

QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA ĐƠN GIẢN VÀ HIỆU QUẢ TỪ LÔNG CHÓ

Thái Kế Quân^{1*}, Nguyễn Văn Tú¹, Huỳnh Văn Hiếu²,
Nguyễn Thành Công³, Trần Hoàng Dũng³

¹Trường Đại học Sài Gòn, *quan.tk@cb.sgu.edu.vn

²Khoa Khoa học Nông nghiệp & Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

³Viện Công nghệ Kỹ thuật cao Nguyễn Tất Thành, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

TÓM TẮT: Chó Phú Quốc là một trong những nòi chó quý của Việt Nam đang được nghiên cứu để bảo tồn nguồn gen. Mẫu DNA trong các nghiên cứu trước đây thường được tách chiết từ máu. Tuy nhiên, việc lấy máu thường gặp khó khăn do phản ứng của chó cũng như sự không đồng tình của chủ nuôi chó. Vì vậy, chúng tôi đề xuất quy trình tách chiết DNA từ lông chó để việc thu mẫu dễ dàng hơn. Sử dụng các hóa chất thông thường như SDS, proteinase K... Phần gốc lông chó (khoảng 1 cm) được ủ trong dung dịch đệm chiết có bổ sung proteinase K ở nhiệt độ 50°C trong 60 phút để phá vỡ màng tế bào. DNA được giải phóng sẽ được tách ra khỏi các thành phần khác của tế bào bằng hỗn hợp phenol+chloroform và được tủa bằng ethanol lạnh. Sau đó DNA thu được sẽ được hòa tan trong nước và được lưu giữ ở nhiệt độ -30°C. Kết quả nghiên cứu cho thấy, DNA tách chiết được có chất lượng tốt, có thể dùng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo như phản ứng PCR, giải trình tự.

Từ khóa: Chó Phú Quốc, DNA nhân, DNA ty thể, lông chó, phản ứng PCR, tách chiết DNA.

MỞ ĐẦU

Chó lung xoáy Phú Quốc là một trong những nòi chó quý của Việt Nam nổi tiếng với các đặc điểm như thông minh, trung thành, nhanh nhẹn, có sức khỏe tốt và thân thiện với con người. Dù đã được người dân trên đảo Phú Quốc nuôi từ lâu nhưng chúng vẫn còn giữ nhiều nét hoang dã của một loài chó săn mồi. Cùng với khả năng nhảy cao, giữ thăng bằng tốt và bơi lội giỏi, chó lung xoáy Phú Quốc không chỉ được nuôi để canh giữ nhà mà còn được huấn luyện để đi săn cũng như gắn liền với mọi sinh hoạt đời thường của người dân trên đảo. Tuy nhiên, cho đến hiện nay, nguồn gốc tiến hóa của nòi chó này vẫn chưa được xác định rõ ràng. Nhiều ý kiến cho rằng chó lung xoáy Phú Quốc có nguồn gốc từ chó lung xoáy Thái Lan bởi sự tương đồng về các đặc điểm ngoại hình. Liên đoàn Các hiệp hội Nuôi chó giống Quốc tế (Federation Cynologique Internationale-FCI) chỉ mới công nhận nòi chó lung xoáy của Thái Lan, còn thông tin về nòi chó lung xoáy của Việt Nam vẫn chưa được FCI xác định [23].

Vấn đề về nguồn gốc di truyền của chó lung xoáy Phú Quốc cũng đã được quan tâm nghiên cứu nhưng cho đến nay vẫn chưa được sáng tỏ. Nhiều nghiên cứu cho thấy DNA ty thể là nguồn thông tin quý giá giúp làm rõ quá trình

tiến hóa của loài chó nói chung [18, 22] cũng như nguồn gốc của một số nòi chó như chó Ngao Tây Tạng [15]. Tuy nhiên, một trong những khó khăn chính trong nghiên cứu chó lung xoáy Phú Quốc hiện nay là công tác thu thập nguồn nguyên liệu cung cấp DNA. Các nghiên cứu về chó lung xoáy Phú Quốc trước đây đều sử dụng máu làm nguồn nguyên liệu tách chiết DNA. Mặc dù mẫu máu được sử dụng khá phổ biến cho các mẫu nghiên cứu động vật [13], nhưng việc thu thập máu chó lung xoáy Phú Quốc với số lượng lớn đang gặp khó khăn bởi việc xâm phạm đến cơ thể con vật cũng như không nhận được sự đồng ý của chủ vật nuôi. Vì vậy, mẫu lông chó đã được lựa chọn làm nguồn nguyên liệu tách chiết DNA tối ưu bởi quá trình thu thập lông chó ít xâm phạm cũng như không gây đau đớn cho con vật [4]. Tuy nhiên, lông có cấu trúc bền vững, khó bị phá vỡ bởi các nhân tố vật lý, hóa học. Điều đó khiến việc tách chiết DNA gặp khó khăn hơn so với các loại mẫu khác. Các liên kết disulfide cần phải được bẻ gãy hoàn toàn để phá vỡ lớp vỏ bọc bền vững của keratin và giải phóng DNA ra bên ngoài [5, 20]. Ngoài ra, quá trình keratin hóa diễn ra đồng thời trong chu trình phát triển lông làm các tế bào bị phân hủy kéo theo sự tiêu biến của DNA (đặc biệt là DNA nhân), hầu như

DNA tập trung nhiều nhất ở phần gốc với khoảng 1.000 bản sao mtDNA trong mỗi tế bào [15, 17]. Vì vậy, cần phải lựa chọn và hiệu chỉnh phương pháp tách chiết DNA tối ưu từ lông để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Chúng tôi tham khảo và thử nghiệm các quy trình tách chiết DNA từ lông đã được công bố trong nước và thế giới, nhưng kết quả thu được không thành công và hiệu quả như giả thiết. NaOH có thể hỗ trợ quá trình phân hủy sợi lông [8] giúp giải phóng DNA hiệu quả. Tuy DNA đã được tinh sạch, nhưng lượng NaOH vẫn còn trong dịch DNA tách chiết, đã ức chế phản ứng PCR sau đó. Quy trình tách chiết DNA có bổ sung CaCl_2 giúp ổn định hoạt động của proteinase K [19] cũng được tiến hành, nhưng lượng DNA thu được rất thấp. Bên cạnh đó, chúng tôi đã thành công với quy trình tách chiết DNA bằng bột giặt [10] và quy trình tách chiết DNA bằng 2 bước phân hủy protein [12]. Cả hai quy trình này đều thu được sản phẩm DNA, nhưng do quy trình tách chiết dùng bột giặt không có bước loại bỏ tạp chất nên khả năng ngoại nhiễm PCR cao. Với điều kiện máy móc, thiết bị hạn chế, vì vậy, chúng tôi khó sử dụng quy trình tách chiết với 2 bước phân hủy protein, cần phải thay đổi nhiệt độ ủ mẫu. Mặt khác, một số quy trình chiếm nhiều thời gian cho các công đoạn, như rửa sạch lông bằng cồn 70% trong 56 giờ, ủ mẫu với dung dịch đệm chiết trong 48 giờ và huyền phù dung dịch 12 giờ/lần [1]; ủ mẫu với dung dịch đệm chiết trong khoảng từ 2-5 giờ [8, 19]. Vì vậy, dựa trên những nguyên tắc cơ bản của kỹ thuật tách chiết DNA cũng như hoạt tính của các hóa chất trong dung dịch đệm chiết, chúng tôi đã tiến hành khảo sát, hiệu chỉnh và lựa chọn các điều kiện tối ưu nhằm xây dựng quy trình tách chiết DNA từ lông chó đạt hiệu quả cao nhất, tận thu nguồn DNA tổng số có trong lông.

Quy trình tách chiết DNA xây dựng trong nghiên cứu giúp tận thu nguồn DNA trong sợi lông được nguyên vẹn và tinh sạch đảm bảo yêu cầu. Quy trình sử dụng các loại hóa chất thông dụng với thao tác đơn giản và tốn ít thời gian để hoàn thành. Sản phẩm DNA thu được từ một sợi lông chó có thể được sử dụng cho phản ứng

PCR khuếch đại một đoạn trình tự bất kỳ trên DNA nhân, lẫn DNA ty thể.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu thập mẫu vật: Mẫu lông chó được thu ngẫu nhiên tại các hộ gia đình trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh. Sử dụng kẹp để giữ vệ sinh và đảm bảo lấy được cả phần gốc lông. Lông cắt ngắn khoảng 1 cm tính từ gốc, rửa bằng nước cất vô trùng, cho vào eppendorf 1,5 ml và giữ mẫu ở nhiệt độ -30°C cho đến khi sử dụng.

Tách DNA tổng số: Tiến hành ủ hỗn hợp lông và dung dịch đệm chiết (Tris HCl 10 mM, pH 8; Triton X100 1%; SDS 1%; EDTA 10 mM) ở 50°C trong 20 phút để phá màng tế bào. Tăng cường hiệu quả phá vỡ cấu trúc keratin và các protein khác bằng cách bổ sung 5 μl proteinase K (20 mg/ml), ủ tiếp hỗn hợp ở các nhiệt độ khảo sát (50°C hoặc 56°C hoặc 65°C) trong 60 phút; thêm dung dịch đệm chiết và ủ trong 20 phút với nhiệt độ không đổi nhằm loại bỏ hoàn toàn màng tế bào, màng nhân, màng ty thể và giải phóng triệt để DNA; dùng một lượng phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) bằng với thể tích dung dịch để tách DNA ra khỏi các thành phần không mong muốn. Thu lấy pha nước chứa DNA rồi kết tủa bằng NaCl 3 M và cồn tuyệt đối lạnh, ủ ở -30°C trong 30 phút để đạt hiệu quả tối đa. Ly tâm thu kết tủa và rửa bằng cồn 70% lạnh. Sau khi làm khô, DNA được hòa với nước cất vô trùng và bảo quản ở -30°C . Thời gian, nhiệt độ ủ proteinase K và muối dùng để kết tủa DNA sẽ được khảo sát nhằm xây dựng một quy trình tách chiết DNA đơn giản, ít tốn thời gian và sản phẩm DNA thu được có thể sử dụng cho phản ứng PCR về sau. DNA thu nhận được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra định tính, sau đó được định lượng và kiểm tra độ tinh sạch thông qua sự hấp thụ ánh sáng ở các bước sóng 230 nm, 260 nm và 280 nm bằng máy đo mật độ quang Genova Plus.

Phản ứng PCR khuếch đại vùng DNA trên nhiễm sắc thể Y: Phản ứng PCR được thực hiện nhằm khuếch đại một vùng trên nhiễm sắc thể giới tính Y, qua đó kiểm tra chất lượng DNA nhân thu được. Thành phần phản ứng bao gồm

Prime Taq Premix (2X) của hãng Genet Bio (0,5 mM dNTP Mix; 2X buffer; prime taq polymerase 1 unit/10 μ l; 4 mM MgCl₂); 0,4 μ l mỗi xuôi (10 μ M); 0,4 μ l mỗi ngược (10 μ M); 2 μ l DNA mẫu (6,6 ng/ μ l); nước cất vô trùng vừa đủ 25 μ l với cặp mồi 03Haf1 và 03r2 có trình tự lần lượt là AAAGTCACAGTACATTA ACAAC và AGGATTTGGTGGAGGTAAT AC [6]. Chương trình PCR: giai đoạn tiền biến tính ở 94°C trong 2 phút; giai đoạn chính (32 chu kỳ): biến tính ở 94°C trong 30 giây, mỗi bắt cặp ở 51°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút; giai đoạn kéo dài cuối cùng (1 chu kỳ) ở 72°C trong 5 phút.

Phản ứng PCR khuếch đại vùng HVI của DNA ty thể: được tiến hành với thành phần phản ứng bao gồm Prime Taq Premix (2X) của hãng Genet Bio; 1 μ l mỗi xuôi (15412F-CCACTATCAGCACCCAAAG; 10 μ M); 1 μ l mỗi ngược (16625R-AGACTACGAGACCAA ATGCG; 10 μ M); 2 μ l DNA mẫu; nước cất vô trùng vừa đủ 20 μ l [11]. Chương trình PCR: giai đoạn tiền biến tính (1 chu kỳ) ở 95°C trong 5 phút; giai đoạn chính (35 chu kỳ): biến tính ở 95°C trong 30 giây, mỗi bắt cặp ở 49°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút; giai đoạn kéo dài cuối cùng (1 chu kỳ) ở 72°C trong 5 phút.

Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự: Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tự động bằng phương pháp Sanger [21]. Trình tự DNA sau khi đọc được hiệu chỉnh bằng mắt với sự trợ giúp của phần mềm FinchTV 1.4.0 và SeaView 4.2.12 để loại bỏ các vùng tín hiệu nhiễu, không rõ ràng. Trình tự sau hiệu chỉnh sẽ được khảo sát bằng BLAST [2] để xác định các trình tự tương đồng đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank [3].

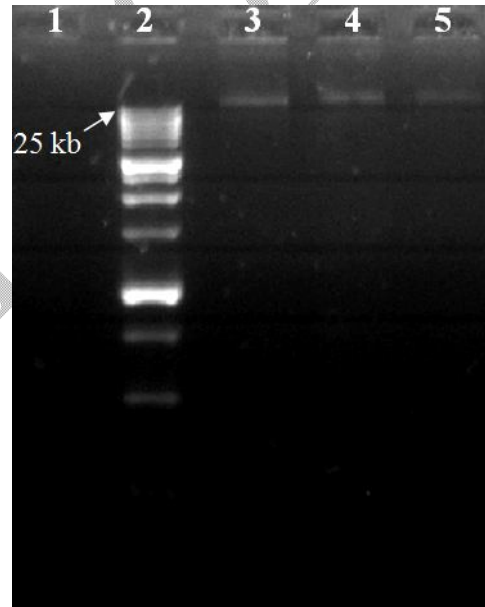
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát nhiệt độ hoạt động tối ưu của proteinase K

Khi tách chiết DNA, proteinase K có thể được ủ ở các nhiệt độ khác nhau như 56°C [9] hoặc 65°C [7, 12] trong 40-60 phút để phá hủy hoàn toàn cấu trúc của keratin và các protein khác. Tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu mà nhà sản xuất khuyến cáo sử dụng proteinase K

trong khoảng 20°C đến 60°C, trong đó, nhiệt độ tối ưu để ủ proteinase K là 37°C (Sigma-Aldrich). Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy proteinase K có thể bị bất hoạt ở 65°C nếu ủ lâu hơn 60 phút (Fermentas). Việc thay đổi nhiệt độ ủ liên tục cũng có thể làm DNA biến tính trong suốt thời gian phá vỡ tế bào nhằm giải phóng DNA. Vì vậy, trong quá trình phá vỡ tế bào cần sử dụng một nhiệt độ nhất định để bảo đảm độ nguyên vẹn của DNA cũng như tiết kiệm thời gian tách chiết.

Thí nghiệm được bố trí nhằm khảo sát các mức nhiệt độ ủ mẫu với proteinase K bao gồm 50°C, 56°C và 65°C trong thời gian 60 phút để đánh giá mức độ hoạt động của proteinase K đối với mẫu lông chó.



Hình 1. Kết quả điện di DNA về khảo sát nhiệt độ hoạt động của proteinase K

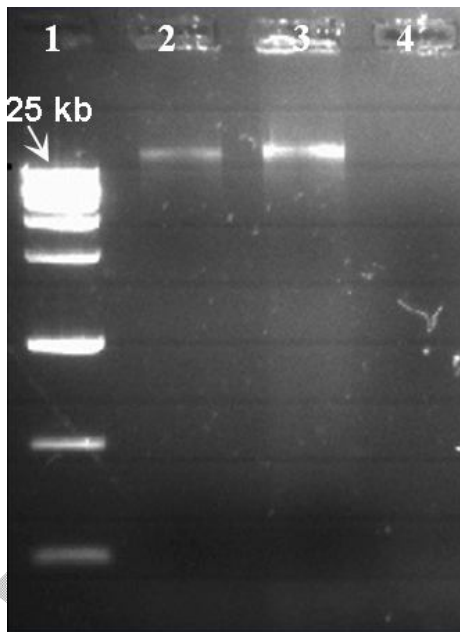
1. Đối chứng âm; 2. Thang DNA 1 kb plus; 3. Mẫu DNA tách chiết khi ủ mẫu với proteinase K ở 50°C; 4. Mẫu DNA tách chiết khi ủ mẫu với proteinase K ở 56°C; 5. Mẫu DNA tách chiết khi ủ mẫu với proteinase K ở 65°C.

Kết quả điện di và OD cho thấy, mẫu ủ ở 50°C cho băng DNA sáng với độ tinh sạch (1,85) cao hơn so với mẫu được ủ ở nhiệt độ 56°C và 65°C. Ngoài ra, mẫu được ủ ở 56°C cho băng DNA sáng hơn so với 65°C, nhưng cả hai mẫu này đều không tinh sạch (1,46-1,6) (hình

1). Nồng độ DNA thu được từ mẫu ủ ở 50°C là 4,45 ng/μl. Có thể kết luận rằng, nhiệt độ càng tăng, hoạt tính proteinase K càng giảm. Các protein không được phân giải hoàn toàn khiến sản phẩm thu được không đạt yêu cầu. Vì vậy, khi tiến hành các thí nghiệm tách chiết DNA nên ủ mẫu với proteinase K ở 50°C để proteinase K có thể hoạt động tốt nhất.

Khảo sát điều kiện thời gian hoạt động tối ưu của proteinase K

Tại nhiệt độ 50°C, tiến hành khảo sát thời gian ủ mẫu đã bổ sung proteinase K nhằm xác định thời gian để proteinase K hoạt động tối ưu cũng như có thể thu ngắn thời gian của quy trình tách chiết. Thời gian proteinase K hoạt động khoảng từ 40 phút đến 60 phút (Fermentas). Vì vậy, thí nghiệm được bố trí nhằm khảo sát ở 2 mức thời gian hoạt động của proteinase K.



Hình 2. Kết quả điện di DNA về khảo sát thời gian hoạt động của proteinase K

1. Thang DNA 1kb plus; 2. Mẫu DNA tách chiết khi ủ mẫu với proteinase K ở 50°C, 60 phút; 3. Mẫu DNA tách chiết khi ủ mẫu với proteinase K ở 50°C, 40 phút; 4. Đối chứng âm.

Kết quả điện di và OD cho thấy, tiến hành ủ mẫu với proteinase K ở nhiệt độ 50°C trong 60 phút sẽ cho được sản phẩm DNA (3,25 ng/μl) với độ tinh sạch là 1,8. Mặc dù, mẫu được ủ

trong 40 phút có nồng độ thu được cao hơn (3,65 ng/μl), băng DNA trên gel agarose 1% sáng rõ hơn, nhưng độ tinh sạch lại khá thấp (1,24) (hình 2). Với khoảng thời gian ủ trong 60 phút, proteinase K sẽ phát huy hiệu quả tối đa, phân giải hoàn toàn các protein, nhất là các protein histon. Vì vậy, để đảm bảo chất lượng sản phẩm thu nhận, khi tiến hành các thí nghiệm tách chiết DNA, nên ủ mẫu với proteinase K ở 50°C trong khoảng thời gian 60 phút để proteinase K hoạt động tốt nhất.

Khảo sát hoạt động tạo tủa DNA của muối NaOAC và NaCl

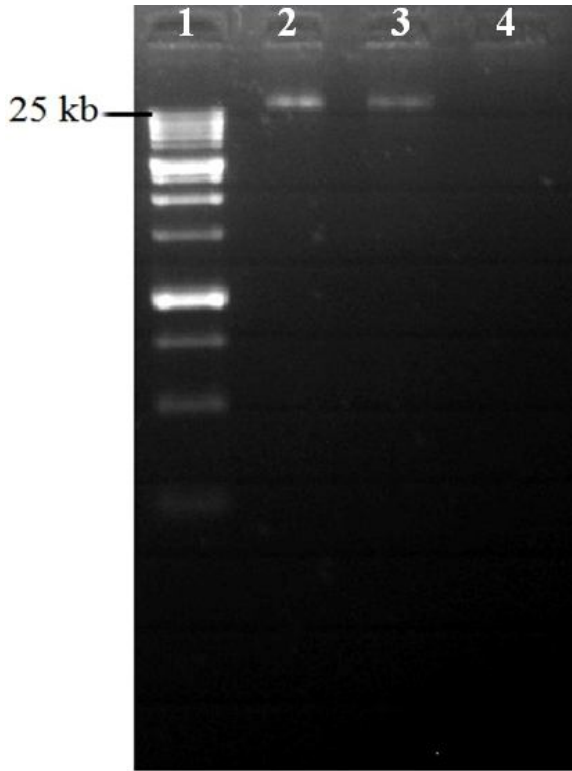
DNA là phân tử phân cực có gốc phosphate, có khả năng liên kết với các cation của dung dịch muối trong quá trình tạo kết tủa DNA. Một số muối được sử dụng là Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), Potassium acetate (KCH_3COO), Lithium chloride (LiCl), Sodium chloride (NaCl) và Sodium acetate (NaOAC). Trong đó, NaCl và NaOAC là hai muối phổ biến nhất trong các công đoạn tách chiết DNA, hai muối này có khả năng kết tủa DNA tốt nhất [16].

Tiến hành PCR sản phẩm DNA thu được từ quy trình có sử dụng muối NaOAC cho kết quả khuếch đại không ổn định. 30 phản ứng PCR đã được tiến hành trên 30 mẫu DNA tách chiết khác nhau, nhưng chỉ có 14 mẫu khuếch đại thành công, 16 mẫu còn lại không quan sát được sản phẩm khuếch đại trên gel điện di. Có thể các hóa chất được sử dụng trong tách chiết, đặc biệt là SDS, còn sót lại trong sản phẩm DNA đã ức chế phản ứng PCR. Để kiểm tra giả thiết này, chúng tôi đã sử dụng NaCl ở bước kết tủa DNA. NaCl 0,2 M giữ cho SDS vẫn còn ở pha nước, không bị kết tủa cùng với DNA qua ly tâm.

Kết quả điện di và đo OD cho thấy, nồng độ DNA thu được từ quy trình sử dụng muối NaOAC (8,10 ng/μl) cao hơn so với muối NaCl (3,25 ng/μl); băng DNA trên gel agarose của mẫu sử dụng muối NaOAC sáng hơn so với mẫu sử dụng muối NaCl (hình 3). Tuy nhiên, độ tinh sạch của muối NaCl thu được (1,8) cao hơn so với độ tinh sạch của muối NaOAC (1,74).

Tiến hành thử nghiệm phản ứng PCR với các mẫu DNA thu được từ quy trình sử dụng muối NaCl . Kết quả cho thấy, phản ứng PCR

mẫu DNA sử dụng muối NaCl cho kết quả tốt, có tính ổn định và tỷ lệ thành công cao hơn. Vì vậy, khi tiến hành tách chiết DNA từ lông chó nên sử dụng muối NaCl 0,2 M để tạo kết tủa DNA.



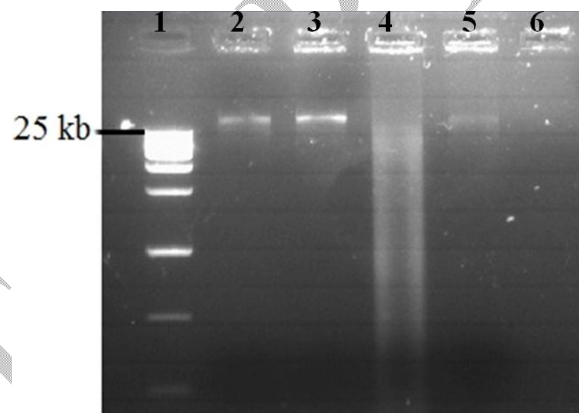
Hình 3. Kết quả điện di DNA về hoạt động tạo tủa DNA của muối NaOAC và NaCl

1. Thang DNA 1kb plus; 2. Mẫu DNA sử dụng muối NaOAC; 3. Mẫu DNA sử dụng muối NaCl; 4. Đối chứng âm.

Sau khi hiệu chỉnh quy trình, tiến hành khảo sát và so sánh kết quả DNA thu được từ quy trình xây dựng với các quy trình tách chiết đã được công bố trên thế giới cũng như với bộ kit GenAll. Các quy trình được tiến hành khảo sát bao gồm, quy trình xây dựng trong báo cáo (quy trình 1); quy trình tách chiết DNA từ tóc [12] (quy trình 2); quy trình tách chiết DNA từ tóc, sử dụng bột giặt và dung dịch đệm PCR [10] (quy trình 3) và quy trình tách chiết DNA từ bộ kit GeneAll (quy trình 4).

Kết quả điện di và đo OD (hình 4) cho thấy, quy trình 1 cho bằng DNA sáng rõ, DNA thu được có nồng độ 6,6 ng/ μ l với độ tinh sạch cao

(1,94); tương đương với độ tinh sạch của DNA thu được từ bộ kit (1,97). Các bộ kit bán trên thị trường thường sử dụng những cột có ái lực với chỉ DNA, với ưu điểm đơn giản, ít tốn thời gian và cho sản phẩm DNA có độ tinh sạch cao, tuy nhiên, các sản phẩm thương mại này lại có giá thành cao, vượt khả năng tài chính của các phòng thí nghiệm nhỏ. Bên cạnh đó, nhà sản xuất chỉ cung cấp các dung dịch pha sẵn và quy trình tách chiết mà không nêu rõ thành phần hóa chất; do đó, không thể kiểm soát cũng như không thể áp dụng các biện pháp loại bỏ hóa chất một cách an toàn và vệ sinh.



Hình 4. Kết quả điện di về khảo sát các quy trình tách chiết DNA.

1. Thang DNA 1 kb plus; 2. Quy trình 1; 3. Quy trình 2; 4. Quy trình 3; 5. Quy trình 4; 6. Đối chứng âm.

Quy trình đề xuất của Hue et al. (2012) [12] cho vạch DNA trên gel agarose 1% là sáng nhất, phù hợp với nồng độ DNA thu được từ quy trình này là 18,95 ng/ μ l. Đây là quy trình thu được lượng DNA cao nhất trong các quy trình tách chiết khảo sát. Tuy nhiên, độ tinh sạch của quy trình đề xuất bởi các tác giả này (1,69), thấp hơn so với quy trình xây dựng trong báo cáo (1,94) và bộ kit (1,97). Hơn nữa, quy trình này tốn khá nhiều thời gian cho việc thay đổi nhiệt độ ủ proteinase K ở hai mức nhiệt độ 85°C và 65°C đều sử dụng hai loại dung dịch đệm chiết khác nhau. Đối với quy trình chúng tôi đề xuất có thể lượng sản phẩm DNA thu được không nhiều so với Hue et al. (2012) [12], nhưng vẫn đảm bảo chất lượng về độ nguyên vẹn và độ tinh sạch. Một ưu điểm nữa là quy

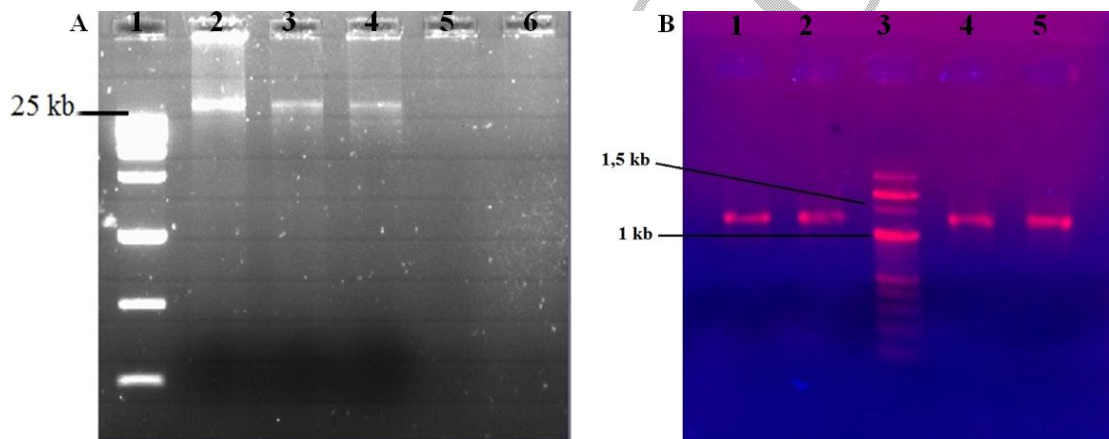
trình chỉ cần một loại dung dịch đệm chiết và một nhiệt độ ủ ổn định là 50°C. Như vậy, quy trình tách chiết DNA từ lông chó đề xuất đơn giản, tiết kiệm thời gian, lợi thế về mặt giá thành, phù hợp với điều kiện ở hầu hết các phòng thí nghiệm nhưng chất lượng sản phẩm DNA thu nhận vẫn đảm bảo, phục vụ tốt cho các nghiên cứu tiếp theo.

Xét về sự đơn giản, quy trình tách chiết DNA được đề xuất bởi tác giả Guan et al. (2013) [10] tỏ ra ưu thế hơn cả. Tế bào lông bị phân hủy bởi các hóa chất có trong bột giặt để giải phóng DNA vào dung dịch. Thực tế trong thử nghiệm, do không có chính xác các bột giặt như đã dùng trong nghiên cứu của Guan, chúng tôi đã sử dụng bột giặt OMO có sẵn ở Việt Nam. Kết quả đo OD và điện di cho thấy, dịch DNA thu thập được có giá trị OD cao (2,67),

nhưng ngoài DNA thu được, mẫu còn chứa nhiều protein, RNA và các thành phần khác của tế bào do không có bước tinh sạch DNA. Phản ứng PCR sử dụng DNA thu thập được từ phương pháp tách chiết này có tỷ lệ thành công thấp (6/30 mẫu). Quy trình này có lợi thế về tiết kiệm thời gian và mức độ đơn giản, nhưng DNA thu được khó sử dụng cho các nghiên cứu sâu hơn vì còn lẫn nhiều tạp chất.

Khảo sát độ nhạy của quy trình tách chiết

Chúng tôi tiến hành tách chiết DNA với số lượng mẫu khác nhau, lần lượt là 20 sợi, 10 sợi, 5 sợi và 1 sợi để kiểm tra độ nhạy của quy trình. Thử nghiệm được thực hiện theo quy trình tách chiết DNA đã được xây dựng dựa theo các kết quả khảo sát về thời gian, nhiệt độ hoạt động tối ưu của proteinase K và loại muối dùng để kết tủa DNA.



Hình 5. Kết quả điện di về khảo sát độ nhạy của quy trình tách chiết DNA (A) và Kết quả PCR đoạn trình tự vùng CR trên DNA ty thể của chó (B)

- A: 1. Thang DNA 1kb plus; 2. Mẫu DNA thu được từ 20 sợi lông; 3. Mẫu DNA thu được từ 10 sợi lông; 4. Mẫu DNA thu được từ 5 sợi lông; 5. Mẫu DNA thu được từ 1 sợi lông; 6. Đối chứng âm.
B: 1. Mẫu DNA thu được từ 1 sợi lông; 2. Mẫu DNA thu được từ 5 sợi lông; 3. Thang DNA 1 kb; 4. Mẫu DNA thu được từ 10 sợi lông; 5. Mẫu DNA thu được từ 20 sợi lông.

Qua kết quả điện di cho thấy, độ sáng của băng DNA có sự tuyến tính, giảm dần theo số lượng lông. Điều này phù hợp vì lượng lông càng ít thì lượng DNA trong lông càng thấp, khiến nồng độ DNA thấp. Đồng thời, lượng protein keratin cũng như các thành phần tạp chất khác trong dung dịch càng thấp thì chất lượng DNA càng tinh sạch.

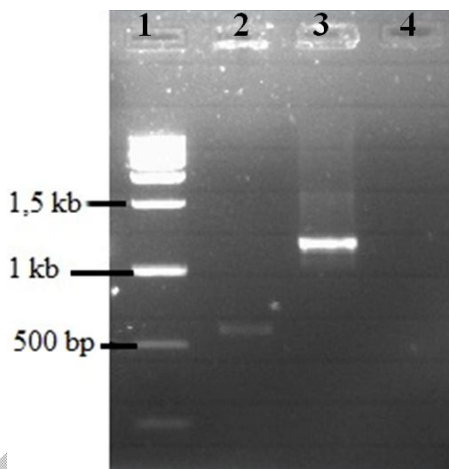
Quy trình tách chiết DNA xây dựng chỉ sử dụng 5 sợi lông đã có thể thu được DNA (2,2

ng/ μ l) với độ tinh sạch cao (1,9) và có thể quan sát được trên gel agarose. Mẫu DNA tách từ 1 sợi lông tuy không thể quan sát trên gel agarose bằng mắt nhưng kết quả OD cho thấy, có dấu vết của DNA với nồng độ 0,2 ng/ μ l và độ tinh sạch là 2,0 (hình 5A). Nồng độ DNA suy được từ trị số OD trong trường hợp này quá thấp, có thể độ tin cậy không cao nhưng cũng chỉ ra rằng, dịch DNA có thể được sử dụng cho phản ứng PCR vốn cần lượng DNA ban đầu rất thấp.

Để kiểm tra khả năng này, chúng tôi đã thực hiện phản ứng PCR khuếch đại đoạn trình tự dài khoảng 1.213 bp vùng CR trên DNA ty thể chó với các DNA nguyên liệu được tách chiết từ thử nghiệm trên. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, DNA thu được từ chỉ 1 sợi lông cũng đủ làm nguyên liệu để thực hiện phản ứng PCR (hình 5B).

Kiểm tra sản phẩm DNA tổng số

Chúng tôi đã tiến hành hai phản ứng PCR độc lập, một để khuếch đại một vùng DNA trên nhiễm sắc thể Y của chó đực; và một phản ứng khuếch đại vùng CR trên DNA ty thể chó. Sản phẩm PCR thu được có kích thước 674 bp (trong trường hợp nhiễm sắc thể Y) và 1.232 bp (trong trường hợp vùng CR) được ghi nhận trên bảng điện di cho thấy, phản ứng PCR thành công, hay nói cách khác, DNA nhân và DNA ty thể của chó có trong mẫu tách chiết. Các phản ứng PCR được lặp lại 10 lần với các mẫu lông chó khác nhau đều cho kết quả tương tự như ở hình 6.



Hình 6. Kết quả PCR vùng DNA trên nhiễm sắc thể Y và vùng CR trên mtDNA của chó.

1. Thang DNA 1 kb plus; 2. Mẫu DNA khuếch đại vùng DNA trên nhiễm sắc thể Y; 3. Mẫu DNA khuếch đại từ vùng CR trên mtDNA; 4. Đối chứng âm.

Để khẳng định tính chính xác của sản phẩm PCR, chúng tôi đã chọn ngẫu nhiên 1 sản phẩm vùng CR và 1 sản phẩm vùng nhiễm sắc thể Y để giải trình tự. Trình tự DNA sau khi được hiệu chỉnh sẽ được kiểm tra độ tương đồng với

các trình tự đã được công bố và lưu trữ trong GenBank bằng chương trình BLAST.

Kết quả BLAST cho thấy, trình tự DNA ty thể truy vấn có độ tương đồng cao (99%) với các DNA ty thể của các cá thể thuộc chó nhà (*Canis lupus familiaris*) đã được công bố trước đó. Tương tự, trình tự vùng nhiễm sắc thể Y sau khi được giải và hiệu chỉnh cũng đã được kiểm tra với BLAST, kết quả cũng cho thấy, có sự tương đồng 100% với một vùng trình tự DNA trên nhiễm sắc thể Y của chó nhà đã được công bố. Như vậy, phản ứng PCR trước đó đã khuếch đại chính xác vùng DNA ty thể và một vùng DNA trên nhiễm sắc thể Y của chó. Quy trình này có thể được áp dụng để tách chiết DNA từ lông có cấu trúc tương tự của nhiều loài động vật có vú khác nhau. Quy trình tách chiết DNA này được thử nghiệm với nguyên liệu là lông lợn, tóc người cũng đã cho hiệu quả tách chiết khá tốt khi quan sát qua điện di. Tuy nhiên, dịch DNA thu được trong trường hợp ở tóc người có màu đen do còn nhiều sắc tố melanin là yếu tố có thể kìm hãm phản ứng PCR. Vì vậy, để có thể áp dụng quy trình vào việc tách chiết DNA từ tóc người, đặc biệt là tóc đen, cần bổ sung bước loại bỏ sắc tố (và cả thuốc nhuộm tóc, nếu có) để nâng cao chất lượng DNA thu được.

Quy trình tách chiết DNA được xây dựng cho hiệu quả tách chiết cao từ nguồn nguyên liệu là lông chó, DNA thu được có độ tinh sạch cao và có thể làm nguyên liệu cho phản ứng PCR sau đó. Sự đơn giản của quy trình tách chiết với một mức nhiệt độ ủ mẫu (50°C), thời gian thực hiện quy trình khoảng 150 phút, phù hợp với các phòng thí nghiệm, với những thiết bị tối thiểu như một máy ly tâm, một bể ổn nhiệt và một tủ lạnh âm sâu. Mặc dù có độc tính nhưng phenol, chloroform vẫn được sử dụng nhiều trong các quy trình tách chiết DNA khác nhau, có lẽ là do rẻ tiền hơn so với việc sử dụng các vật liệu khác. Tuy nhiên, để cải thiện, cần giảm đáng kể việc sử dụng các chất nói trên.

KẾT LUẬN

Quy trình tách chiết DNA từ lông chó đã được xây dựng với hiệu quả tách chiết cao, có thể thu được DNA tổng số (cả DNA nhân và DNA ty thể) từ một sợi lông. DNA thu được có

độ tinh sạch cao, có thể làm nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Sự đơn giản, thời gian ngắn của quy trình phù hợp với các phòng thí nghiệm với những thiết bị tối thiểu. Sự thành công của quy trình sẽ giải quyết được các vấn đề khó khăn trong thu thập DNA, làm tiền đề cho việc thúc đẩy nhanh các nghiên cứu trên chó, cụ thể là các nghiên cứu trên chó Phú Quốc và chó H'Mông ở Việt Nam. Quy trình có thể mở rộng áp dụng thử nghiệm trên lông các loài động vật khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alberts C. C., Ribeiro-Paes J. T., Aranda-Selverio G., Cursino-Santos J. R., Moreno-Cotulio V. R., Oliveira A. L., Porchia B. F., Santos W. F., Souza E. B., 2010. DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids. *Genet. Mol. Res.*, 9(4): 2429-2435.
2. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389-3402.
3. Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W., 2010. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 38(Database issue): D46-51.
4. Berti A., Virgili A., Zignale G., Serafini M., Lago G., 2003. Cyt-b analysis and hair comparison in serial robbery cases. *International Congress Series*, 1239(2003): 905-909.
5. Campos P. F., Gilbert T. M., 2012. DNA extraction from keratin and chitin. In: Shapiro B., Hofreiter M. (eds), *Ancient DNA: Methods and Protocols*, Humana Press: Totowa, NJ., pp. 43-49.
6. Ding Z. L., Oskarsson M., Ardalan A., Angleby H., Dahlgren L. G., Tepeli C., Kirkness E., Savolainen P., Zhang Y. P., 2012. Origins of domestic dog in southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity (Edinb)*, 108(5): 507-514.
7. Duan Z., Andronescu M., Schutz K., Lee C., Shendure J., Fields S., Noble W. S., Anthony Blau C., 2012. A genome-wide 3C-method for characterizing the three-dimensional architectures of genomes. *Methods*, 58(3): 277-288.
8. Graffy E. A., Foran D. R., 2005. A simplified method for mitochondrial DNA extraction from head hair shafts. *J Forensic Sci.*, 50(5): 1119-1122.
9. Gross M. M., Strezoska Ž., Kelley M. L., 2015. A CRISPR-Cas9 gene engineering workflow: generating functional knockouts using Edit-R™-Cas9 and synthetic crRNA and tracrRNA. Application Note.
10. Guan Z., Zhou Y., Liu J., Jiang X., Li S., Yang S., Chen A., 2013. A simple method to extract DNA from hair shafts using enzymatic laundry powder. *PLoS One*, 8(7): e69588.
11. Gundry R. L., Allard M. W., Moretti T. R., Honeycutt R. L., Wilson M. R., Monson K. L., Foran D. R., 2007. Mitochondrial DNA analysis of the domestic dog: control region variation within and among breeds. *J Forensic Sci.*, 52(3): 562-572.
12. Hue N. T., Chan N. D. H., Phong P. T., Linh N. T. T., Giang N. D., 2012. Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hair roots. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(1): 21-26.
13. Kumar R., Singh P. J., Nagpure N. S., Kushwaha B., Srivastava S. K., Lakra W. S., 2007. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Indian J Exp Biol.*, 45(11): 992-997.
14. Li Q., Liu Z., Li Y., Zhao X., Dong L., Pan Z., Sun Y., Li N., Xu Y., Xie Z., 2008. Origin and phylogenetic analysis of Tibetan Mastiff based on the mitochondrial DNA sequence. *J Genet Genomics*, 35(6): 335-340.
15. Linch C. A., Whiting D. A., Holland M. M., 2001. Human hair histogenesis for the

- mitochondrial DNA forensic scientist. *J Forensic Sci.*, 46(4): 844-853.
16. Maniatis, T., Fritsch E. F., Sambrook J., 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
17. Nass M. M., 1969. Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single- and double-length circular DNA. *J. Mol. Biol.*, 42(3): 521-528.
18. Pang J. F., Kluetsch C., Zou X. J., Zhang A. B., Luo L. Y., Angleby H., Ardalan A., Ekstrom C., Skolleremo A., Lundeberg J., Matsumura S., Leitner T., Zhang Y. P., Savolainen P., 2009. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol. Biol. Evol.*, 26(12): 2849-2864.
19. Pfeiffer I., Volkel I., Taubert H., Brenig B., 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci Int.*, 141(2-3): 149-151.
20. Powell B. C., Rogers G. E., 1997. The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair. In: Jolles P., Zahn H., Hoker H. (eds). *Formation and structure of human hair*. Birkhauser, Basel, pp 59-148
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5463-5467
22. Vila C., Savolainen P., Maldonado J. E., Amorim I. R., Rice J. E., Honeycutt R. L., Crandall K. A., Lundeberg J., Wayne R. K., 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276(5319): 1687-1689.
23. The Fédération Cynologique Internationale: FCI breeds nomenclature. <http://www.fci.be/en/Nomenclature/>. (Tra cứu ngày 25/7/2015).

A SIMPLE PROTOCOL FOR DNA EXTRACTION FROM DOG HAIRS

Thai Ke Quan¹, Nguyen Van Tu¹, Huynh Van Hieu²,
Nguyen Thanh Cong³, Tran Hoang Dung³

¹Saigon University, *quan.tk@cb.sgu.edu.vn

²Department of Agricultural sciences and Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

³Institute of High-Tech Nguyen Tat Thanh, Nguyen Tat Thanh University

SUMMARY

The Phu Quoc ridgeback dog is a Vietnamese valuable dog breed, which is in need of study for genetic resource conservation. In previously published studies, the common material for DNA extraction is blood. However, the invasive blood sampling technique is difficult to apply due to either dog's uncomfortable reaction or the disagreement of the dog owners. For easier in material sampling, a protocol for DNA extraction from dog hairs is proposed using common chemicals such as SDS, proteinase K... Hair roots (1 cm in length) are treated with proteinase K included lysis buffer in 60 minutes. Released DNA in the solution is separated with others by phenol:chloroform mixture, and precipitated in absolute ethanol. Extracted DNA is then dissolved in distilled water and stored at -30°C. With this protocol, good-quality DNA is extracted and can be used in further studies with PCR, sequencing techniques. The protocol is simple, highly sensitive, i.e. can yield DNA from only one hair shaft.

Keywords: DNA extraction, dog hairs, mitochondrial DNA, nuclear DNA, PCR, Phu Quoc ridgeback dog.

Ngày nhận bài: 19-9-2015