

**PHÂN TÍCH KARYOTYPE CỦA LOÀI VI TẢO *Schizochytrium mangrovei*
PQ6 SỬ DỤNG KỸ THUẬT NHUỘM DAPI (4', 6-DIAMIDINO-2-PHENYLIDOLE)
VÀ ĐIỆN DI XUNG ĐIỆN TRƯỜNG (PFGE)**

**Hoàng Thị Lan Anh¹, Ngô Thị Hoài Thu¹, Trần Huy Hoàng², ZhiGang Zhou³,
Trần Quế⁴, Chu Hoàng Hà¹, Trương Nam Hải¹, Đặng Diễm Hồng^{1*}**

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *ddhong60vn@yahoo.com

²Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

³Trường Cao đẳng Khoa học và Công nghệ Thủy sản, Đại học Hải dương Thượng Hải, Trung Quốc

⁴Viện nghiên cứu Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

TÓM TẮT: *Schizochytrium mangrovei* PQ6 là loài vi tảo biển dị dưỡng của Việt Nam, có nhiều đặc điểm quý, bao gồm khả năng đáp ứng với sự thay đổi của điều kiện môi trường nuôi, năng suất sinh khối cao (30-40 g sinh khối khô/L), hàm lượng lipid lớn (đến 70% sinh khối khô), và giàu các acid béo không bão hòa đa nối đôi (như acid docosahexaenoic - DHA, C22:6 n-3; eicosapentaenoic - EPA, C20:5 n-3; docosapentaenoic - DPA, C22:5 n-6). Sinh khối của loài tảo này đã được nghiên cứu để sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, thực phẩm chức năng, sản xuất biodiesel và một số các hợp chất có hoạt tính sinh học (acid béo không bão hòa đa nối đôi, squalene...). Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có bất cứ một công bố nào đề cập tới việc phân tích karyotype của loài vi tảo này cũng như các loài khác thuộc chi *Schizochytrium*. Trong bài báo này, chúng tôi đã sử dụng colchicine để ngừng chu kỳ tế bào tảo ở metaphase. Sau đó, tế bào tảo được xử lý bằng các enzyme làm mềm thành tế bào, nhiễm sắc thể được nhuộm với DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Các kết quả thu được cho thấy, chủng PQ6 có 3 nhiễm sắc thể. Mặt khác, 4 băng tương ứng với 4 nhiễm sắc thể đã được phân tách bởi điện di xung điện trường. Sự khác biệt về số lượng nhiễm sắc thể này được chúng tôi giả thiết rằng có thể loài vi tảo này có tồn tại plasmid. Vì vậy, trong thời gian tới, các nghiên cứu khác cần được tiến hành nhằm khẳng định các kết quả đã thu được. Mặc dù vậy, nghiên cứu này đã cung cấp những bằng chứng đầu tiên về karyotype và cung cấp cơ sở đầu tiên cho việc sắp xếp, chú giải hệ gen của loài vi tảo này.

Từ khóa: *Schizochytrium mangrovei* PQ6, DAPI, karyotype, metaphase, PFGE

MỞ ĐẦU

Phân tích nhiễm sắc thể là một trong những yêu cầu tiên quyết của các nghiên cứu về di truyền và chọn giống. Trong một thời gian dài, việc phân tích tế bào học của tảo bị giới hạn một phần do nhiễm sắc thể tảo có kích thước nhỏ, đồng dạng và số lượng nhiều. Trong các nghiên cứu trước đây, aceto-iron-haematoxylin, aceto-iron-carbol fuchsin, haematoxylin-chloral hydrate, iron alum aceto-carmin và haematoxylin là các loại thuốc nhuộm và xử lý thành tế bào tảo bằng acid thường được sử dụng trong quy trình xử lý tiêu bản để phân tích nhiễm sắc thể ở chi tảo lớn như *Porphyra*, *Laminaria*, *Undaria* [3, 7, 13, 21, 23, 24]. Tuy nhiên, nhược điểm khi sử dụng các phương pháp này là sự bắt màu với thuốc nhuộm yếu, mức độ tương phản giữa nhân và tế bào chất thấp, quy trình phức tạp.

Khác với các loại thuốc nhuộm nói trên, sự tương tác của 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) với DNA và polydeoxynucleotide đã được nghiên cứu ngay khi chất này được Dann et al. (1971) [5] tổng hợp nhân tạo. Hiện nay, DAPI được coi là chất gắn đặc hiệu DNA ở vùng giàu A-T, tạo thành phức hợp huỳnh quang. Khi phức hợp này được kích thích bằng ánh sáng UV có bước sóng 365 nm, phức hợp DNA-DAPI phát huỳnh quang ánh sáng xanh ở bước sóng 390 nm hoặc lớn hơn. Còn các phần không liên kết với DAPI hoặc liên kết yếu có thể phát ánh sáng màu vàng yếu. Vì vậy, DAPI được sử dụng như một đầu dò hóa học để xác định hàm lượng DNA ở tảo [2, 14]. Bên cạnh đó, cũng có một số công bố đã sử dụng chất này để quan sát nhiễm sắc thể của tảo [15, 18, 22].

Điện di xung điện trường (Pulsed-field gel electrophoresis-PFGE) được xem là phương

pháp hiệu quả trong việc phân tách nhiễm sắc thể và xác định kích thước hệ gen. Nó cũng được coi là công cụ quan trọng trong các nghiên cứu về di truyền và phân tử, đặc biệt ở những sinh vật nhân chuẩn bậc thấp [4]. Trên tảo, kỹ thuật PFGE đã được áp dụng thành công để phân tách nhiễm sắc thể ở các chi *Thraustochytrium* [1], *Pavlova*, *Diacronema* (Haptophyta) [17]. Các gen mã hóa cho các enzyme chính của quá trình tổng hợp axit béo có thể được nhận dạng từ các nhiễm sắc thể được phân tách bằng phương pháp PFGE.

Các chi vi tảo được phân tích karyotype cho đến nay hầu hết thuộc về nhóm tảo lớn (macroalgae/seaweed). Mặc dù các nghiên cứu trên nhóm vi tảo lại rất hạn chế, phải kể đến công bố của Dzhambazov et al. (2003) [6] và Muravenko et al. (2001) [16] ở một số loài thuộc chi *Scenedesmus*, *Cyanidium* và *Galdieria*.

Chi *Schizochytrium* được xếp vào giới Chromista, ngành Labyrinthulomycota (Heterokontophyta), lớp Labyrinthulea, bộ Labyrinthulida, họ Thraustochytridae. Các loài thuộc chi này là những sinh vật có kiểu sống dị dưỡng và được phân lập từ nhiều vùng sinh thái khác nhau: vùng cửa sông, đáy biển sâu hoặc những nơi nước đọng [20]. Hàm lượng lipid (có thể chiếm trên 77% sinh khối khô- SKK) và hàm lượng acid béo không bão hòa đa nối đôi (polyunsaturated fatty acids-PUFA) đặc biệt là DHA (acid docosahexaenoic; C22:6 ω -3) cao (chiếm trên 50% so với acid béo tổng số) nên đây là một trong những nguồn sản xuất DHA đầy triển vọng. Cho đến nay, sinh khối vi tảo này đã được sử dụng làm thức ăn cho động vật, thực phẩm chức năng cho người và làm nguyên liệu sản xuất nhiều chất có hoạt tính sinh học có giá trị (ω -3 PUFA, squalene, polysaccharide và các enzyme ngoại bào) [8, 19].

Schizochytrium mangrovei PQ6 được phân lập ở huyện đảo Phú Quốc, Kiên Giang từ 2006-2008. Chủng tảo này có khả năng sinh trưởng và phát triển trong một biên độ rộng về nhiệt độ, độ mặn và pH. Dưới điều kiện nuôi cấy tối ưu, chủng này có khả năng sản xuất 40 g sinh khối khô/L, hàm lượng lipid tổng số chiếm trên 70% khối lượng khô và DHA chiếm đến 40% so với

tổng số acid béo. Ở Việt Nam, sinh khối tảo này đã được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, sản xuất thực phẩm chức năng và biodiesel [10, 11, 12]. Hiện nay, chủng PQ6 đang được giải mã toàn bộ hệ gen. Mặc dù vậy, cũng như nhiều loài vi tảo biển khác thuộc chi *Schizochytrium*, cho đến nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam vẫn chưa có bất kỳ một công bố nào đề cập đến việc phân tích karyotype của loài *S. mangrovei*. Trong bài báo này chúng tôi đưa ra những kết quả ban đầu về việc xác định karyotype của chủng PQ6 dựa trên việc quan sát tiêu bản nhiễm sắc thể ở metaphase và kỹ thuật PFGE được sử dụng để xác định số lượng nhiễm sắc thể. Các kết quả thu được có thể sẽ giúp ích cho việc sắp xếp và chú giải hệ gen của loài vi tảo này trong thời gian tới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng tảo và điều kiện nuôi cấy

Chủng *S. mangrovei* PQ6 được phân lập thành công từ huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang từ 2006-2008 do phòng Công nghệ Tảo (Viện Công nghệ sinh học) cung cấp. Tảo được giữ trên đĩa môi trường GPY theo công bố của Hong et al. (2011) [11]. Một khuẩn lạc sạch trên đĩa môi trường GPY được lấy ra và cấy vào bình tam giác 250 mL chứa 150 mL môi trường M1 gồm 3% glucose, 1% cao nấm men và 17,5 g/L muối biển nhân tạo (có hàm lượng NaCl là 1,5%). Bình nuôi tảo được lắc ở nhiệt độ 28°C, tốc độ 200 vòng/phút (v/p).

Chuẩn bị tiêu bản nhiễm sắc thể

Quy trình chuẩn bị nhiễm sắc thể của chủng PQ6 được tiến hành theo mô tả của Liu et al. (2012) [15] có một số cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm Việt Nam. Hút 0,5 mL dịch nuôi tảo cho vào ống eppendorf 1,5 mL. Ly tâm thu sinh khối ở 12.000 v/p trong 30 giây và rửa nước cất 2 lần. Hòa tan tế bào trong 400 mL dung dịch colchicine 0,1%, để yên ở 16°C trong 1 giờ. Sau đó, ly tâm ở 12.000 v/p trong 2 phút và loại dịch trên, thu cặn tế bào và rửa lại bằng nước cất. Bổ sung 1 mL dung dịch Cannoy (100% ethanol: acid acetic, 3:1, v/v), mix đều mẫu và giữ ở 4°C trong 48 h. Ly tâm thu cặn ở 12.000 v/p trong 1 phút, cặn được rửa lại bằng nước cất 2 lần. Cặn tế bào được bổ

sung hỗn hợp enzyme gồm cellulase: macerozyme R-10 và pectinase (2:1:2, v/v/v) và ủ mẫu ở 37°C trong 24 giờ. Bổ sung thêm 70% ethanol lên 1,5 mL, mix đều và ly tâm ở 12.000 v/p trong 2 phút. Lặp lại bước rửa bằng 70% ethanol thêm 2 lần. Loại bỏ hết ethanol, bổ sung 50 µL acid acetic 100% và mix đều mẫu. Dùng pipet hút khoảng 20 µL mẫu nhỏ lên lam kính sạch từ độ cao khoảng 30 cm nhằm cho mẫu dàn trải đều thành một lớp mỏng trên lam kính, đợi cho đến khi tiêu bản khô. Nhỏ 1 giọt thuốc nhuộm DAPI lên bề mặt mẫu, ủ tối khoảng 2-5 phút, đặt lam lên trên và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Leica DM4000 B Led (Đức) với bước sóng kích thích 360 nm sử dụng vật kính 100 X. Chiều dài của nhiễm sắc thể được tính toán dựa vào phần mềm Adobe Photoshop CS6 Extended.

Tách chiết DNA nhiễm sắc thể toàn vẹn

DNA nhiễm sắc thể toàn vẹn được thực hiện theo mô tả của Anbu et al. (2007) [1] với một số thay đổi để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm Việt Nam. Sau khi nuôi cấy, các tế bào được ly tâm thu sinh khối ở 12.000 v/p trong 2 phút. Sinh khối tảo sau đó được rửa 2 lần với 500 µL EDTA 0,05M và ly tâm ở 12.000 v/p trong 2 phút để thu tế bào. Lượng sinh khối tảo được sử dụng với khối lượng khác nhau từ 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 và 7,0 mg. Đối với mỗi ống eppendorf chứa lượng sinh khối tảo khác nhau được bổ sung thêm 100 µL dung dịch SLB (3 mg/L lyticase; 5% β-mercaptoethanol; 1M sorbitol; 0,1 M sodium citrate; 0,05 M EDTA-pH 8,0) và 200 µL EDTA 0,05M. Hỗn hợp này sau đó được trộn đều với một lượng thể tích tương đương 1% SeaKem Gold Agarose (dùng cho PFGE, Mỹ) pha trong đệm TE ở 55°C và nhỏ vào các plug. Các plug được để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau khi đông hoàn toàn, các plug được chuyển vào các ống eppendorf 2,0 mL. Các ống này được bổ sung thêm 1 mL dung dịch phủ trên (0,45 M Tris buffer pH 8,0; 0,05M EDTA; 5% β-mercaptoethanol) và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi ủ, nhẹ nhàng đổ lớp dịch phía trên và rửa plug bằng 1 mL đệm TE 1X ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục bổ sung 1 mL dung dịch PR (0,4M EDTA; 1% sarkosyl; 1 mg/mL proteinase K;

1 mg/mL RNase A), ủ ở 37°C trong 15 phút. Sau đó loại bỏ dung dịch PR. Lặp lại bước rửa ở trên thêm 2 lần nữa. Cuối cùng, bổ sung 1 mL đệm TE vào ống chứa plug và bảo quản ở 4°C.

Điều kiện chạy điện di PFGE

Khuôn điện di được chuẩn bị với 1% SeaKem Gold Agarose pha trong đệm TBE 0,25X. Sau khi bản gel đông hoàn toàn, các plug được cắt với chiều rộng khoảng 2 mm, đặt vào các giếng của bản gel. Quá trình điện di được thực hiện trên hệ thống máy của Biorad (Hoa Kỳ) với điều kiện chạy như sau: thời gian ban đầu (initial time)- 2,2s; thời gian cuối cùng (final time)-54,2 giây; 6 V; góc 120° sử dụng đệm TBE 0,25 X trong 22, 27 và 31 giờ. Sau quá trình điện di, bản gel được nhuộm với ethidium bromide trong 30 phút và rửa bằng nước cất sau khi nhuộm trong 20 phút.

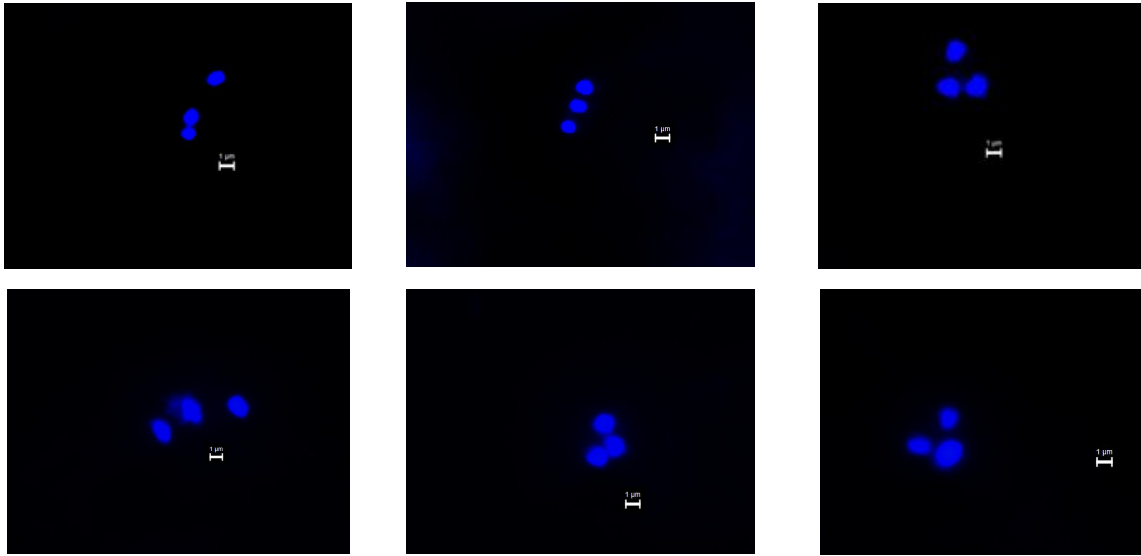
Bản gel sau đó được chụp ảnh bằng máy chụp ảnh gel U: Genius (Anh). Kích thước của một số nhiễm sắc thể nhỏ được tính toán dựa trên kích thước nhiễm sắc thể của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (chủng YPH80, Yeast chromosome PFG Marker, Biorad, Hoa Kỳ).

Hình ảnh điện di chạy PFGE thu được sẽ được phân tích mật độ quang (densitometry) sử dụng phần mềm GelAnalyzer 2010a nhằm khẳng định số băng điện di thu được dựa trên các đỉnh pick xuất hiện; kiểm tra khả năng chồng pick theo phân bố của mật độ hay tương ứng với các băng điện di có sự chồng lên nhau của các nhiễm sắc thể tương đồng hay không. Kết quả thu được sẽ cho biết có hay không sự trùng lặp (hay tương đồng) các băng nhiễm sắc thể.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích karyotype của chủng PQ6 dựa trên tiêu bản nhiễm sắc thể

Kết quả quan sát và phân tích tiêu bản nhiễm sắc thể dưới kính hiển vi huỳnh quang đã cho thấy, số lượng nhiễm sắc thể của *S. mangrovei* PQ6 là n=3 với tần xuất bắt gặp trên 85% so với tổng số các tiêu bản nhiễm sắc thể đã chuẩn bị. Các nhiễm sắc thể của chủng PQ6 dạng chấm (dot-like) có kích thước dao động từ 1,05 đến 1,50 µm, do đó có thể coi là các nhiễm sắc thể có kích thước nhỏ (hình 1).



Hình 1. Nhiễm sắc thể của *S. mangrovei* PQ6 ở metaphase khi được nhuộm với DAPI

Bảng 1. Kích thước các nhiễm sắc thể ở loài vi tảo *Schizochytrium mangrovei* PQ6

Nhiễm sắc thể	Chiều dài nhiễm sắc thể	
	Tuyệt đối (μm) (Absolute length)	Tương đối (% chiều dài tổng số nhiễm sắc thể) (Relative length)
1	$1,50 \pm 0,06$	40,21
2	$1,18 \pm 0,14$	31,64
3	$1,05 \pm 0,18$	28,15

Sự khác biệt về chiều dài tuyệt đối (absolute length) giữa các nhiễm sắc thể không đáng kể, trong khi đó, chiều dài tương đối lại rất khác biệt nên có thể xếp chúng trong cùng một nhóm (bảng 1). Ở đây, chúng tôi không quan sát thấy vị trí tâm động của nhiễm sắc thể. Điều này cũng xảy ra tương tự khi Muravenko et al. (2010) [16] quan sát nhiễm sắc thể của một số loài vi tảo thuộc chi *Galdieria*.

Hình ảnh nhiễm sắc thể của chủng PQ6 thu được rõ ràng, không bị nhiễu đã khẳng định quy trình chuẩn bị tiêu bản nhiễm sắc thể và quá trình nhuộm với DAPI hoàn toàn phù hợp cho việc phân tích karyotype của loài vi tảo này. Việc sử dụng hỗn hợp enzyme cellulase: macerozyme R-10 và pectinase (2:1:2, v/v/v) có tác dụng phá thành tế bào, giúp thuốc nhuộm thấm tốt, vì vậy, việc quan sát và thu nhận hình ảnh sẽ được cải thiện.

Phân tách nhiễm sắc thể của chủng PQ6 bằng PFGE

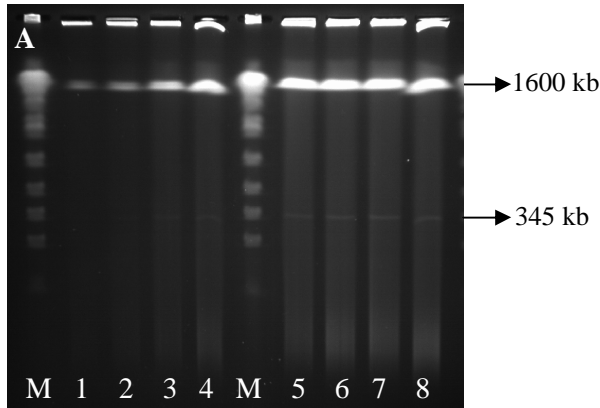
DNA nhiễm sắc thể toàn vẹn được tách chiết từ lượng sinh khối chủng PQ6 khác nhau và được phân tách bằng PFGE. Để tìm được điều kiện phân tách bằng tốt nhất, chúng tôi đã thay đổi thời gian chạy điện di và lượng sinh khối tảo dùng để tách chiết DNA nhiễm sắc thể. Sự phân tách nhiễm sắc thể tốt đã thu được khi sinh khối tế bào tảo tăng ở loài *S. mangrovei* PQ6. Kết quả được chỉ ra trên hình 2A cũng cho thấy, phân tách tốt nhất khi lượng sinh khối tảo sử dụng để tách DNA nhiễm sắc thể trong khoảng từ 4,0-7,0 mg. Khi lượng sinh khối tảo sử dụng dưới 4 mg, băng nhiễm sắc thể nhỏ nhất (có kích thước khoảng 345 kb) không xuất hiện hoặc xuất hiện rất mờ.

Khi tối ưu về thời gian điện di, chúng tôi nhận thấy với 31 giờ (hình 2D) chạy điện di đã cho việc phân tách bằng tốt nhất. Với thời gian điện di dưới 22 giờ (hình 2B) và 27 giờ (hình 2C) chỉ tách được 3/4 băng.

Kết quả nghiên cứu về điều kiện thích hợp

nhất cho chạy PFGE ở chủng PQ6 đã cho thấy các nhiễm sắc thể được phân tách tốt nhất ở điều kiện chạy điện di với thời gian ban đầu (initial time): 2,2s; thời gian cuối cùng 54,2 giây; 6 V; góc 120°, sử dụng 1% SeaKem Gold

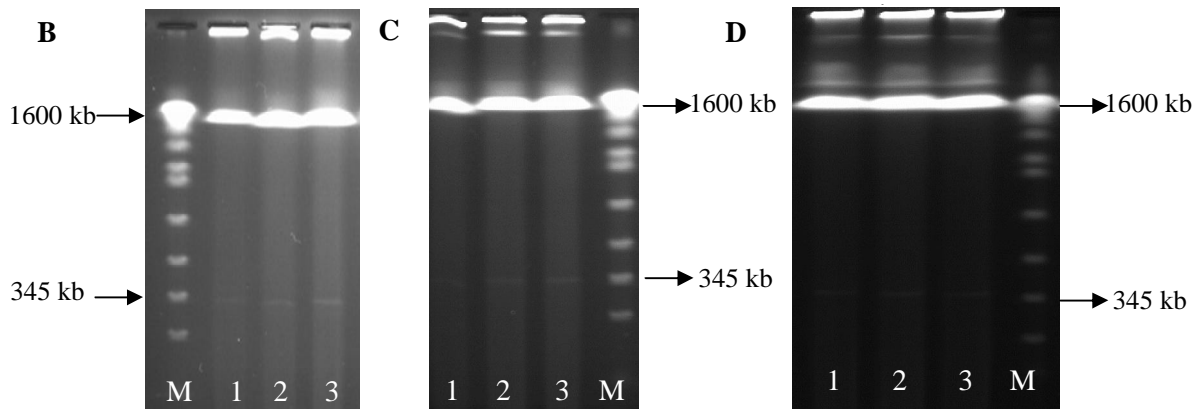
Agarose với đệm TBE 0,25 X trong 31 giờ. Tổng số 4 băng gồm các băng nhiễm sắc thể lớn và nhỏ đều được tách dưới điều kiện này (hình 2D).



Hình 2. Ảnh điện di đồ phân tách nhiễm sắc thể của *S. mangrovei* PQ6

A: Sau 22 giờ chạy điện di PFGE: Giếng M: Yeast chromosome PFG Marker; Giếng 1-8: lượng sinh khối tảo sử dụng để tách DNA nhiễm sắc thể tương ứng là 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 mg.

B, C, D: Sau 22 giờ, 27 giờ và 31 giờ chạy điện di PFGE, tương ứng: Giếng M: Yeast chromosome PFG Marker; Giếng 1-3: lượng sinh khối tảo sử dụng để tách DNA nhiễm sắc thể tương ứng là 5,0; 6,0; 7,0 mg.



Bảng 2. Kích thước phân tử DNA nhiễm sắc thể của chủng PQ6

Kích thước (kb)	Nhiễm sắc thể			
	Số I	Số II	Số III	Số IV
	-	-	1600	345

(-). chưa xác định.

Về nguyên tắc, kích thước của nhiễm sắc thể được ước tính trên bản điện di PFGE với khoảng cách các băng nhiễm sắc thể chạy tỷ lệ thuận với logarit của khối lượng phân tử của các kích thước chuẩn. Trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi, kích thước các nhiễm sắc thể được xác định dựa trên thang kích thước nhiễm sắc thể chuẩn của *Saccharomyces cerevisiae* (bảng 2, hình 2A, B, C và D). Trong số 4 băng

phân tách được, chúng tôi mới chỉ xác định được kích thước của 2 băng khoảng 345 và 1600 kb. Hai băng còn lại nằm ngoài kích thước băng cao nhất của marker.

Ngoài ra, theo kết quả giải trình tự hệ gen và tính toán kích thước hệ gen của chủng PQ6 bằng phương pháp flow cytometry (kết quả chi tiết không chỉ ra ở đây) cũng đã khẳng định

được hệ gen chủng tảo này có kích thước khoảng 59,6 Mb. Vì vậy, kích thước 2 băng lớn được phân tách trên PFGE chắc chắn phải nằm ngoài kích thước của các marker chuẩn được biết và sử dụng cho đến nay (tổng kích thước 2 băng lớn này vào khoảng 57,655 Mp).

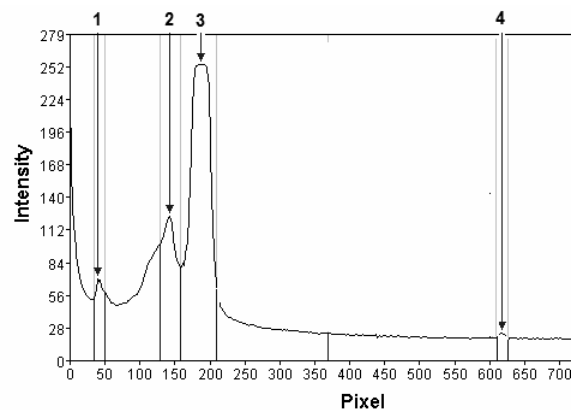
Thông thường, sự phân tách nhiễm sắc thể bằng PFGE sẽ cho phép ước lượng kích thước hệ gen (bằng cách cộng kích thước của tất cả các băng nhiễm sắc thể đã được phân tách trên bản điện di PFGE). Gần đây, kích thước hệ gen và việc xác định số lượng nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật PFGE cũng đã được xác định ở một số các vi sinh vật như *Aspergillus nidulans*; *A. niger*; *Candida albicans*; *Micromucor isabellina* và một số các loài thuộc chi *Thraustochytrium*, cùng họ với chi *Schizochytrium* [1]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi nêu trên ở điều kiện Việt Nam, chúng tôi chưa thể ước lượng kích thước hệ gen của loài vi tảo này dựa trên tổng kích thước của phân tử DNA nhiễm sắc thể tương tự như các công bố khác [1, 17].

Cùng với kết quả của việc phân tích karyotype dựa trên tiêu bản ở hầu hết trong các trường hợp đều cho thấy, chỉ có 3 nhiễm sắc thể dẫn đến một câu hỏi đặt ra, đó là liệu băng kích thước nhỏ khoảng 345 kb có phải là nhiễm sắc thể hay đó là của plasmid ở loài vi tảo này. Các plasmid thường tồn tại ở sinh vật nhân sơ. Tuy nhiên, ở một số nhóm tảo nhân chuẩn như tảo silic (Bacillariophyta), tảo đỏ (Rhodophyta) và tảo nâu (Phaeophyta) đã được chứng minh là có tồn tại plasmid [9]. Vì vậy, cần tiếp tục các nghiên cứu để làm rõ có hay không sự tồn tại của plasmid ở loài vi tảo này.

Để có thể khẳng định có hay không sự xếp chồng lên nhau của các băng nhiễm sắc thể trên bản điện di PFGE (tức là có hay không các nhiễm sắc thể tương đồng đã xếp chồng lên nhau trên bản điện di PFGE), chúng tôi đã tiến hành phân tích densitometry của hình ảnh chụp PFGE (phân tích mật độ quang của các băng so với khoảng cách từ điểm đầu của bản điện di (cm) (hình 3).

Kết quả phân tích densitometry chỉ ra trên hình 3 đã cho thấy, số lượng các pick tương ứng với số lượng các băng nhiễm sắc thể của hình

ảnh điện di thu được là 4. Trên hình 3 có trục tung là cường độ (Intensity) chính là mật độ quang của các băng (đơn vị tương đối), còn trục hoành Pixel là khoảng cách tương đối từ điểm đầu bản gel đến các băng tương ứng. Ngay đối với băng nhiễm sắc thể đậm nhất có kích thước khoảng 1600 kb (hình 2A-D) cũng chỉ thu được một đỉnh duy nhất khi phân tích densitometry. Điều này chứng tỏ chỉ tồn tại một băng nhiễm sắc thể có kích thước này, mặc dù băng này có độ sáng và đậm nhất khi chụp dưới UV, loại trừ khả năng xảy ra 2 nhiễm sắc thể tương đồng có cùng kích thước bị xếp chồng lên nhau.



Hình 3. Phân tích densitometry bản gel chạy PFGE với thời gian 31 giờ, sinh khối tảo là 7,0 mg

Như vậy, quan sát nhiễm sắc thể ở metaphase với thuốc nhuộm DAPI được trình bày ở phần trên đã cho thấy, chủng PQ6 có bộ nhiễm sắc thể $n=3$, nhưng kết quả phân tích nhiễm sắc thể bằng phương pháp PFGE lại cho 4 băng tương ứng với 4 nhiễm sắc thể. Trong đó, băng có kích thước nhỏ (345 kb) có thể là plasmid của chủng PQ6 đòi hỏi phải có những nghiên cứu khẳng định chắc chắn.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu được trình bày nêu trên chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Lần đầu tiên ở Việt Nam và trên thế giới việc phân tích karyotype của loài vi tảo *Schizochytrium mangrovei* PQ6 được thực hiện sử dụng kỹ thuật nhuộm nhiễm sắc thể bằng DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylidole) và điện di xung điện trường (PFGE).

Việc nhuộm tiêu bản nhiễm sắc thể ở metaphase với thuốc nhuộm DAPI đã cho thấy, chủng PQ6 có bộ nhiễm sắc thể $n=3$ với kích thước các nhiễm sắc thể lần lượt là $1,50\pm 0,06$, $1,18\pm 0,14$, và $1,05\pm 0,18$ μm .

Phân tách nhiễm sắc thể bằng điện di xung điện trường cho thấy xuất hiện 4 băng khác nhau tương ứng với 4 nhiễm sắc thể trong đó 2 băng có kích thước khoảng 345 và 1600 kb còn 2 băng có kích thước lớn còn lại vẫn chưa xác định được chính xác kích thước của chúng. Trong đó, băng có kích thước 345 kb có nhiều khả năng là plasmid. Điều này cần được chứng minh ở các nghiên cứu tiếp theo.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài KC.04.20/11-15 “Giải trình tự hệ gen loài vi tảo biển dị dưỡng của Việt Nam *Schizochytrium mangrovei* PQ6” thuộc Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp nhà nước KC.04/11-15 và đề tài cấp cơ sở CSK15-01. Tác giả cũng xin cảm ơn PGS TS Võ Thương Lan và PGS TS Vũ Nguyên Thành đã có những trao đổi thông tin bổ ích về xác định kích thước nhiễm sắc thể và phân tích densitometry.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anbu P., Kim D. U., Jeh E. J., Jeong Y. S., Hur B. K., 2007. Investigation of the physiological properties and synthesis of PUFAs from Thraustochytrids and its electrophoretic karyotype. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 12: 720-729.
- Antonia R. S. M., Amelia G. G., Noemi S. S., 2011. Nuclear content estimates suggest a synapomorphy between Dictyota and six other genera of the Dictyotales (Phaeophyceae). *Cryptogamie Algol.*, 32: 205-219.
- Austin A. P., 1959. Iron-alum aceto-carmin staining for chromosomes and other anatomical features of Rhodophyceae. *Stain Technol.*, 34(2): 69-75.
- Cerveratti E. P., Ferreira- Nozawa M. S., Aquino- Ferreira R., Fachin A. L., Martinez- Rossi N. M., 2004. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Gen. Mol. Biol.*, 27: 99-102.
- Dann O., Bergen G., Demant E., Volz G., 1971. Trypanocide diamidine des 2-phenyl-benzofurans, 2-phenyl-indens und 2-phenyl-indols. *Liebigs Ann. Chem.*, 749: 68-89.
- Dzambarov B., Belkinova D., Mladenov R., 2003. Karyotypic analysis of two algae species *Scenedesmus incrassatulus* Bohl. and *Scenedesmus antennatus* Bréb. (Chlorophyta, Chlorococcales). *Hereditas*, 139: 35-40.
- Fujii M. T., Guerra M., 1998. Improved hematoxylin staining for algal cytogenetics. *J. Biotech. Histochem.*, 73(2): 78-81.
- Gupta A., Barrow C. J., Puri M., 2012. Omega-3 biotechnology: thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnol. Adv.*, 30: 1733-1745.
- Hildebrand M., Corey D. K., Ludwig J. R., Kukel A., Feng T. Y., Volcani B. E. 1991. Plasmids in Diatom species. *J. Bacteriol.*, 173 (18): 5924-5927.
- Hoang M. H., Ha N. C., Thom L. T., Tam L. T., Anh H. T., Thu N. T., Hong D. D. 2014. Extraction of squalene as value-added product from the residual biomass of *Schizochytrium mangrovei* PQ6 during biodiesel producing process. *J. Biosci. Bioeng.*, 118(6): 632-639.
- Hong D. D., Anh T. L. A., Thu N. T. H., 2011. Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalga - *Schizochytrium mangrovei* PQ6 isolated from Phu Quoc Island, Kien Giang province, Vietnam. *J. Phycol.*, 47: 944-954.
- Hong D. D., Mai D. T. N., Thom L. T., Ha N. C., Lam B. D., Tam L. T., Anh H. T. L., Thu N. T. H., 2013. Biodiesel production from Vietnam heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6. *J. Biosci. Bioeng.*, 116(2): 180-185.
- Juan W., Jixun D., 2008. An improved method for karyotype analyses of marine algae. *J. Ocean Univ. Chin.*, 7(2): 205-209.
- Kapraun D. F., 2007. Nuclear DNA content

- estimates in green algal lineages: Chlorophyta and Streptophyta. *Ann. Bot.*, 99: 677-701.
15. Liu Y., Bi Y., Gu J., Li L., Zhou Z. 2012. Localization of a female-specific marker on the chromosomes of the brown seaweed *Saccharina japonica* using fluorescence in situ hybridization. *Plos One*, 7(11): e48784.
 16. Muravenko O., Selyakh I., Kononenko N., Stadnichuk I., 2001. Chromosome numbers and nuclear DNA contents in the red microalgae *Cyanidium caldarium* and three *Galdieria* species. *Eur. J. Phycol.*, 36: 227-232.
 17. Nosenko T., Boese B., Battacharya D., 2007. Pulsed- field gel electrophoresis analysis of genome size and structure in *Pavlova gyrans* and *Diacronema* sp. (Haptophyta). *J. Phycol.*, 43: 763-767.
 18. Novaczek I., Bird C. J., McLachlan J. L., 1986. Culture and field study of *Stilophora rhizodes* (Phaeophyceae, Chordariales) from Nova Scotia, Canada. *Br. Phycol. J.*, 21: 407-416.
 19. Raghukumar S., 2008. Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Mar. Biotechnol.*, 10: 631-640.
 20. Raghukumar S., 2002. Ecology of the marine protists, the labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids). *Eur. J. Protistol.*, 38:127-145.
 21. Rao C. S. B., 1953. Aceto-carmin as a nuclear stain in Rhodophyceae. *Nature*, 172: 1197.
 22. Soyer-Gobillard M. O., Ausseil J, Ge'raud M. L., 1996. Nuclear and cytoplasmic actin in dinoflagellates. *Biol. Cell*, 87: 17-35.
 23. Wittmann W., 1965. Aceto-iron-haematoxylin-chloral hydrate for chromosome staining. *Stain Tech.*, 40 (3): 161-164.
 24. Zhou L. R., Dai J. X., Shen S. D. 2004. An improved chromosome preparation from male gametophyte of *Laminaria japonica* (Heterokontophyta). *Hydrobiologia*, 512: 141-144.

KARYOTYPE ANALYSIS OF *Schizochytrium mangrovei* PQ6 USING DAPI (4', 6-DIAMIDINO-2-PHENYLIDOLE) COUNTERSTAINING AND PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) TECHNIQUES

**Hoang Thi Lan Anh¹, Ngo Thi Hoai Thu¹, Tran Huy Hoang², ZhiGang Zhou³,
Tran Que⁴, Chu Hoang Ha¹, Truong Nam Hai¹, Dang Diem Hong¹**

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Department of Bacteriology, National Institute of Hygiene and Epidemiology

³College of Aqua- life Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, China

⁴Nuclear Research Institute, Vietnam Atomic Energy Institute

SUMMARY

Schizochytrium mangrovei PQ6 is a heterotrophic marine microalga, which was isolated from Phu Quoc Island, Kien Giang province. It has many unique characteristics, including ability to be adapted to varying culture environmental conditions, such as temperature, salinity, pH as well as producing high biomass (30-40 g of dry cell weight - DCW per liter), lipid content (up to 70% DCW), and especially rich in polyunsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid-DHA, C22: 6n-3; eicosapentaenoic acid-EPA, C20: 5n-3, docosapentaenoic acid-DPA, C22: 5n-6. The biomass of this strain was studied to use for aquaculture feed, functional food, biodiesel and some bioactive compounds (polyunsaturated fatty acid, squalene) production. However, until now no scientific reports published in the world pertaining karyotype analysis of this species as well as others species belonging to the genus *Schizochytrium*.

In this paper, for karyotype analysis experiment, we used colchicine to arrest the cell cycle at the metaphase. To obtain clear images, the cells of PQ6 strain were treated with maceration enzymes and chromosomes were stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) and observed under fluorescence microscopy. The experimental results showed that PQ6 strain has three chromosomes. On the other hand, four bands (equal four chromosomes) were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The different of obtained number of chromosome allowed us to suggest that maybe, this microalga has a plasmid. And thus, this question needs to be clarified in the near future. However, the result of our research provides first evidence about karyotype and served as an initial basic for genomic assembly and annotation of this microalga.

Keywords: *Schizochytrium mangrovei* PQ6, DAPI, karyotype, metaphase, PFGE.

Ngày nhận bài: 7-12-2014