

XÂY DỰNG THANG CHUẨN DNA ĐỂ XÁC ĐỊNH CÁC BĂNG DNA KÍCH THƯỚC NHỎ

Võ Thị Thương Lan[✉], Lê Thị Thanh

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

[✉]Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: vothithuonglan@hus.edu.vn

Ngày nhận bài: 25.10.2020

Ngày nhận đăng: 20.12.2020

TÓM TẮT

Thang chuẩn DNA được sử dụng thường quy trong các phòng thí nghiệm, xét nghiệm về sinh học phân tử. Bên cạnh nguồn thang chuẩn do các hãng thương mại cung cấp, các thang chuẩn được nhiều phòng thí nghiệm chủ động tạo ra (home-made DNA ladders). Trong bài báo này, chúng tôi đưa ra quy trình sản xuất thang chuẩn SY-60 gồm 7 băng, băng nhỏ nhất có kích thước 60 bp, hỗ trợ cho các thang chuẩn thương mại 50 bp. Đoạn DNA 60 bp có vị trí nhận biết của *EcoRI* ở hai đầu 5' và 3' được tổng hợp nhân tạo bằng PCR, tự nối với nhau nhờ T4 DNA ligase và được tách dòng tạo plasmid pSY-60. Cắt không hoàn toàn pSY-60 với enzyme giới hạn *EcoRI* tạo nên thang chuẩn SY-60 gồm 7 băng, băng nhỏ nhất 60 bp, bước nhảy giữa 2 băng là 60 bp. Quy trình sản xuất thang chuẩn SY-60 đơn giản, chi phí thấp, thích hợp cho việc xác định kích thước nhỏ của các đoạn DNA, cDNA khuếch đại bởi phản ứng PCR.

Từ khóa: cắt không hoàn toàn với enzyme giới hạn, DNA lặp, plasmid tái tổ hợp, thang chuẩn DNA thương mại, thang chuẩn SY- 60 bp

MỞ ĐẦU

Thang chuẩn DNA là hỗn hợp các phân tử DNA có kích thước khác nhau, được sử dụng trong điện di nhằm đánh giá kích thước và nồng độ đoạn DNA chưa biết. Vì vậy, trong nghiên cứu sinh học phân tử, thang chuẩn DNA không thể thiếu trong hầu hết các kỹ thuật, từ đơn giản như điện di xác định kích thước sản phẩm DNA đến các kỹ thuật phức tạp hơn như xác định đột biến, haplotype, genotype, lập bản đồ di truyền và nhiều ứng dụng khác (Griffiths *et al.*, 1998). Thang chuẩn DNA thường được phân làm hai loại dựa vào nguyên liệu sử dụng để xây dựng thang chuẩn và tính chất của các băng tạo thành. Đó là DNA marker và DNA ladder. DNA marker được tạo ra từ nguyên liệu ban đầu là những DNA có sẵn trong tự nhiên (DNA genome của thể thực khuẩn lambda, Φ X174, plasmid pBR322, ...), được cắt với các enzyme

giới hạn tạo thành hỗn hợp các đoạn DNA có kích thước xác định (Parker *et al.*, 1977; Cooney, 1994; Polyarush *et al.*, 2003). Vì sử dụng nguồn DNA sẵn có nên kích thước các băng tạo ra cũng như bước nhảy giữa các băng không theo ý muốn mà phụ thuộc vào các vị trí sẵn có của enzyme giới hạn và kích thước của phân tử DNA ban đầu. Khác với DNA marker, DNA ladder gồm tập hợp các băng DNA có kích thước chênh lệch nhau theo một bước nhảy nhất định và kích thước của mỗi băng có thể thay đổi theo ý muốn. Đa số phương pháp tạo DNA ladder không sử dụng DNA có sẵn trong tự nhiên mà sử dụng DNA tái tổ hợp (Henrici *et al.*, 2017). Hiện nay, DNA ladder như thang chuẩn 50 bp, thang chuẩn 100 bp, thang chuẩn 1 kb do các hãng thương mại cung cấp (ThermoFisher Scientific, Invitrogen...). Để giảm chi phí và chủ động nguồn thang chuẩn, nhiều quy trình sản xuất thang chuẩn bước nhảy

100 bp dựa vào phản ứng PCR đơn môi hoặc PCR đa môi được các phòng nghiên cứu sinh học phân tử công bố (Abbasian *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Tuy nhiên, việc thực hiện từng phản ứng PCR đơn môi đòi hỏi thời gian, trong khi PCR đa môi yêu cầu phối trộn các cặp môi phức tạp. Vì vậy, một số loại thang chuẩn DNA bước nhảy nhỏ đã được tạo ra bằng kỹ thuật tách dòng tạo plasmid tái tổ hợp (Wang *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2012). Đầu tiên đoạn DNA có kích thước mong muốn được tạo ra nhờ nối các đoạn nhỏ với nhau có chứa các vị trí nhận biết của một (hoặc nhiều) enzym giới hạn; các vị trí cách nhau theo kích thước xác định. DNA tái tổ hợp được tách dòng và nhân bản trong *E. coli*, nhờ đó một lượng lớn plasmid tái tổ hợp dễ dàng thu nhận để cắt với enzym giới hạn tạo nên thang chuẩn DNA.

Thang chuẩn DNA 100 bp gồm 10 băng từ 100 bp đến 1000 bp tạo ra khi sử dụng plasmid mang đoạn chèn được cắt không hoàn toàn với *SmaI* đã được chúng tôi thiết kế và sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm (Lan *et al.*, 2012). Để hoàn thiện bộ thang chuẩn DNA gồm các băng kích thước nhỏ hơn đáp ứng cho yêu cầu thí nghiệm, chúng tôi thiết kế thành công thang chuẩn DNA gồm 7 băng từ 60 bp đến 420 bp. Toàn bộ quy trình thiết kế sử dụng các kỹ thuật cơ bản như PCR, nối, tách dòng và cắt với

enzym giới hạn. Do đó, bất cứ phòng thí nghiệm nào đều có thể áp dụng và thay đổi quy trình để tạo nên thang chuẩn có số lượng băng và kích thước mỗi băng theo mong muốn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Plasmid pJET1.2, hai môi của vector và nguyên liệu cần thiết để tách dòng sản phẩm PCR trong plasmid pJET1.2 được cung cấp trong bộ kit CloneJET™ PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific).

Phương pháp

Quy trình thiết kế thang chuẩn DNA 60 bp được trình bày trong Hình 1. Các phương pháp chính được sử dụng để thực hiện quy trình này gồm:

Phản ứng PCR tổng hợp đoạn DNA 60 bp

Phản ứng PCR sử dụng 2 môi 60 bp-F và 60 bp-R được thiết kế dựa vào trình tự nucleotide của gen *Brevinin-2R* (Mehrnejad *et al.*, 2007) bằng chương trình miễn phí OligoCalc (<http://biotools/OligoCalc>). Đầu 5' của 2 môi có trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *EcoRI*. Đầu 3' của hai môi có trình tự bổ sung với nhau. Trình tự của 2 môi được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của 2 môi sử dụng để tổng hợp đoạn DNA 60 bp. Vị trí cắt của *EcoRI* ở đầu 5' được in nghiêng gạch dưới, trình tự bổ sung đầu 3' được in đậm.

Tên môi	Trình tự (5'-3')
20 bp-F	<u>GAATT</u> CTGGCCACTGAGTTTGC
20 bp-R	<u>GAATTC</u> ACTGGCCACTGAG
60 bp-F	CTC <u>GAATT</u> CTGGCCACTGAGTTTGCAGCTAG CTTTGT
60 bp-R	GAC <u>GAATTC</u> ACTGGCCACTGAGTTTTCTCCTGA ACAAAG
Trình tự sản phẩm PCR	CTC <u>GAATT</u> CTGGCCACTGAGTTTGCAGCTAG CTTTGTTC AGGAGAAA ACT CACTGGCCAGTGT <u>GAATTC</u> GC

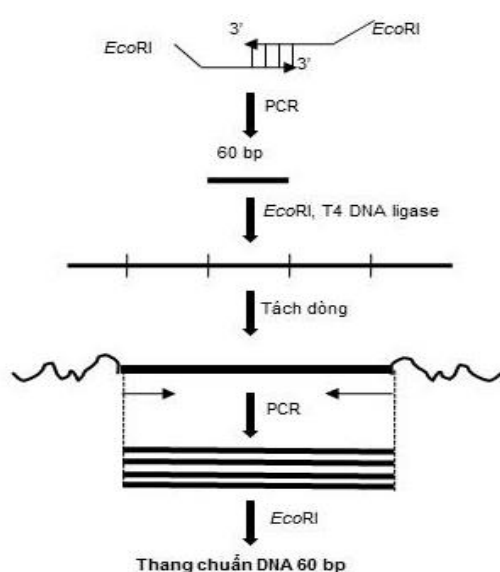
Phản ứng tự nối (self-ligation)

Sản phẩm PCR 60 bp được cắt với *EcoRI*, được tinh sạch bằng cồn tuyệt đối và sử dụng

cho phản ứng tự nối với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase. Các thành phần tham gia phản ứng cắt với *EcoRI* và phản ứng nối nhờ T4 DNA ligase được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Thành phần và điều kiện phản ứng cắt với *EcoRI* và phản ứng nối nhờ T4 DNA ligase.

Phản ứng cắt với <i>EcoRI</i>		Phản ứng nối sử dụng T4 DNA ligase	
Thành phần	Thể tích (μL)	Thành phần	Thể tích (μL)
Đệm <i>EcoRI</i> 10X	3	Đệm T4 DNA ligase 10X	1,2
<i>EcoRI</i> (NEB)	1	DNA T4 ligase (NEB)	1
DNA 60 bp	14	DNA 60 bp (100 ng)	3
Nước	12	Nước	6,8
Tổng thể tích	30	Tổng thể tích	12
Ủ ở 37 °C trong 2 giờ		Ủ ở 12 °C qua đêm	



Hình 1. Sơ đồ thiết kế thang chuẩn DNA 60 bp.

Tách dòng sản phẩm tự nối, sàng lọc plasmid tái tổ hợp

Sản phẩm tự nối được tách dòng trong plasmid pJET1.2 sử dụng bộ sinh phẩm CloneJET™ PCR Cloning Kit, tuân thủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các khuẩn lạc trên môi trường có kháng sinh được sử dụng trực tiếp để kiểm tra đoạn chèn bằng phản ứng PCR. Khuẩn lạc sử dụng cặp mồi 20 bp-F/20 bp-R (Bảng 1). Khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp có đoạn chèn kích thước lớn nhất được nuôi cấy qua đêm để tách plasmid.

Phản ứng cắt không hoàn toàn với enzyme *EcoRI*

Đoạn chèn 420 bp được khuếch đại từ

plasmid tái tổ hợp bằng cặp mồi 20 bp-F/20 bp-R, sau đó được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Năm trăm ng (500 ng) sản phẩm tinh sạch được cắt với 1 μL *EcoRI* (10 U/ μL) ở 37°C, 4 phút, biến tính enzyme ở 70°C, 30 phút trong thể tích 500 μL. Muối (10 μL) sản phẩm cắt được điện di trên gel polyacrylamide 10 %, nhuộm EtBr và chụp ảnh ở bước sóng 260 nm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng đoạn DNA tạo ra trong phản ứng tự nối sản phẩm PCR 60 bp

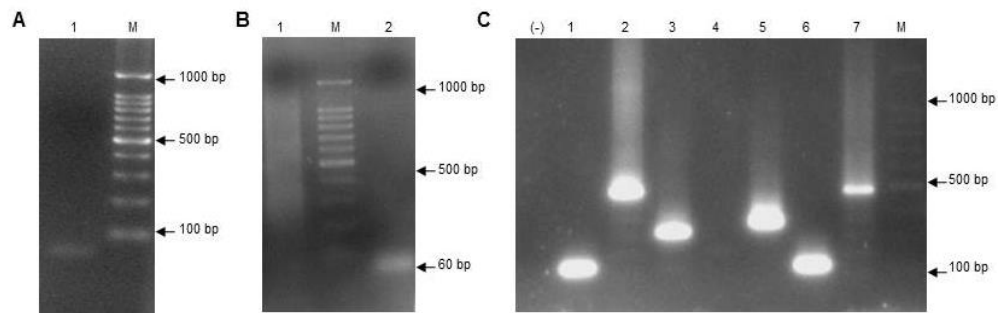
Sản phẩm PCR 60 bp được khuếch đại từ đoạn gen *Brevinin-2R* (Hình 2A). Việc lựa chọn một đoạn gen bất kỳ biết trước trình tự được khai thác dễ dàng từ ngân hàng dữ liệu DataBank hoặc từ các trình tự mà phòng thí nghiệm đã nghiên cứu. Gen *Brevinin-2R* được lựa chọn vì đã tách dòng trong nghiên cứu chúng tôi thực hiện trước đây. Sau khi xử lý với *EcoRI*, sản phẩm PCR được tự nối với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase. Sử dụng cặp mồi 20 bp-F/20 bp-R và sản phẩm nối làm khuôn cho phản ứng PCR, kết quả điện di cho vệt smear kéo dài từ 100 bp đến khoảng 1 kb (Hình 2B) chứng tỏ các đoạn 60 bp đã được nối với nhau. Sản phẩm phản ứng nối được tách dòng trong plasmid pJET1.2. Sàng lọc plasmid tái tổ hợp từ 7 khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch LB bổ sung ampicilin (Hình 2C) bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi 20 bp-F/20 bp-R cho thấy số đoạn 60 bp tự nối với nhau nhiều hoặc ít tạo nên các đoạn chèn có kích thước khác nhau. Lựa

chọn khuẩn lạc số 2 có kích thước đoạn chèn lớn nhất để nuôi cấy tách chiết plasmid tái tổ hợp (gọi là pSY-60). Kết quả giải trình tự đoạn chèn trong pSY-60 (kết quả không hiển thị) cho thấy kích thước đoạn chèn là 420 bp lặp lại 7 lần trình tự 60 bp như thiết kế và có chứa 8 vị trí nhận biết của *EcoRI*.

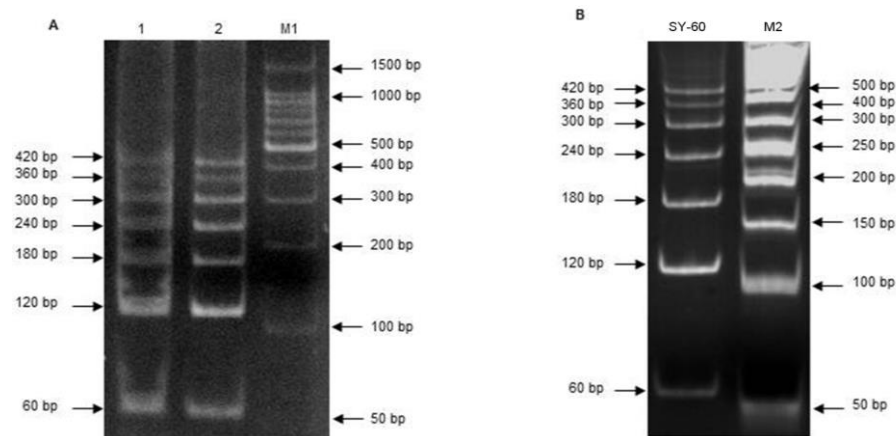
Tạo thang chuẩn DNA có bước nhảy 60 bp

Do plasmid pSY-60 có kích thước lớn hơn 3600 bp (3194 bp của pJET1.2 + 420 bp của đoạn chèn) nên cần phải sử dụng lượng lớn plasmid để cắt với *EcoRI* thì mới quan sát được các băng DNA thang chuẩn kích thước nhỏ (Lan *et al.*, 2012). Để khắc phục nhược điểm này, đoạn chèn 420 bp được khuếch đại sử dụng khuôn plasmid pSY-60 và cặp mỗi 20 bp-F/20

bp-R (Hình 1). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), xác định nồng độ trên máy NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Đầu tiên, 15 ng DNA 420 bp được cắt với 0,1U *EcoRI* trong thời gian 3 và 5 phút (Hình 3A). Kết quả cho thấy 7 băng DNA, băng nhỏ nhất có kích thước 60 bp, bước nhảy giữa các băng cách đều nhau 60 bp. Thử nghiệm cắt 500 ng sản phẩm tinh sạch với 10 U/μL *EcoRI* trong thể tích 500 μL, ủ ở 37°C, 4 phút, biến tính enzyme ở 70°C, 30 phút. Điện di 10 μL sản phẩm cắt trên gel acrylamid (Hình 3B) cho thấy thang chuẩn SY-60 có các băng rõ ràng, cách đều nhau. Như vậy thang chuẩn SY-60 cho phép xác định các băng DNA kích thước nhỏ trong các nghiên cứu về DNA, DNA tái tổ hợp.



Hình 2. Tách dòng sản phẩm tự nối của đoạn 60 bp. (A) Sản phẩm khuếch đại 60 bp (giếng 1) sử dụng cặp mỗi 60 bp-F/60 bp-R vừa là mỗi vừa là khuôn. (B) Khuếch đại sản phẩm tự nối khi có T4 DNA ligase (giếng 1) và khi không có T4 DNA ligase (giếng 2) với cặp mỗi 20 bp-F/20 bp-R. (C) Sàng lọc khuẩn lạc (số 1-7) mang plasmid tái tổ hợp pSY-60 với cặp mỗi 20 bp-F/20 bp-R. M: thang chuẩn 100 bp (Fermentas). Đường chạy (-): đối chứng âm không có DNA khuôn.



Hình 3. Thang chuẩn SY-60 điện di trên gel acrylamide. (A) Mười lăm ng (15 ng) DNA 60 bp cắt với 0,1 U *EcoRI* ở thời gian 3 phút (giếng 1) và 5 phút (giếng 2). (B) Mười μL/500 μL sản phẩm SY-60 gồm 500 ng DNA 420 bp và 1 μL *EcoRI* trong 4 phút. M1, M2: thang chuẩn DNA 100 bp và 50 bp (Fermentas).

Một khi plasmid tái tổ hợp mang đoạn chèn 420 bp đã được tạo ra, chi phí ước tính ban đầu để có 50 đường chạy trên gel điện di cần hết khoảng 3 USD (75 000 đồng). Số lượng các băng của thang chuẩn thương mại nhiều hơn cho nên không thể so sánh chi phí giữa thang chuẩn SY-60 với thang chuẩn thương mại. Tuy nhiên, thang chuẩn tự sản xuất hỗ trợ và thay thế thang chuẩn thương mại phù hợp với điều kiện của từng phòng thí nghiệm. Vì vậy, tự sản xuất các thang chuẩn và ngày càng hoàn thiện chúng đã được các phòng thí nghiệm quan tâm. Gần đây, Henrici *et al.*, (2017) đã thiết kế thành công 2 plasmids tái tổ hợp khi cắt với enzyme giới hạn tạo nên 2 thang chuẩn 100 bp và 1 kb với chi phí chỉ khoảng 1/10 giá thành thang chuẩn thương mại.

Thang chuẩn DNA được sử dụng rất rộng rãi trong các thí nghiệm, xét nghiệm liên quan đến DNA nhằm mục đích xác định kích thước các băng DNA chưa biết trên các gel điện di thông thường hoặc điện di xung đẩy hay điện di mao quản. Hiện nay, hầu hết các loại thang chuẩn DNA bao gồm kích thước rất nhỏ (10 bp DNA step Ladder, Promega) cho đến kích thước rất lớn (λ ladder PFG, NEB) đều do các hãng thương mại cung cấp. Việc sử dụng ngoại tệ để nhập thang chuẩn của các đại lý cũng như thời gian chờ đợi sau khi đặt mua đã tác động đến tiến độ, kinh phí của nhiều nghiên cứu, đặc biệt đối với các phòng thí nghiệm ở các nước đang phát triển. Vì vậy, tự thiết kế các loại thang chuẩn (được gọi là homemade DNA markers) có kích thước khác nhau và có nhu cầu sử dụng thường quy như thang chuẩn 50 bp, 100 bp và 1000 bp đã được nhiều phòng thí nghiệm công bố. Kỹ thuật PCR sử dụng từng cặp mồi riêng biệt để khuếch đại các đoạn DNA có kích thước khác nhau và phối trộn chúng tạo thang chuẩn có lẽ là đơn giản nhất mặc dù tốn thời gian. Nhiều tác giả đã công bố quy trình tạo ra thang chuẩn 100 bp bằng kỹ thuật này (Abbasian *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2008; Abdel-Fattah and Gaballa, 2006). Kết hợp các cặp mồi với nhau trong phản ứng PCR đa mồi tuy đòi hỏi thời gian tối ưu điều kiện thành phần phản ứng nhưng đem lại hiệu quả cao để sản

xuất thang chuẩn 100 bp (Chang *et al.*, 2008; Abdel-Fattah and Gaballa, 2006). Ngoài ra, thang chuẩn DNA được tạo ra dựa vào thiết kế đoạn DNA chứa các trình tự lặp cách đều nhau hoặc chứa các trình tự kích thước khác nhau, nối với nhau bởi vị trí nhận biết của enzyme giới hạn cũng được công bố. Tuy nhiên, quy trình sản xuất thang chuẩn theo phương pháp này phức tạp vì phải thực hiện rất nhiều lần tách dòng trong các loại vector khác nhau. Ye *et al.* (2010) đã sử dụng 9 lần tách dòng liên tiếp để tạo ra thang chuẩn DNA 100 bp có 10 băng. Điều lưu ý, thang chuẩn home made DNA tạo ra từ DNA tái tổ hợp đều được cắt hoàn toàn với 1 hoặc nhiều enzyme giới hạn.

Thang chuẩn 100 bp tạo ra từ việc cắt không hoàn toàn một đoạn DNA tái tổ hợp chứa 10 trình tự 100 bp lặp lại đã được chúng tôi thiết kế thành công (Lan *et al.*, 2012). Quy trình này đơn giản, chi phí thấp, đặc biệt sử dụng các kỹ thuật thường quy, đòi hỏi ít thời gian (1 phản ứng PCR tạo trình tự 100 bp, 1 phản ứng PCR tạo đoạn DNA tái tổ hợp 1000 bp, 1 lần tách dòng). Phát triển giải pháp này, chúng tôi đã thu nhận đoạn trình tự 60 bp và tạo được đoạn DNA tái tổ hợp 420 bp. Chúng tôi chưa thu nhận được đoạn DNA tái tổ hợp 600 bp chứa 10 đoạn 60 bp lặp lại mặc dù đã thành công khi thu nhận đoạn DNA 1000 bp chứa 10 đoạn 100 bp lặp lại (Lan *et al.*, 2012). Để khắc phục nhược điểm này, thử nghiệm khuếch đại trình tự 60 bp khác nhau, sử dụng các loại DNA ligase có hiệu suất nối khác nhau (Bauer *et al.*, 2017) là hướng chúng tôi sẽ tiếp tục hoàn thiện.

Chúng tôi đã áp dụng thành công giải pháp công nghệ riêng để tạo nên thang chuẩn DNA có các kích thước nhỏ phù hợp với nhu cầu sử dụng rất lớn của loại thang chuẩn này trong các thí nghiệm thường quy như xác định kích thước các băng DNAs, cDNAs, sản phẩm của kỹ thuật PCR. Trong tương lai, thiết kế các thang chuẩn 500 bp, 1 kb sử dụng công nghệ DNA tái tổ hợp tiếp tục được chúng tôi quan tâm nhằm chủ động tạo ra các sản phẩm công nghệ phục vụ cho nghiên cứu và ứng dụng trong cận lâm sàng.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế thành công thang chuẩn DNA (SY-60) gồm 7 băng, băng có kích thước nhỏ nhất là 60 bp và băng lớn nhất là 420 bp; 7 băng này có bước nhảy cách nhau 60 bp. Thang chuẩn SY-60 có thể hỗ trợ, thay thế thang chuẩn thương mại nhằm chủ động nguồn cung cấp và giảm chi phí cho các thí nghiệm thường quy liên quan đến DNA.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin cảm ơn sự nhận xét, góp ý của các thành viên phòng thí nghiệm Sinh Y, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, giúp các tác giả hoàn thiện quy trình thiết kế thang chuẩn DNA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abbasian M, Seyedi HE, Boroujeni ZK, Mofid MR (2015) Easy method for production of a home-made DNA ladder in every laboratory. *Adv Biomed Res* 4:70 - 75.

Abdel-Fattah YR, Gaballa AA (2006) Synthesis of DNA ladder by polymerase chain reaction and optimization of yield using response surface methodology *Biotechnol* 5: 166–172.

Bauer RJ, Zhelkovsky A, Bilotti K, Crowell LE, Evans TC, McReynolds LA, Lohman GJS (2017) Comparative analysis of the end-joining activity of several DNA ligases. *PLoS ONE* 12(12): e0190062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190062>.

Chang M, Wang JH, Lee HJ (2008). Laboratory production of 100 base pair DNA molecular weight markers. *J. Biochem Biophys Methods* 70: 1199–1202.

Cooney CA (1994) Techniques and high resolution DNA size markers for pulsed field gel electrophoresis. *Mol Biotechnol* 2: 119–127.

Griffiths RA, Barber MD, Johnson PE., Gillbard SM, Haywood MD, Smith CD, Arnold J, Burke T, Urquhart AJ, Gill P (1998) New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int Legal Medicine* 111: 267-272.

Henrici RC, Pecan T J, Johnston JL, Tan S (2017) The pPSU plasmids for generating DNA molecular weight markers. *Sci Reports* 7, Article number: 2438.

Lan VTT, Loan PTT, Duong PAT, Thanh LT, Ha NT, Thuan TB (2012) Straightforward procedure for laboratory production of DNA ladder. *J. Nucleic Acids*, Volume 2012, Article ID 254630, 4 pages. doi:10.1155/2012/254630.

Mehrnejad F, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Maroufi B, Asoodeh A, Doustdar F (2007) PCR-based gene synthesis, molecular cloning, high level expression, purification, and characterization of novel antimicrobial peptide, Brevinin-2R, in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 149:109-18.

Parker RC, Watson RM, Vinograd J (1977) Mapping of closed circular DNAs by cleavage with restriction endonucleases and calibration by agarose gel electrophoresis. *PAS* 74: 851–855.

Polyarush SV, Egamberdiev SS, Mansurov DR, Azimova SS (2003). Preparation of DNA markers based on *E. coli* plasmid DNA. *Chem Nat Compounds* 39: 592–594.

Wang TY, Guo L, Zhang J (2010) Preparation of DNA ladder based on multiplex PCR technique. *J. Nucleic Acids*, Volume 2010, Article ID 421803, 3 pages, 2010.

Ye C, Gu J, Chen S, Deng A, Li YZ, Li D (2010) Unit cloning and amplification as novel and universal strategies for complex vector construction and small DNA fragment preparation. *Electrophoresis* 31:2929–2935.

CONSTRUCTION OF DNA LADDER FOR DETERMINATION OF SMALL SIZE DNA FRAGMENTS

Vo Thi Thuong Lan, Le Thi Thanh

University of Science, Vietnam National University

SUMMARY

DNA marker is commonly used to determine the size of DNA fragments by electrophoresis in

routine molecular biology laboratories. In this study, we report a new procedure to prepare recombinant plasmids pSY-60 which was partially digested by one restriction enzyme for generating DNA markers of 7 fragments from 60 to 420 bp. The procedure included a synthesis of 60 bp DNA fragment with *EcoRI* sites at both ends using PCR extension, self-ligation of the 60 bp fragments and subcloning the ligated product into plasmid, generating recombinant pSY-60. Once being cloned, 500 ng of 420 bp fragment purified from 100 μ L PCR product was incompletely digested by *EcoRI*, sufficiently producing to 50 acrylamide gels. Our procedure for production of DNA markers could be simple, time saving and inexpensive in comparison with current ones widely used in most laboratories.

Keywords: incomplete digestion with restriction enzyme, recombinant plasmid, Commercial DNA ladders, SY 60 bp ladder