

## SỬ DỤNG VENT DNA POLYMERASE TRONG KỸ THUẬT PCR ĐỂ KHUẾCH ĐẠI CÁC ALLEN D17S5 (YNZ22)

NGUYỄN HOÀI GIANG, NGUYỄN HẠNH PHÚC,  
LÊ THỊ KIM TUYẾN

*Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương*

Trước đây, việc nghiên cứu xác định đặc trưng cá thể và các quan hệ huyết thống thường dựa vào các chỉ tiêu sinh học như dấu hiệu kiểu hình bên ngoài, nhóm máu, kiểu huyết thanh, các enzym của hồng cầu, hệ HLA (Human Leucocyte Antigens-các kháng nguyên hồng cầu người) ... Các chỉ tiêu này có độ tin cậy khá cao, tuy nhiên các chỉ tiêu kể trên vẫn còn có nhiều hạn chế vì không đủ tính chuyên biệt tuyệt đối cho từng cá thể. Trong công bố trước [3], chúng tôi đã thành công trong việc sử dụng kỹ thuật PCR với enzym xúc tác Taq DNA polymerase để khuếch đại các alen của locut D17S5 của người Việt Nam phục vụ nghiên cứu xác định đặc trưng cá thể và các quan hệ huyết thống ở mức độ DNA.

Các nghiên cứu khoa học [4,7] cũng đã chỉ rõ Vent DNA polymerase có những ưu điểm vượt trội so với Taq DNA polymerase như: Vent DNA polymerase bị mất 50% hoạt tính ở 95°C sau 360 phút so với 40 phút của Taq polymerase trong cùng điều kiện [7]. Vent polymerase cũng ít gây lỗi trong quá trình xúc tác tổng hợp DNA (1/31.000) so với Taq polymerase (từ 1/290 đến 1/2.400). Hơn nữa, Vent DNA polymerase còn có hoạt tính exonuclease theo chiều 3'-5' [4, 7]. Những ưu điểm này của Vent DNA polymerase sẽ rất có ý nghĩa nếu ứng dụng được nó trong kỹ thuật PCR để phục vụ công tác khoa học hình sự và y học...

Do vậy, nghiên cứu này của chúng tôi nhằm mục đích tìm điều kiện PCR tối ưu để khuếch đại các alen D17S5 khi sử dụng Vent DNA polymerase.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

DNA của các cá thể khác nhau (lựa chọn

ngẫu nhiên cho nghiên cứu) được tách chiết bằng đệm phân giải và proteinase K từ máu tươi hoặc máu giữ trong chất chống đông [1].

Phản ứng PCR theo nguyên lý của Kary Mullis với các cặp mồi đặc hiệu cho locut D17S5 và enzym xúc tác Vent DNA polymerase [7]; điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamid 6% [1]; nhuộm bản gel sau điện di bằng phương pháp nhuộm bạc [1].

Tối ưu hoá điều kiện PCR cho Vent DNA polymerase theo phương pháp thay đổi một thông số và cố định các thông số còn lại đã được chuẩn hoá với Taq DNA polymerase (1,2mM Mg<sup>2+</sup>, nhiệt độ gán mỗi 60°C và 200 μM của bốn loại bazơ nitơ) [3].

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Tối ưu hoá theo MgSO<sub>4</sub>

Kỹ thuật PCR được tiến hành theo thường quy chuẩn [7] với DNA khuôn là các mẫu DNA tách chiết được từ các cá thể khác nhau, cặp mồi đặc hiệu cho locut D17S5, enzym xúc tác cho quá trình tổng hợp là Vent DNA polymerase và sự có mặt của MgSO<sub>4</sub>. Do Vent DNA polymerase hoạt động tốt với sự có mặt của MgSO<sub>4</sub> từ 0 đến 10 mM [4,7], chúng tôi sử dụng các nồng độ MgSO<sub>4</sub> khác nhau thay đổi từ 0, 2, 4, 6, 8 và 10 mM để tìm ra thông số phù hợp nhất để khuếch đại các alen D17S5. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy khi không có MgSO<sub>4</sub> thì các băng DNA thu được rất mờ, thậm chí không quan sát được. Còn ở các nồng độ MgSO<sub>4</sub> khác là 4, 6, 8 và 10 mM thì thấy xuất hiện khá nhiều các băng DNA (trên dưới 10 băng khác nhau), nhưng không thể phân biệt được các băng đặc hiệu của alen D17S5. Ngược

lại, ở nồng độ  $MgSO_4$  là 2 mM, các mẫu PCR thu được đều có 1 băng kép (đối với cá thể đồng hợp tử ở locut này) hoặc hai băng riêng biệt (dị hợp tử) và nằm đúng trong khoảng kích thước đã được công bố của các alen D17S5 (từ 170 đến 1080 cặp bazơ nitơ) [3, 5, 6]. Như vậy, để khuếch đại các alen D17S5, nồng độ  $MgSO_4$  thích hợp nhất là 2 mM.

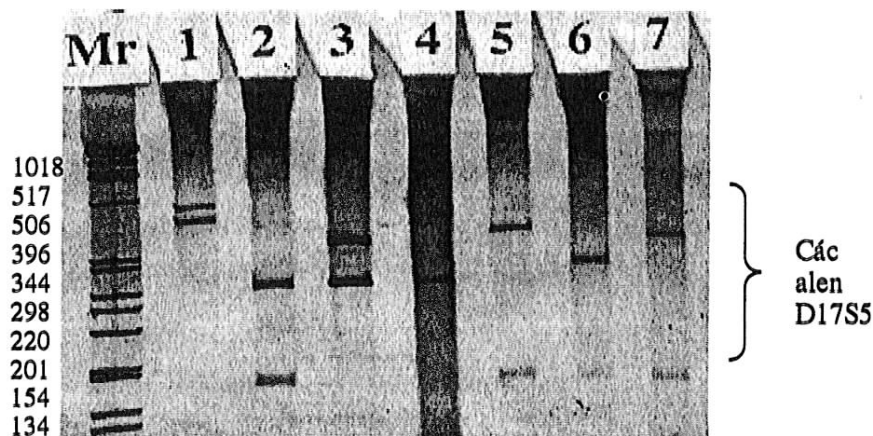
## 2. Tối ưu hoá theo nhiệt độ gắn môi

Trong kỹ thuật PCR như chúng ta đã biết, nhiệt độ gắn môi cũng là một yếu tố quan trọng góp phần nâng cao tính đặc hiệu của sản phẩm tạo ra [7]. Hơn nữa, theo các tài liệu khoa học đã công bố [4, 7], Vent DNA polymerase cho phép nâng nhiệt độ gắn môi lên thêm từ 4 đến 7°C so với cùng trường hợp sử dụng Taq DNA polymerase. Do vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm PCR sử dụng Vent DNA polymerase với các nhiệt độ gắn môi khác nhau dựa trên thông số này đã được tối ưu hoá với Taq DNA polymerase cho locut D17S5 (60°C) [3]. Thí nghiệm được tiến hành với dãy nhiệt độ gắn môi khác nhau thay đổi từ 60, 62, 64, 66 và 68°C. Kết quả điện di các sản phẩm PCR được tạo ra từ các nhiệt độ gắn môi 60 và 62°C thu được cho các băng DNA rõ nét. Ở nhiệt độ gắn môi là 64°C, các sản phẩm PCR này đã mờ đi rất nhiều; ở 66 và 68°C thì gần như không quan sát được các băng DNA này nữa. Do vậy để tăng tính đặc

hiệu cho việc khuếch đại các alen D17S5 khi có Vent DNA polymerase là enzym xúc tác, 62°C được chúng tôi chọn làm nhiệt độ gắn môi. Điều này có thể được giải thích là do nồng độ  $Mg^{2+}$  dùng với Vent DNA polymerase là 2 mM, trong khi đó với Taq DNA polymerase chỉ là 1,2 mM, nên  $Mg^{2+}$  này cho phép gắn môi nhiệt độ cao hơn [7].

## 3. Tối ưu hoá theo bốn loại bazơ nitơ (dNTPs)

Khác với Taq DNA polymerase, Vent DNA polymerase có hoạt tính exonuclease theo chiều 3'-5', nên nồng độ dNTPs (bốn loại ATP, TTP, GTP và CTP) cũng là yếu tố quan trọng giúp cho DNA khuôn không bị thoái hoá trong quá trình thực hiện PCR [4, 7]. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm với các nồng độ dNTPs thay đổi từ 50, 100, 150 và 200  $\mu M$ . Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, chỉ ở nồng độ 200  $\mu M$  chúng tôi mới thu được băng DNA đúng kích thước của các alen D17S5. Ở nồng độ dNTPs là 50 và 100  $\mu M$  thì sản phẩm PCR không quan sát được. Còn ở nồng độ 150  $\mu M$ , các sản phẩm PCR thu được có xuất hiện, nhưng mờ hơn trường hợp sử dụng 200  $\mu M$  dNTPs rất nhiều. Kết quả này cho thấy nồng độ dNTPs bằng 200  $\mu M$  là phù hợp nhất để khuếch đại các alen D17S5.



Ảnh. Kết quả khuếch đại alen D17S5 từ các cá thể khác nhau bằng PCR sử dụng enzym Vent DNA polymerase

Chú thích: Mr - Thang DNA chuẩn (1kb).

1, 2, 3, 4, 5, 6, và 7 - Các alen D17S5 được khuếch đại bằng PCR ở 7 cá thể khác nhau.

(Điều kiện PCR: 94°C 4'/94°C 1' - 62°C 1' - 72°C 1'/72°C 5': 25 chu kỳ - 1đơn vị Vent DNA polymerase/50  $\mu l$  hỗn hợp PCR - 2mM  $MgSO_4$  - 200 $\mu M$  dNTPs).

### III. KẾT LUẬN

1. Khi tiến hành PCR để khuếch đại các alen D17S5 với Vent DNA polymerase thì nồng độ  $MgSO_4$  thích hợp nhất là 2 mM.
2. Nhiệt độ gắn mỗi đặc hiệu là 62°C.
3. Nồng độ dNTPs cần sử dụng là 200  $\mu M$ .

*Sử dụng enzym Vent DNA polymerase trong kỹ thuật PCR cho phép khuếch đại thành công các alen của locus D17S5.*

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hoài Giang, 2000: Sử dụng các locus có đoạn lặp (VNTRs) để xác định đặc trưng cá thể ở người. Luận văn thạc sĩ sinh học - Trường đại học Khoa học tự nhiên.
2. Lê Đình Lương và cs., 2000: Sự phân bố các alen D1S80 (pMCT118) ở người Việt nam. Tạp chí Di truyền học & ứng dụng, số 3/2000.
3. Lê Đình Lương và cs., 2000: Sự phân bố các alen D17S5 (YNZ22) ở người Việt Nam. Tạp chí Di truyền học & ứng dụng, số 4/2000.
4. Catalog and Technical Reference, 2000-2001: New England Biolabs: 73-79.
5. Gez. J., 1998: Nucleic Acids Research; 19(20): 5806
6. Harashima và cs., 1996: Nippon Hoigaku Zasshi, 50(4): 237-240.
7. Rolfs. A. I., et al., 1992: PCR: Clinical Diagnostics and Research. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg: 1-12, 125, 244-250.

## APPLYING OF VENT DNA POLYMERASE FOR THE AMPLIFICATION OF D17S5 (YNZ22) ALLELES BY PCR

NGUYEN HOAI GIANG, NGUYEN HANH PHUC,  
LE THI KIM TUYEN

### SUMMARY

D17S5 locus is highly polymorphic and has been used worldwide as an important marker for forensic, medical analyses and paternity tests.

Vent DNA Polymerase is a high-fidelity thermophilic DNA polymerase. The fidelity of Vent DNA Polymerase is 5 to 15 folds higher than that observed for Taq DNA Polymerase. This high fidelity derives in part from an integral 3'→5' proofreading exonuclease activity in Vent DNA Polymerase. Greater than 90% of the polymerase activity remains after one hour incubation at 95°C. Because of these advantages, we want to apply Vent DNA Polymerase for the amplification of D17S5 alleles by PCR.

Our study showed that PCR conditions for Vent DNA Polymerase were rather different than for Taq DNA Polymerase. The amplification of D17S5 alleles with Vent DNA Polymerase was optimal with the following parameters:

1. A final concentration of  $MgSO_4$  in PCR mixture of 2 mM.
2. An annealing temperature for the specific D17S5 primers of 62°C.
3. A final concentration of dNTPs of 200  $\mu M$ .

*Ngày nhận bài: 17-10-2001*