



Chương 8

Các kỹ thuật phân tích trong Sinh học phân tử



08/05/2017 2:50 CH

1

Nguyễn Hữu Trí



Tách chiết DNA

- Để thu nhận DNA tinh sạch cần loại bỏ những thành phần tạp nhiễm, mà quan trọng nhất là protein.
- Sự tách chiết DNA dựa trên nguyên tắc hòa tan khác nhau của các phân tử khác nhau (nucleic acid/protein) trong hai pha không hòa tan (phenol, chloroform/nước).
- Mục đích là thu được các phân tử nucleic acid ở trạng thái nguyên vẹn tối đa, không bị phân hủy bởi các tác nhân cơ học hay hóa học.
- Các nucleic acid cần được tách chiết trong điều kiện nhiệt độ thấp để ức chế hoạt động của các enzyme nội bào (DNase và RNase).
- Sau công đoạn tách chiết, nucleic acid tinh sạch nằm trong một thể tích dung dịch lớn. Sự tủa kết hợp với ly tâm cho phép thu nhận nucleic acid dưới dạng cặn tủa để bảo quản và khi cần có thể hòa lại trong nước theo nồng độ mong muốn.

08/05/2017 2:50 CH

2

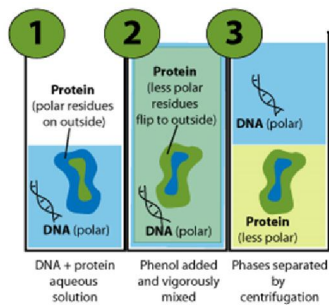
Nguyễn Hữu Trí





Tách chiết DNA

- **Bước 1: phá màng tế bào, màng nhân**
- **Bước 2: loại protein**
- **Bước 3: thu hồi nucleic acid**



08/05/2017 2:50 CH

3

Nguyễn Hữu Trí



Tách chiết DNA

- Phá màng tế bào, màng nhân: nghiền tế bào, mô trong một hỗn hợp chất tẩy (SDS) và proteinase để phá vỡ màng tế bào, màng nhân, giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.
 - Chất tẩy là phân tử lưỡng cực, sẽ kết hợp với protein màng và các phân tử phospholipid làm phá vỡ cấu trúc màng.
 - Chất tẩy ion hóa có tác dụng phá màng mạnh, chất tẩy không ion hóa có tác dụng phá màng nhẹ hơn.
- Loại protein: lắc mẫu trong dung dịch phenol:chloroform để biến tính protein đồng thời không hòa tan nucleic acid. Protein bị biến tính không hòa tan trong pha nước có chứa nucleic acid và sau khi li tâm sẽ tủa thành một lớp nằm giữa pha nước và pha phenol:chloroform. Thu hồi nucleic acid trong pha nước.
- Tủa nucleic acid: nhằm thu nhận nucleic acid dưới dạng cô đặc để bảo vệ chúng khỏi sự phân hủy của các enzyme và khi cần có thể hòa lại trong nước theo nồng độ mong muốn. Có thể tủa trong ethanol hoặc isopropanol. Sau đó li tâm để thu nhận lại nucleic acid. Cặn tủa được rửa trong ethanol 70% để loại bỏ các muối hoặc các dấu vết của isopropanol.

08/05/2017 2:50 CH

4

Nguyễn Hữu Trí

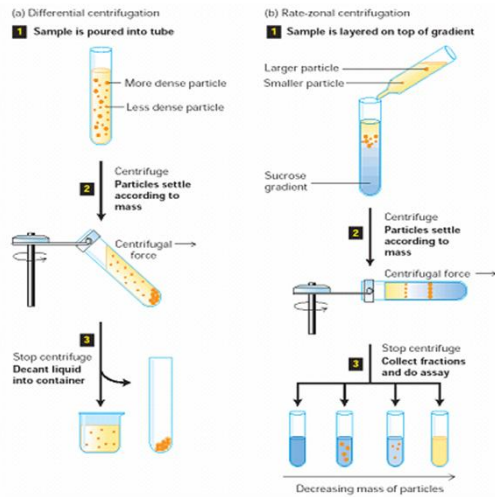




Tách chiết DNA

Ly tâm phân đoạn (a) và phân đoạn vùng (b) phân tách các trình tự trong hỗn hợp dựa trên khối lượng của chúng.

Thời gian và lực ly tâm được xác định cho từng nhóm phân tử. Dung dịch ly tâm có tỷ trọng thấp hơn các phân tử cần phân tách.



08/05/2017 2:50 CH

5

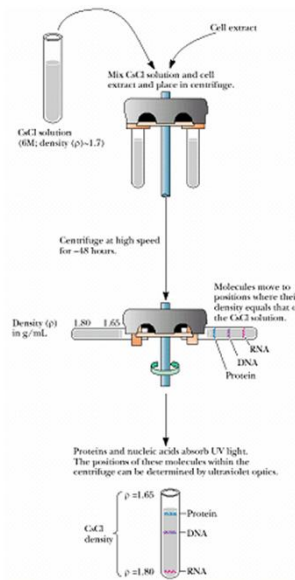
Nguyễn Hữu Trí



Tách chiết DNA

Ly tâm đẳng tỷ trọng (isopycnic) phân tách các phân tử trong hỗn hợp dựa trên tỷ trọng của chúng. Thời gian và lực ly tâm là chung cho các nhóm phân tử. Dung dịch ly tâm có tỷ trọng với giá trị đi từ thấp đến cao hơn tỷ trọng của các phân tử cần phân tách.

Ly tâm trên gradient liên tục CsCl: trong quá trình ly tâm, dung dịch CsCl sẽ tự động hình thành một gradient đẳng tỷ trọng với tỷ trọng tăng dần từ miệng ống xuống đáy ống. Dưới tác động của lực ly tâm, các nucleic acid di chuyển trong ống và đến vị trí có tỷ trọng bằng với tỷ trọng của chính nó sẽ ngừng lại và hình thành một lớp cố định trong ống. Lớp này được thu nhận lại sau ly tâm.



08/05/2017 2:50 CH

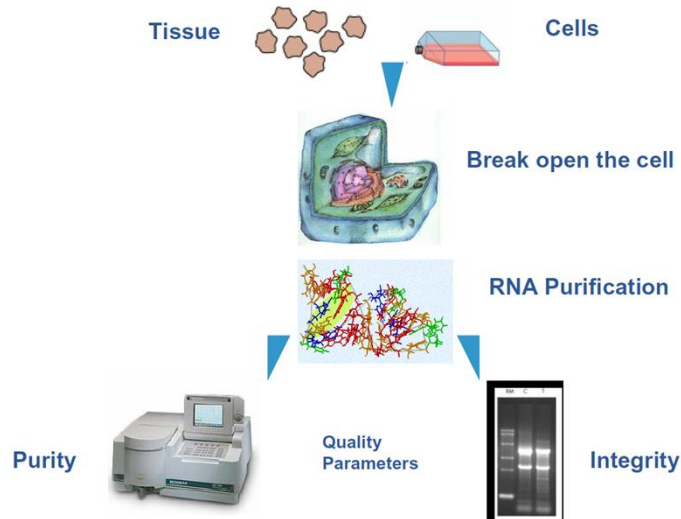
6

Nguyễn Hữu Trí





Tách chiết RNA



Phương pháp sắc ký

- **Sắc ký ái lực**: trên poly U-Sepharose hay oligodT-cellulose, dùng để tinh sạch mRNA.
- **Sắc ký lọc gel** dùng trong phân tách các nucleic acid và nucleotic tự do sau quá trình tạo mẫu dò (probe) đánh dấu.
- **Sắc ký trao đổi ion** trên vi cột để thu hồi những lượng rất nhỏ DNA.
- **Sắc ký lỏng hiệu suất cao**: có độ phân giải rất cao, được dùng trong tinh sạch các oligonucleotide tổng hợp, plasmid, phân tách các đoạn DNA.





Các phương pháp định tính và định lượng thô nucleic acid

- Điện di gel
 - Agarose
 - Polyacrylamide
- Quang phổ kế: đo mật độ quang (OD – Optical density)

08/05/2017 2:50 CH

9

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp điện di

- Mục tiêu:
 - Định tính: sự hiện diện, cấu hình phân tử, kích thước
 - Định lượng: hàm lượng tương đối so với thang hàm lượng
 - Chuẩn bị: thu hồi đoạn DNA (dùng tạo dòng, ...)
- Nguyên tắc: dựa vào đặc tính cấu trúc của các nucleic acid: tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt của một điện trường nên sẽ di chuyển về cực dương của điện trường.
- Tính linh động của phân tử khi di chuyển trong điện trường phụ thuộc vào khối lượng phân tử và nồng độ các chất cấu thành gel.
- Kiểu điện di: Agarose, điện di trong trường xung (PFGE - Pulse Field Gel Electrophoresis).

08/05/2017 2:50 CH

10

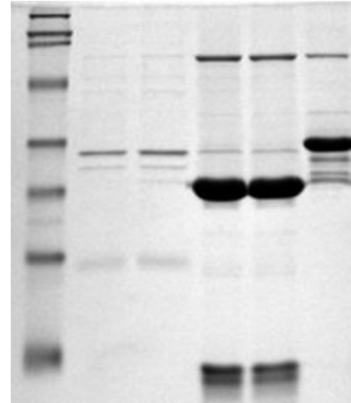
Nguyễn Hữu Trí





Điện di - Electrophoresis

- Chuẩn bị mẫu, gel (agarose, polyacrylamide...), bồn điện di, buffer, dung dịch điện di...
- Nạp mẫu
- Chạy điện di
- Nhuộm gel.



08/05/2017 2:50 CH

11

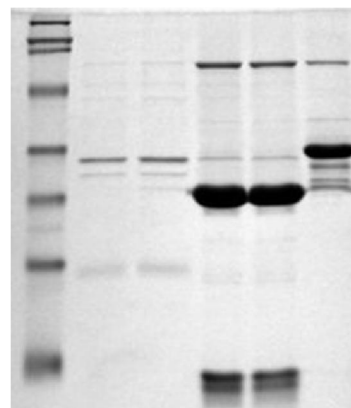
Nguyen Huu Tri



Điện di trên gel

- Chuẩn bị mẫu, gel (agarose, polyacrylamide...), bồn điện di, buffer, dung dịch điện di...
- Nạp mẫu
- Chạy điện di
- Nhuộm gel.

Acrylamide concentration % (w/v)	Range of separation	
	DNA (bp)	Protein (kDa)
3.5	1000–2000	—
5	80–500	>1000
8	60–400	300–1000
12	40–200	50–300
15	20–150	10–80
20	5–100	5–30



08/05/2017 2:50 CH

12

Nguyen Huu Tri





Chất nhuộm gel - Stain

Stain	Use	Detection limit ^a (ng)
Amido black	Proteins	400
Coomassie blue	Proteins	200
Ponceau red	Proteins (reversible)	200
<i>Bis</i> -1-anilino-8-Naphthalene sulphonate (ANS)	Proteins	150
Nile Red	Proteins (reversible)	20
SYPRO orange	Proteins	10
Fluorescamine (protein treated <i>prior to</i> electrophoresis)	Proteins	1
Silver chloride	Proteins/DN	1
SYPRO red	Proteins	0.5
Ethidium bromide	DNA/RNA	10

08/05/2017 2:50 CH

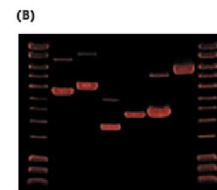
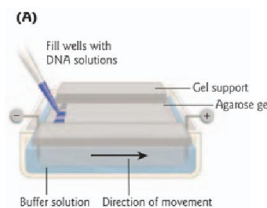
13

Nguyễn Hữu Trí



Điện di trên gel agarose

- Gel agarose là loại gel thông dụng nhất, thường dùng để phân tách những đoạn có kích thước 0,5-20 kb.
- Điện di theo phương nằm ngang
- Độ phân giải thay đổi khi nồng độ agarose hay loại agarose thay đổi.
- Phát hiện bằng phóng xạ tự ghi, nhuộm ethidium bromide. Chất này có khả năng gắn xen vào giữa các base của nucleic acid và sẽ phát huỳnh quang dưới tia tử ngoại.
- Ứng dụng: phát hiện 1 trình tự DNA, phân tích hỗn hợp các trình tự DNA (Southern blot), chuẩn bị nguyên liệu



08/05/2017 2:50 CH

14

Nguyễn Hữu Trí





Điện di trên gel polyacrylamide

- Được dùng để tách các đoạn có kích thước nhỏ, dưới 1000 cặp base.
- Điện di theo phương thẳng đứng
- Độ phân giải cao, phân biệt được những trình tự chỉ cách nhau 1 nucleotide.
- Phương pháp phát hiện: DNA – phóng xạ tự ghi, xanh methylene, ethidium bromide, protein – xanh Coomassie, nhuộm nitrate bạc.
- Ứng dụng: tinh sạch các oligonucleotic tổng hợp, giải trình tự DNA, tách các trình tự DNA có kích thước gần bằng nhau, SDS-PAGE (phân tích protein)



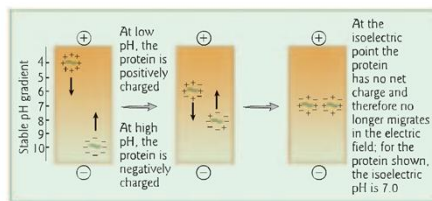
08/05/2017 2:50 CH

15

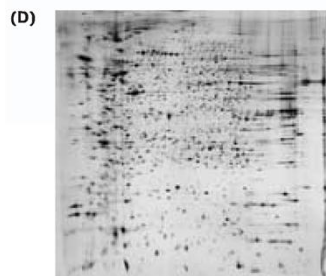
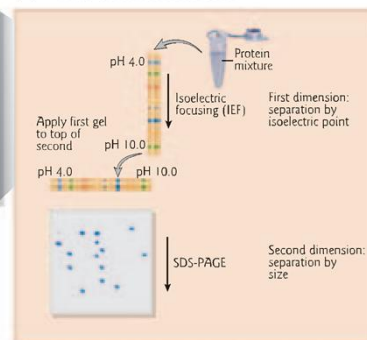
Nguyễn Hữu Trí



Điện di 2 chiều



(C) Two-dimensional PAGE



08/05/2017 2:50 CH

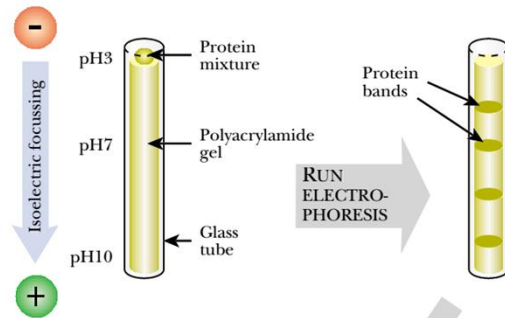
16

Nguyễn Hữu Trí





Điện di 2 chiều



- REMOVE GEL FROM TUBE
- TREAT WITH SDS
- PLACE TUBE GEL ONTO SLAB GEL

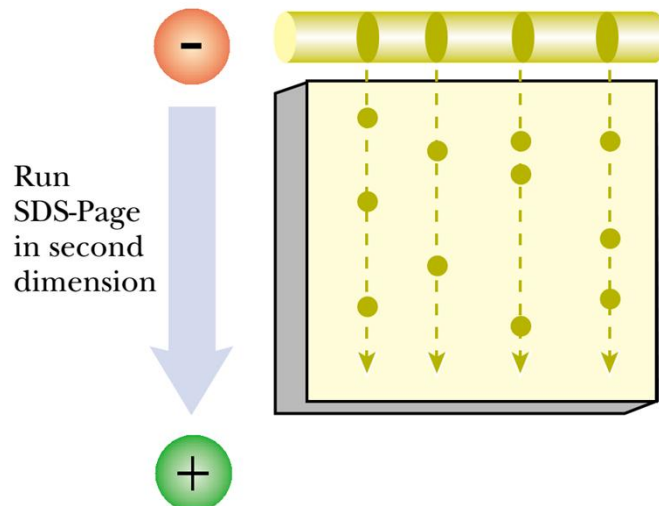
08/05/2017 2:50 CH

17

Nguyễn Hữu Trí



Điện di 2 chiều



08/05/2017 2:50 CH

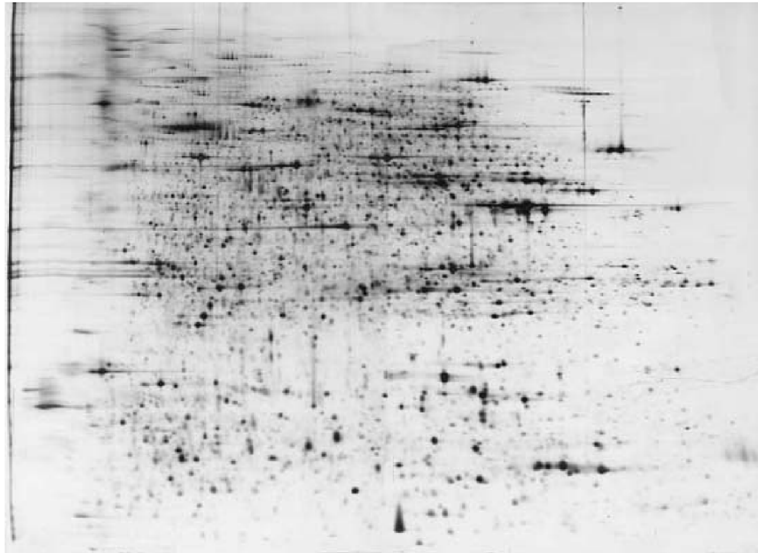
18

Nguyễn Hữu Trí





Điện di 2 chiều



08/05/2017 2:50 CH

19

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp định lượng bằng quang phổ kế

- Cho phép định lượng tương đối nồng độ nucleic acid có trong mẫu.
- Nguyên tắc: dựa vào sự hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260 nm của các base.
- Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm của các mẫu đo cho phép xác định nồng độ nucleic acid trong mẫu dựa vào mối tương quan:
- Một đơn vị OD_{260nm} tương ứng với nồng độ:
 - 50 $\mu\text{g/ml}$ cho một dung dịch DNA sợi đôi
 - 40 $\mu\text{g/ml}$ cho một dung dịch DNA hay RNA sợi đơn
- Định tính: độ sạch dựa trên tỉ số OD_{260}/OD_{280} , tính chất của nucleic acid (mạch đôi/đơn) (280 nm là bước sóng ở đó các protein có mức độ hấp thụ cao nhất).

08/05/2017 2:50 CH

20

Nguyễn Hữu Trí





Các phương pháp lai phân tử

08/05/2017 2:50 CH

21

Nguyễn Hữu Trí



Cơ sở của sự lai phân tử

- Khi một phân tử DNA mạch đôi được đun lên một nhiệt độ vượt quá nhiệt độ nóng chảy (T_m) thì hai mạch sẽ tách rời nhau do sự phá vỡ các liên kết H giữa hai mạch.
- Sau khi hai mạch tách rời, nếu nhiệt độ phản ứng được làm giảm từ từ cộng với điều kiện thí nghiệm thích hợp, chúng sẽ bắt cặp trở lại. Hiện tượng này được gọi là sự lai phân tử.
- Đặc điểm của sự lai phân tử:
 - ✓ Đặc hiệu tuyệt đối: sự tái bắt cặp chỉ xảy ra giữa hai trình tự hoàn toàn bổ sung với nhau.
 - ✓ Các trình tự bổ sung có thể là DNA hay RNA, dẫn đến sự hình thành các phân tử DNA-DNA, RNA-RNA hay các phân tử lai DNA-RNA

08/05/2017 2:50 CH

22

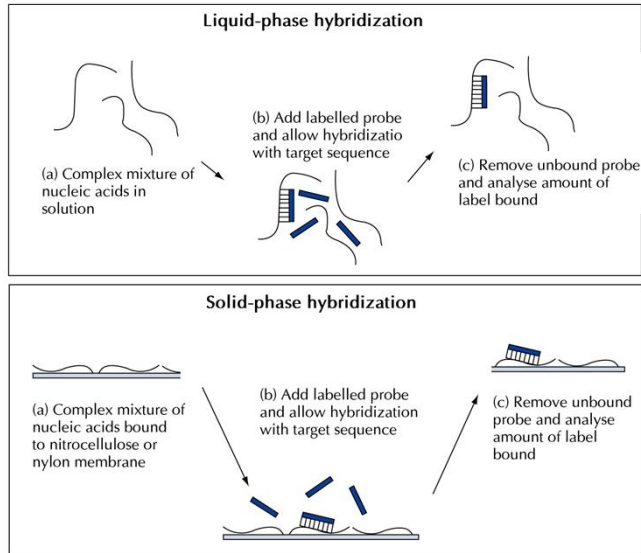
Nguyễn Hữu Trí





Các kiểu lai phân tử

- Lai trên pha lỏng
- Lai trên pha rắn
- Lai tại chỗ



08/05/2017 2:50 CH



Các kiểu lai phân tử

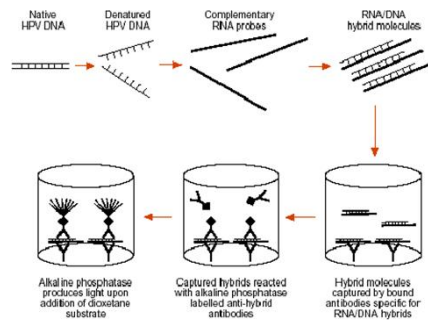


Figure 1. Hybrid Capture II method for the detection of human papillomavirus (HPV) DNA.

Lai trong pha lỏng: Các trình tự cần lai nằm trong pha lỏng, là một dung dịch đậm. Sự lai phân tử xảy ra khi các trình tự này gặp nhau do chuyển động nhiệt và khi nhiệt độ môi trường thấp hơn T_m . Phương pháp này được sử dụng để phát hiện các trình tự tương đồng (giữa các loài hay trong một cá thể).

08/05/2017 2:50 CH

24

Nguyễn Hữu Trí

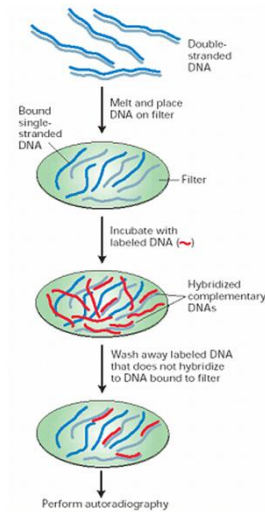




Các kiểu lai phân tử

Lai trong pha rắn: Một trong hai trình tự cần lai được cố định trên giá thể rắn (màng lai). Phát hiện phân tử lai thông qua mẫu dò (probe) có đánh dấu đồng vị phóng xạ.

Ba kĩ thuật lai trên pha rắn thông dụng là Southern blot, Northern blot, Dot blot.



08/05/2017 2:50 CH

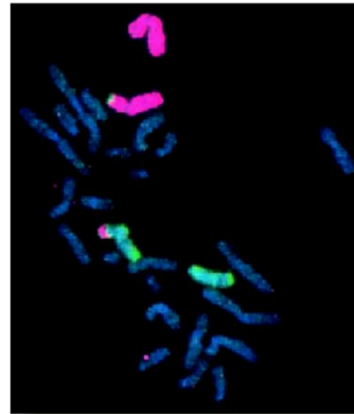
25

Nguyễn Hữu Trí



Các kiểu lai phân tử

Lai tại chỗ: Trình tự nucleic acid cần tìm không được tách chiết ra khỏi mô hay tế bào. Quá trình lai với mẫu dò đã được đánh dấu và phát hiện các phân tử lai được thực hiện ngay trên nhiễm sắc thể, tế bào hay lát cắt mô.



08/05/2017 2:50 CH

26

Nguyễn Hữu Trí





Southern blot

- Nguyên tắc của Southern blot là màng lai nitrocellulose có khả năng tiếp nhận DNA đã được biết từ lâu và đã được sử dụng trong các nghiên cứu lai axit nucleic khác nhau vào những thập niên 1950 và 1960.
- Đầu thập niên 1970, sự ra đời của phương pháp điện di trên gel đã cho phép các đoạn DNA được cắt bởi enzyme hạn chế có thể được phân tách dựa trên cơ sở kích thước của chúng.
- Từ đó bước phát triển tiếp theo của phương pháp là chuyển các đoạn DNA phân tách từ gel lên màng lai nitrocellulose.
- Phương pháp này được E. M. Southern mô tả tại Đại học Edingburgh vào năm 1975.

08/05/2017 2:50 CH

27

Nguyễn Hữu Trí



Southern blot

Southern blot bao gồm các bước cơ bản sau:

1. Cắt DNA bằng enzyme hạn chế thích hợp.
2. Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose.
3. Làm biến tính DNA ngay trên gel, DNA sợi kép sẽ được tách thành DNA sợi đơn. Chỉ DNA sợi đơn mới có thể chuyển lên màng lai.
4. Chuyển DNA đã biến tính lên màng lai (màng nitrocellulose hay màng nylon). Việc chuyển DNA thường được tiến hành bằng hoạt tính mao dẫn trong khoảng vải tiêng hoặc có thể dùng một thiết bị thấm chân không. Trong quá trình chuyển, vị trí các đoạn DNA vẫn được giữ nguyên không thay đổi.
5. Lai DNA đã được cố định trên màng với mẫu dò (probe) DNA có đánh dấu. Quá trình này dựa trên nguyên tắc bổ sung giữa DNA trên màng lai với mẫu dò. Để đánh dấu người ta thường sử dụng P³², biotin/streptavidin hoặc một mẫu dò phát quang sinh học.
6. Định vị các phân tử lai DNA-mẫu dò. Nếu sử dụng mẫu dò đánh dấu phóng xạ thì dùng phương pháp phóng xạ tự ghi (autoradiograph) để xác định, nếu sử dụng biotin/streptavidin thì dùng phương pháp so màu hoặc nếu sử dụng mẫu dò phát quang sinh học thì phát hiện bằng sự phát quang.

08/05/2017 2:50 CH

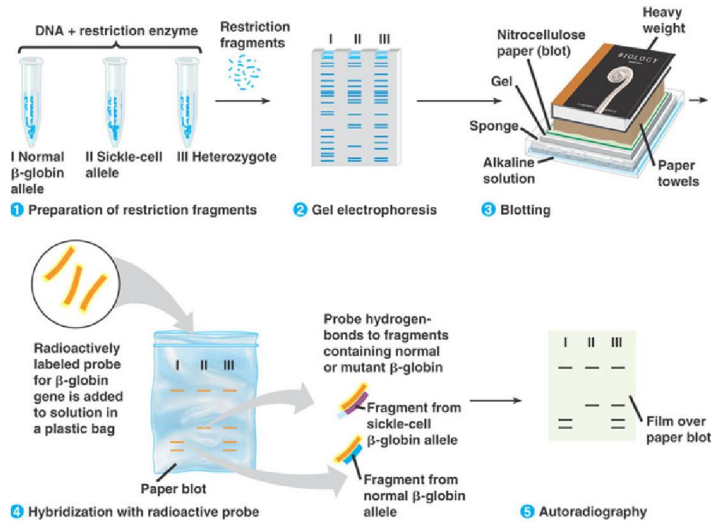
28

Nguyễn Hữu Trí





Southern blot



Northern Blot: RNA-DNA*(RNA*)

- Sau khi E. M. Southern mô tả phương pháp Southern blot vào năm 1975, Alwine đã dùng một phương pháp tương tự để xác định các đoạn RNA đặc biệt gọi là Northern blot vào năm 1977.
- Không cần phải cắt RNA bằng restriction enzyme.
- Dùng formaldehyde để phá cầu nối Hydrogen và biến tính RNA vì mạch đơn RNA sẽ tạo cấu trúc thứ cấp và gập cuộn.





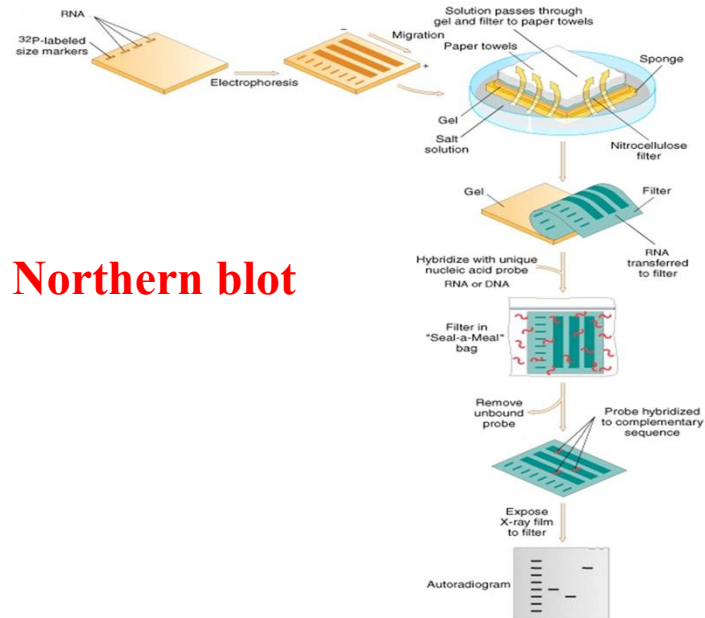
Northern blot

- Northern blot bao gồm các bước cơ bản sau:
 - Tách RNA (RNA tổng số hoặc chỉ mRNA) và xử lý với formaldehyde
 - RNA được phân tách bằng điện di trên gel agarose biến tính (có formaldehyde).
 - RNA sau khi đã phân tách được chuyển lên màng lai (các phân tử RNA giữ nguyên vị trí như ở trên gel), thông thường màng nitrocellulose được dùng, tuy nhiên có thể dùng màng nylon được tích điện dương.
 - RNA cố định trên màng được lai với mẫu dò DNA sợi đơn (hoặc RNA) có đánh dấu phóng xạ hoặc được gắn với một enzyme (alkalin phosphatase hoặc horseradish peroxidase) tạo thành phân tử lai RNA-DNA (hoặc RNA-RNA) sợi kép.
 - Vị trí của mẫu dò được phát hiện nhờ kỹ thuật phóng xạ tự ghi nếu nó được đánh dấu phóng xạ. Trong trường hợp mẫu dò được gắn với enzyme thì đem ủ với một cơ chất không màu. Enzyme liên kết với nó sẽ biến đổi thành một sản phẩm màu có thể nhìn thấy hoặc phát ra ánh sáng mà sẽ được phát hiện bằng phim X quang một cách trực tiếp.

08/05/2017 2:50 CH

31

Nguyễn Hữu Trí



Northern blot

08/05/2017 2:50 CH

32

Nguyễn Hữu Trí





Phương pháp PCR

- PCR (polymerase chain reaction-phản ứng tổng hợp dây chuyền nhờ polymease) là một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất trong lĩnh vực Sinh học phân tử. Phương pháp này do Kary Mullis phát minh vào năm 1985; được giới thiệu lần đầu tiên tại Hội thảo lần thứ 51 ở Cold Spring Harbor vào năm 1986 và ông đã nhận được giải thưởng Nobel Hoá sinh học vào năm 1993.
- Nguyên tắc của phương pháp PCR: dựa vào đặc tính hoạt động của DNA polymerase: cần sự hiện diện của những môi chuyên biệt để hoạt động tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn. Như vậy, nếu ta cung cấp hai môi chuyên biệt bắt cặp bổ sung với hai đầu của một trình tự DNA, ta sẽ chỉ tổng hợp đoạn DNA nằm giữa hai môi.
- Phương pháp PCR cho phép tổng hợp rất nhanh và chính xác từng đoạn DNA riêng biệt. Đây thực sự là phương pháp hiện đại và thuận tiện cho việc xác định sự có mặt của một gen nào đó trong tế bào với độ chính xác cao.

08/05/2017 2:50 CH

33

Nguyễn Hữu Trí



Ba giai đoạn trong một chu kỳ của phản ứng PCR

Giai đoạn biến tính (denaturation)

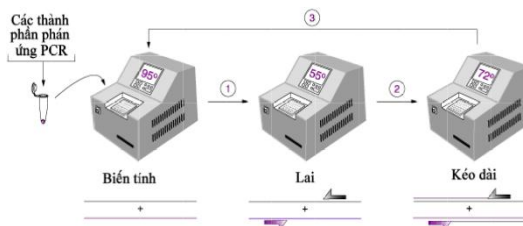
Trong giai đoạn này phân tử DNA mẫu bị biến tính ở nhiệt độ cao (thường là từ 94-95°C, lớn hơn nhiệt độ nóng chảy của phân tử) trong vòng 30 giây đến 1 phút, tất cả các liên kết hydro giữa hai mạch của phân tử bị bẻ gãy và tạo thành các DNA sợi đơn.

Giai đoạn lai (hybridization)

Nhiệt độ được hạ thấp (thường từ 40-70°C, thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của môi được sử dụng khoảng từ 3-5°C) cho phép các môi bám vào các phân tử DNA sợi đơn, đánh dấu phần DNA cần được khuếch đại. Giai đoạn này kéo dài từ 30 giây đến một phút.

Giai đoạn kéo dài (elongation)

Nhiệt độ được tăng lên đến 72°C giúp cho DNA polymerase xúc tác tổng hợp DNA tốt nhất. Công việc của DNA polymerase là di chuyển dọc theo DNA sợi đơn và sử dụng nó làm khuôn để tổng hợp sợi DNA mới bổ sung với DNA mẫu bằng cách kéo dài các phân tử đã được đánh dấu bởi các môi. Thời gian của giai đoạn này phụ thuộc vào kích thước của DNA mẫu, thường kéo dài từ 30 giây đến nhiều phút.





Các thành phần của phản ứng PCR

1. Primer (mồi):

- > Mồi là những đoạn DNA sợi đơn ngắn và cần thiết cho việc xúc tiến phản ứng dây chuyền tổng hợp DNA. Chúng bắt cặp bổ sung với một đầu của DNA mẫu và tạo ra vị trí bắt đầu tái bản. Các mồi này có chiều ngược nhau, bao gồm một mồi xuôi (forward primer) và một mồi ngược (reverse primer).
 - > Mồi là một chỉ tiêu quan trọng của phản ứng PCR để quyết định tính đặc trưng và hiệu quả của phản ứng. Do đó việc thiết kế mồi cần được tuân thủ một số nguyên tắc nhất định: dài khoảng 18-24 base; Tm của 2 mồi gần nhau; thành phần nucleotic của các mồi cân bằng tránh các cặp GC lặp đi lặp lại nhiều lần; mồi phải đặc trưng cho trình tự DNA cần khuếch đại; không hình thành primer dimer, không phải là trình tự lặp lại.
2. DNA bản mẫu (DNA template): hàm lượng đủ nhưng không quá cao, tinh sạch – không chứa các chất ức chế phản ứng (SDS, chất ức chế từ mẫu (hemoglobin, sắc tố, heparin, ...)). PCR vẫn cho kết quả tốt với DNA thu nhận trực tiếp từ tế bào hay những mẫu DNA không được bảo quản tốt.
3. Nồng độ $MgCl_2$: cần cho hoạt động của Taq polymerase, hàm lượng quá cao sẽ tạo nhiều sản phẩm ký sinh, quá thấp thì làm giảm hiệu quả nhân bản của enzyme. Nồng độ tối ưu phải được xác định cho từng phản ứng qua nhiều thử nghiệm.

08/05/2017 2:50 CH

35

Nguyễn Hữu Trí



Các thành phần của phản ứng PCR

4. dNTP: thành phần 4 loại dNTP phải cân bằng, sự mất cân bằng làm tăng các lỗi sao chép của polymerase; hàm lượng thường không đổi nhưng có thể thay đổi tùy điều kiện thực tế.
5. Enzyme polymerase chịu nhiệt
- Taq-polymerase là DNA polymerase chịu nhiệt sử dụng cho phản ứng PCR lần đầu tiên được bán trên thị trường. Taq-polymerase được nhà Vi sinh vật học Thomas Brock phát hiện ở *Thermus aquaticus* một loài vi khuẩn phát triển mạnh ở nhiệt độ cao. Enzyme chịu nhiệt này giúp giải quyết vấn đề của enzyme biến tính sau mỗi chu kỳ.
- Từ đó đến nay, một số vi sinh vật chịu nhiệt khác đã được khám phá và người ta đã tách chiết thêm được các DNA polymerase chịu nhiệt để sử dụng cho phản ứng PCR như Vent/DeepVent DNA polymerase (*Thermococcus litoralis*), Pfu DNA polymerase (*Pyrococcus furiosus*), Tth DNA polymerase (*Thermus thermophilus*), UItma DNA polymerase (*Thermotoga maritima*)...
6. Số lượng chu kỳ phản ứng tùy thuộc vào số lượng bản mẫu ban đầu, thông thường số lượng chu kỳ nhỏ hơn 40 cho một phản ứng PCR. Thời gian của từng chu kỳ phụ thuộc thiết bị và kích thước sản phẩm.
7. Thiết bị và dụng cụ cho phản ứng PCR: cần đáp ứng được nhu cầu thay đổi nhiệt độ thật nhanh và chính xác. Những cải tiến máy luân nhiệt quan tâm đến microtiter plate 96 giếng, các block nhiệt riêng biệt trong 1 máy, block dùng cho lam kính để tiến hành in situ PCR.

08/05/2017 2:50 CH

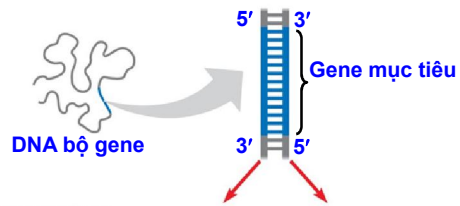
36

Nguyễn Hữu Trí

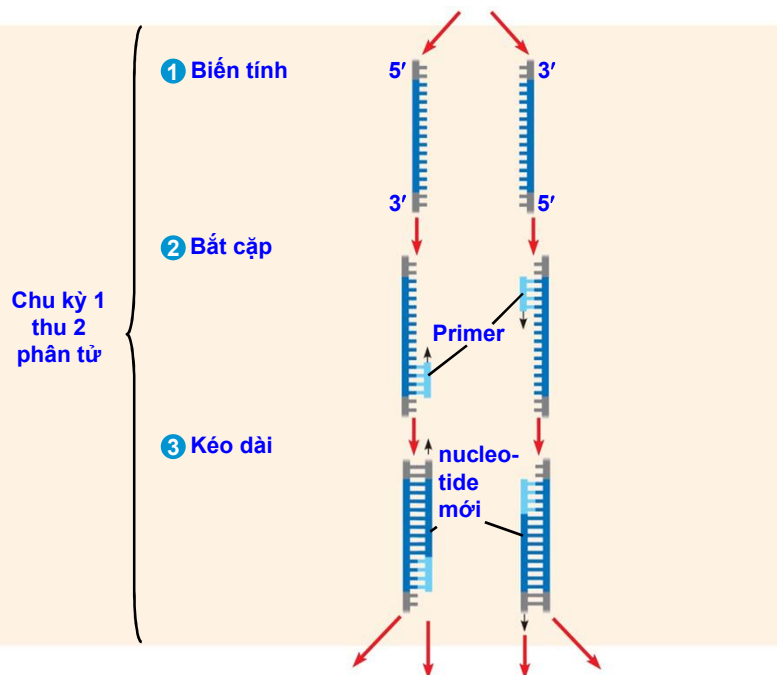




Phương pháp PCR



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

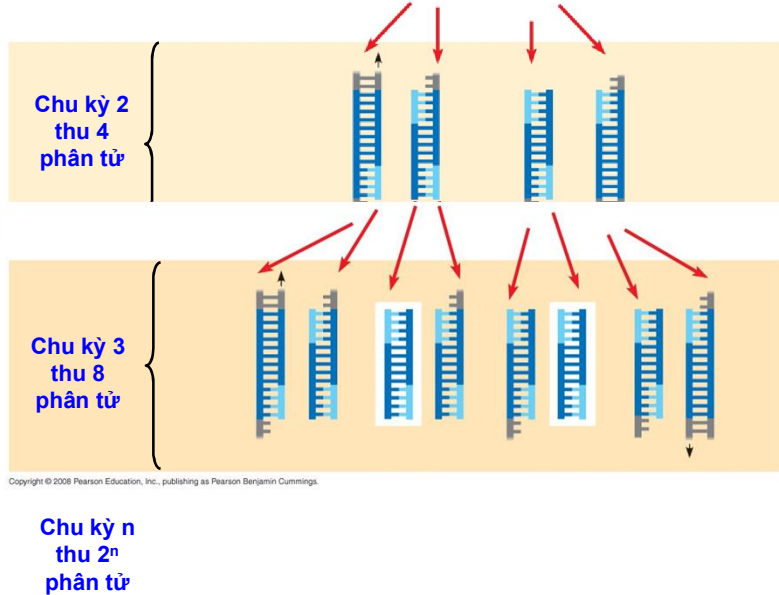


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.





Phương pháp PCR



Các ứng dụng của phương pháp PCR

Hiện nay thành tựu của PCR mở ra nhiều triển vọng cho sinh học phân tử, với nhiều ứng dụng trong sinh học, trong y khoa, trong nông nghiệp, ...

Một số ứng dụng có tính tổng quát:

- **Sản xuất mẫu dò:** PCR giúp sản xuất nhanh một lượng lớn mẫu dò đánh dấu khi thực hiện các phản ứng với cặp môi chuyên biệt và các nucleotide đánh dấu.
- **Khuyếch đại số lượng các RNA:** sử dụng kỹ thuật phối hợp RT-PCR (kết hợp enzyme phiên mã ngược và Taq polymerase; hoặc sử dụng Tth polymerase). RT-PCR cho phép nghiên cứu các mRNA thông tin tồn tại với hàm lượng rất thấp, không thể phát hiện bằng phương pháp cổ điển như Northern blot, ...
Kỹ thuật in situ RT-PCR cho phép khuyếch đại các RNA ngay trên mô và tế bào.
- **Định lượng bằng phương pháp PCR:** dùng để nghiên cứu các trình tự RNA hay DNA có số lượng bản sao rất thấp. Trình tự đích được khuyếch đại đồng thời với một trình tự chứng có nồng độ đã biết, sau phản ứng so sánh hàm lượng sản phẩm, và suy ra số lượng bản mẫu ban đầu.





Phương pháp giải trình tự (DNA sequencing)

- Phương pháp xác định vị trí sắp xếp các nucleotid trong phân tử DNA
 - Phương pháp Maxam và Gilbert
 - Phương pháp Sanger
 - Pyrosequencing
 - Array sequencing



Phương pháp Maxam và Gilbert

- Giải trình tự gen theo phương pháp hóa học. Lần đầu tiên công bố vào năm 1977.
- Nguyên tắc của phương pháp là dựa trên phản ứng hóa học thủy giải đặc hiệu, các DNA không tự xoắn lại với nhau, tạo thành tập hợp nhiều phân đoạn có kích thước khác nhau.
- Trước hết, phân tử DNA được đánh dấu đồng vị phóng xạ P32 ở đầu 5' của mạch đơn, tạo những đoạn đánh dấu có thể phát hiện bằng hình phóng xạ.
- Xử lý hóa học đặc hiệu phân hủy đặc trưng một loại nucleotide của mạch DNA đã đánh dấu phóng xạ, tạo các đoạn oligonucleotide có chiều dài hơn kém nhau 1 nucleotide được phát hiện bằng điện di. Kết quả các phản ứng hóa học xử lý mạch DNA được phát hiện bằng điện di trên gel polyacrylamid có thể xác định được trình tự mạch đơn.





Phương pháp Maxam và Gilbert

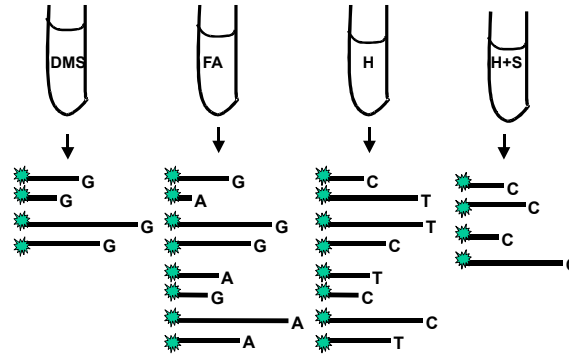
Mạch đơn đã đánh dấu phóng xạ có thể xử lý theo 4 nhóm phản ứng

- Nhóm phản ứng thứ nhất xử lý mạch đơn DNA bằng dimethyl sulphat làm đứt mạch tại G.

- Nhóm phản ứng thứ hai xử lý mạch đơn DNA bằng axit (pH=2) gây đứt mạch đơn tại A hoặc G.

- Nhóm phản ứng thứ ba xử lý mạch đơn DNA bằng hydrazin gây đứt mạch đơn tại T và C.

- Nhóm phản ứng thứ 4 xử lý mạch đơn DNA bằng hydrazin với nồng độ muối cao làm đứt mạch đơn tại C.

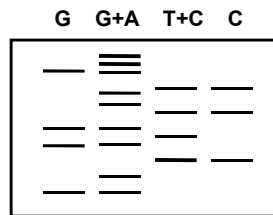


Phương pháp Maxam và Gilbert

Mảnh dài nhất



Mảnh ngắn nhất



3'
A
A
G
C
A
A
C
G
T
G
C
A
G
5'

Trình tự được đọc theo thứ tự từ dưới lên (5' - 3').



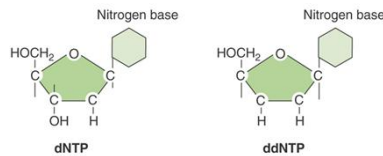


Phương pháp Sanger

Nguyên lý: Sanger, Smith và Coulson công bố vào năm 1977, dựa theo cơ chế tổng hợp DNA.

Đã giải trình tự hoàn chỉnh bộ gen thực khuẩn thể $\Phi X 174$

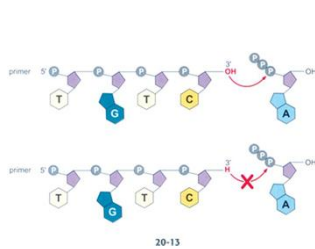
Trong quá trình tổng hợp mạch đơn DNA bổ sung một hàm lượng nhỏ dideoxynucleotid (ddNTP). Do ddNTP mất cả 2 nhóm OH (carbon số 2 và 3) ngẫu nhiên làm cho phản ứng tổng hợp DNA ngừng lại.



Dideoxynucleotide dùng trong DNA sequencing



Phương pháp Sanger



Sự kéo dài kết thúc do sự hiện diện của dideoxynucleotide

A	ddATP + four dNTPs	ddA dAdGdCdTdGdCdCdCdG
C	ddCTP + four dNTPs	dAdGddC dAdGdCdTdG ddC dAdGdCdTdGdC ddC dAdGdCdTdGdCd ddC
G	ddGTP + four dNTPs	dAddG dAdGdCdT ddG dAdGdCdTdGdCdCd ddG
T	ddTTP + four dNTPs	dAdGdCddT dAdGdCdTdGdCdCdCdG



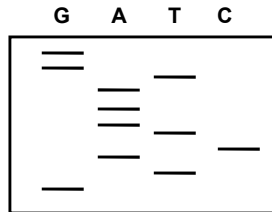


Phương pháp Sanger

Mảnh dài nhất



Mảnh ngắn nhất



3'
G
G
T
A
A
A
T
C
A
T
G
5'

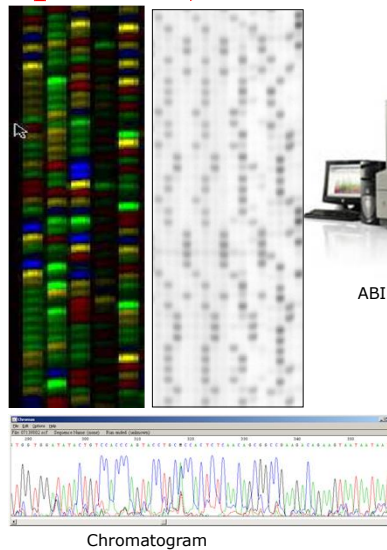
Trình tự được đọc theo thứ tự từ dưới lên (5' - 3').

47



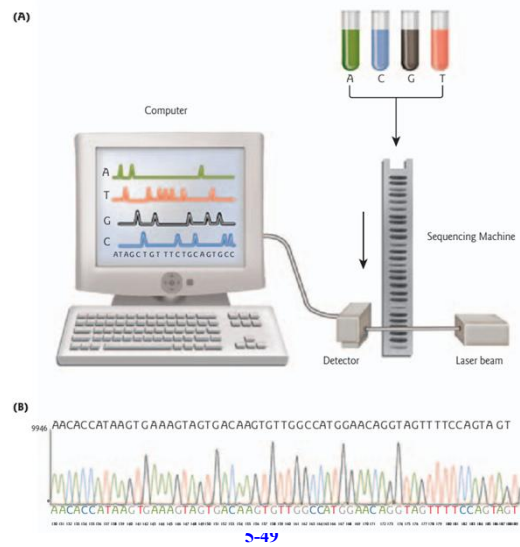
Giải trình tự bằng máy tự động (Sequencer)

- Theo nguyên tắc sử dụng ddNTP do Sanger và cộng sự phát minh
- Trong quá trình tổng hợp DNA sử dụng môi và dNTP đánh dấu huỳnh quang, mỗi loại dNTP có màu khác nhau
- Máy tổng hợp mạch đơn trên cả 2 mạch khuôn, dùng phần mềm để xử lý kết quả.





Giải trình tự bằng máy tự động (Sequencer)



Microarray





Nguyên tắc: dựa vào kỹ thuật lai

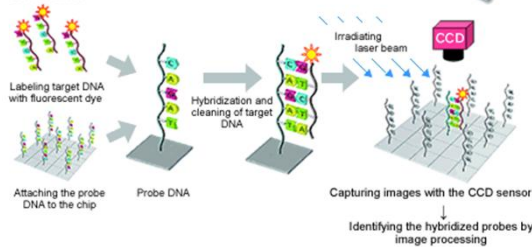
1. Cố định các mẫu dò (oligonucleotide hay sản phẩm PCR) có trình tự xác định trên giá thể rắn thích hợp theo thứ tự.

2. DNA mục tiêu được đánh dấu, sau đó lai với mẫu dò trên giá thể.

3. Dựa vào cường độ phát tín hiệu của phân tử đánh dấu để xác định sự có mặt DNA mục tiêu có trong mẫu ban đầu.

Fluorescence-Detection DNA Chip

The four bases A, T, G, and C bind A to T or G to C. A target DNA sequence is analyzed by checking which bases the target DNA bases bind.



Mẫu dò (Probe)

- cDNA: sản phẩm PCR các cDNA trong thư viện cDNA hay từ bộ sưu tập dòng
 - Được in lên giá thể
- Oligonucleotide: dài 20-25 mer
 - Tổng hợp *in situ* trực tiếp lên giá thể
 - Các oligonucleotide được tổng hợp sẵn và in lên giá thể
 - Gần đây các oligonucleotide dài hơn (50-100 mer) đã được phát triển để tăng độ nhạy và tính đặc hiệu.
- Phương pháp microarray có thể đồng thời phân tích sự biểu hiện của hơn 30.000 gen
- Ứng dụng phát hiện các mẫu có mật độ thấp vì microarray chỉ cần một lượng nhỏ mẫu.



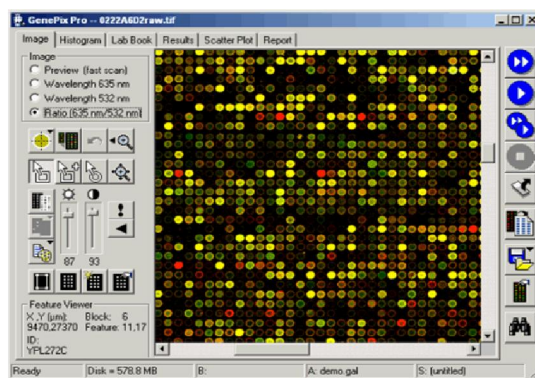
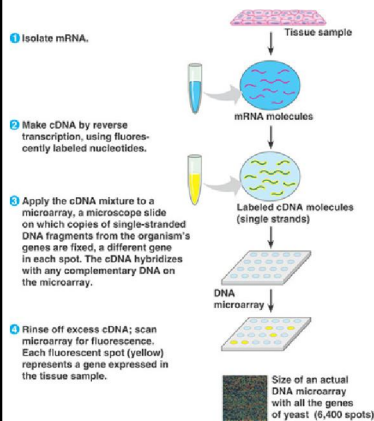


DNA mục tiêu

- Được đánh dấu và sử dụng các chất chỉ thị phát hiện:
 - Chất phát huỳnh quang (Cy3/ Cy5, streptavidin/ phycoerythrin)
 - Chất phóng xạ (^{32}P , ^{33}P , ^{35}P)
 - Chất phát huỳnh quang hoá học (digoxigenin, biotin, Ag, Au)

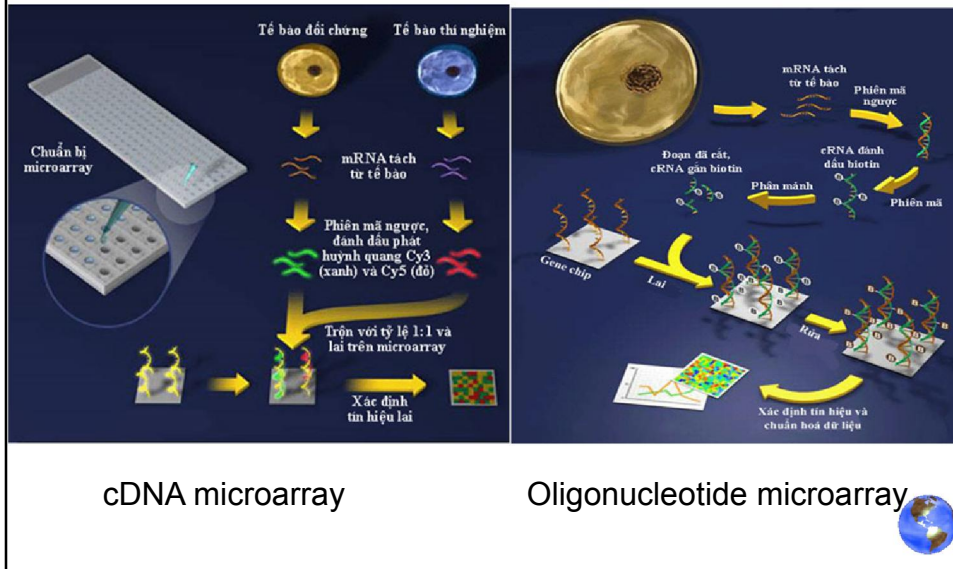


Microarray

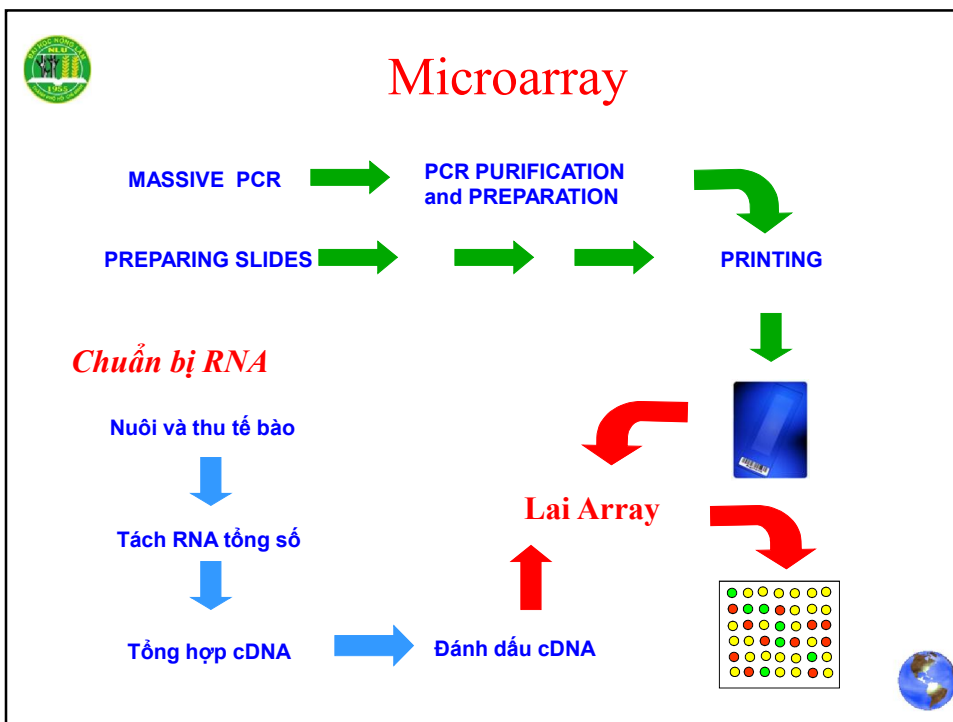




Microarray



Microarray



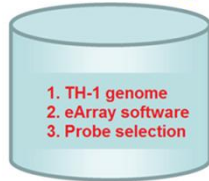


Microarray

1. Login



2. Probe design



3. Format design



4. Order



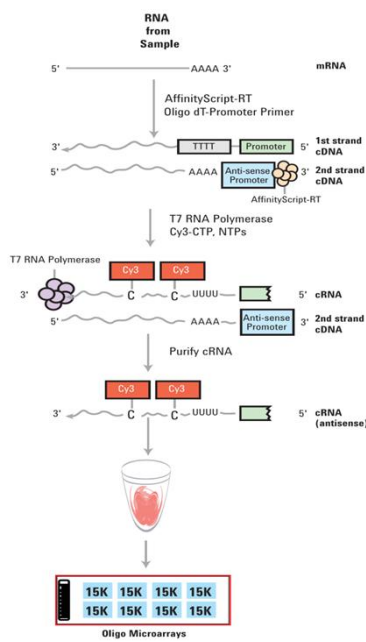
08/05/2017 2:50 CH

57

Nguyễn Hữu Trí



Amplified cRNA



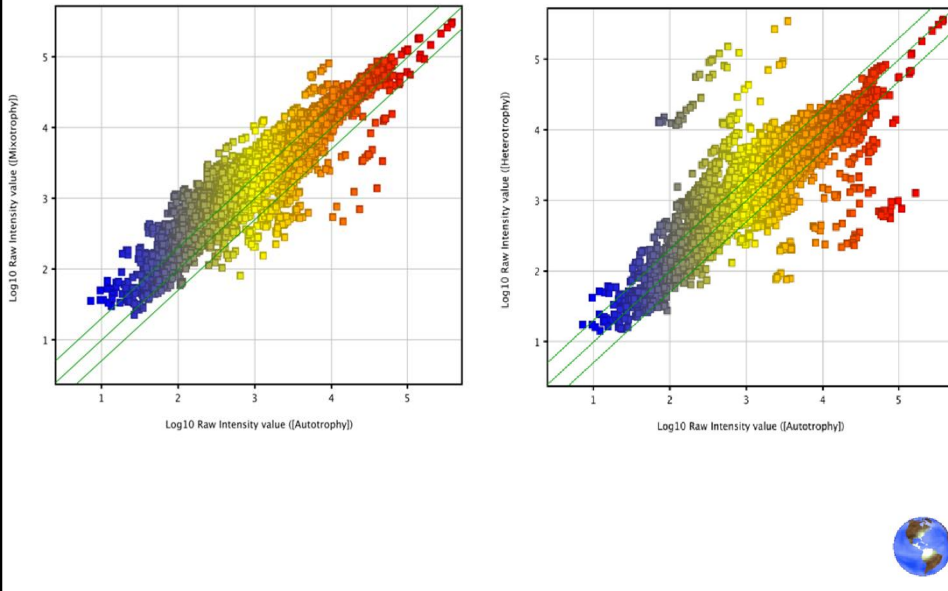
08/05/2017 2:50 CH

Nguyễn Hữu Trí





Microarray



Chân thành cảm ơn

08/05/2017 2:50 CH

Nguyễn Hữu Trí

