hiệu suất chuyển nạp của phương pháp thể mỡ so với phương pháp xung điện là 15 lần ( $4,50.10^4/2,98.10^3$ ). Kết quả về hiệu suất chuyển nạp được chỉ ra ở bảng 2. Ngoài ra, ở bảng 2, cũng cho thấy khi vectơ pHSG397 được mở vòng bằng enzym *EcoRI* thì hiệu suất chuyển nạp đạt được cao hơn so với vectơ cùng loại nhưng không được mở vòng là 15 lần ( $4,50.10^4/3,00.10^3$ ) ngay khi sử dụng trên cùng một phương pháp thể mỡ. Như vậy, so với phương pháp chuyển nạp bằng xung điện thì hiệu suất chuyển nạp bằng phương pháp thể mỡ sẽ đạt cao gấp từ 4 đến 15 lần tương ứng khi vectơ chuyển nạp không được mở vòng và mở vòng. Kết quả này đã cho thấy khả năng ứng dụng của phương pháp thể mỡ trong việc chuyển nạp gen vào tế bào của *S. platensis* một cách có hiệu quả hơn so với phương pháp truyền thống - phương pháp xung điện.

Bảng 2

**So sánh hiệu suất chuyển nạp giữa phương pháp thể mỡ và phương pháp xung điện**

Plasmit	Phương pháp	Hiệu suất chuyển nạp (Số khuẩn lạc)/ $\mu\text{g}$ DNA
Vectơ pHSG397	Thể mỡ	$3,00.10^3$
	Xung điện	$7,45.10^2$
Vectơ pHSG397/ <i>EcoRI</i>	Thể mỡ	$4,50.10^4$
	Xung điện	$2,98.10^3$

### III. KẾT LUẬN

1. Đã chuyển nạp thành công vectơ pHSG397 vào tế bào của chủng *S. platensis* C1 và chủng *S. platensis* VN1 bằng phương pháp thể mỡ.

2. Hiệu suất chuyển nạp của phương pháp thể mỡ cao gấp 4 đến 15 lần so với phương pháp chuyển nạp bằng xung điện tương ứng khi vectơ chuyển nạp không được mở vòng và mở vòng.

Các kết quả thu được trong bài báo này cho thấy khả năng áp dụng có hiệu quả phương pháp chuyển nạp thể mỡ so với phương pháp xung điện theo định hướng sử dụng các kỹ thuật ADN

tái tổ hợp để tạo ra các chủng *S. platensis* tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp một số chất có hoạt tính sinh học cao như các axit béo không bão hoà hay các chất dẻo sinh học.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Đình Kim, Đặng Hoàng Phước Hiền,** 1999: Công nghệ sinh học vi tảo. Nxb. Nông nghiệp.
- Nguyễn Đức Lượng,** 2002: Công nghệ vi sinh, Vi sinh vật học công nghiệp. Nxb. Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 2: 119-133.

3. **Hanahan D.**, 1983: J. Mol. Biol., 166: 577-580.
4. **Inoue H. et al.**, 1990: Gene, 96: 23-28.
5. **Kawata Y. et al.**, 2003: Biosci. Biotechnol. Biochem., **67** (5): 1179-1181.
6. **Kawata Y. et al.**, 2004: Marine Biotechnol., 6: 355-363.
7. **Takeshita S. et al.**, 1987: Gene, 61: 63-74.
8. **Thiel and Poo H.**, 1989: Journal of Bacteriology: 5743-5746.
9. **Toyomizu M. et al.**, 2001: Journal of Applied Phycology, 13: 209-214.

**APPLICATION OF THE LIPOFECTION METHOD  
TO TRANSFORM GENE INTO THE CELLS OF  
THE CYANOBACTERIUM - SPECIES *SPIRULINA PLATENSIS***

NGO THI HOAI THU, DANG DIEM HONG,  
SEI-ICHI AIBA, YOSHIKAZU KAWATA

**SUMMARY**

*Spirulina platensis* was a commercially cultured cyanobacterium species, having biomass up to 3.000 tons in a year and used as health food and animal feed. If we could draw its potential, we could apply *S. platensis* to solve environment problems. *S. platensis* produced valuable materials such as  $\gamma$ -linolenic acid, bioplastic etc. To increase the content of these materials, the recombinant DNA technique was most important, but its application has just been started. At present, to transform gene into *Spirulina* cells, only the electroporation method was applied for this purpose.

The lipofection method was used widely for transfection. It had advantages for its convenience, efficiency and safety but its application was limited to culture mammalian cells. Recently, we found *E. coli* and *S. platensis* could be transformed by lipofection method.

We investigated conditions to transform *S. platensis* with DOTAP liposomal transfection reagents. We used the pHSG397 vector with *cat* to transform *S. platensis*. The transformed *Spirulina* cells could survive in the condition of chloramphenicol concentration more than 0.5  $\mu\text{g/ml}$  for 4 weeks. The transformation efficiency of the lipofection method was 4 - 15 times better in comparison with the electroporation method, dependently on applied vectors (such as close or open vector cutted used by the enzyme *EcoRI*).

*Ngày nhận bài: 16-8-2006*