



Các enzyme sử dụng trong kỹ thuật tạo dòng

1. Restriction endonuclease

2. Các enzyme biến đổi DNA

Nuclease:

Exonuclease III, DNase I, nuclease S1

DNA polymerase:

DNA pol. I, Rnase, RNA pol.

Enzymes biến đổi đầu cuối DNA:

Polynucleotide kinase, terminal transferase

3. DNA ligase

- I. Các enzyme cắt giới hạn (RE)
 - 1. Nguồn gốc
 - 2. Phân loại
- II. Kỹ thuật di truyền
 - 1. Vector tạo dòng
 - 2. Tế bào chủ
 - 3. Kỹ thuật tạo dòng
 - A. Chiến lược tạo dòng
 - B. PCR
 - 4. Thư viện gen
 - A. Thư viện bộ gen
 - B. Thư viện cDNA

Restriction Enzyme (RE)

- Được tìm thấy trong các loài vi khuẩn khác nhau là các endonuclease có khả năng thủy giải DNA mạch đôi ở những vị trí xác định
- Vi khuẩn sử dụng restriction enzyme để bảo vệ chúng khỏi các DNA ngoại lai
- Vi khuẩn có một cơ chế để bảo vệ DNA của chúng khỏi hoạt động của các restriction enzyme của bản thân.
- Các RE hợp thành hệ thống bảo vệ ở prokaryote, chưa có hệ thống tương tự nào được phát hiện ở eukaryote.
- Chúng được phân lập và sử dụng cho các phòng thí nghiệm

Vai trò sinh học của RE

- Hệ thống biến đổi giới hạn-restriction enzyme được hoạt động cùng với hệ thống methylase.
- Methylases là enzyme thêm nhóm methyl vào nucleotide chuyên biệt (vào A hay C) trong trình tự nhận biết (recognition sequence). Sự methyl hóa ngăn chặn sự nhận biết của restriction enzyme.
- Do đó, restriction enzyme trong một tế bào không phân cắt DNA của chính nó. Tuy nhiên restriction enzyme có thể phân cắt DNA ngoại lai xâm nhập vào trong tế bào như của bacteriophage.

Restriction Endonucleases

Loại I- có nhiều tiểu đơn vị, có hoạt tính endonuclease và methylase, cắt một cách ngẫu nhiên tại vị trí cách vị trí nhận biết (recognition sequence) 1000 bp

Loại II- cắt DNA ngay vị trí nhận biết, không cần ATP, hầu hết ở dạng đơn phân

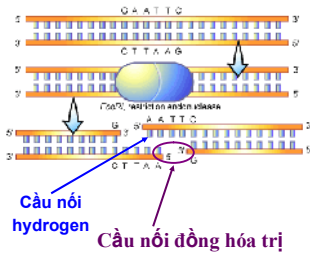
Loại III- có nhiều tiểu đơn vị, có hoạt tính endonuclease và methylase cắt cách 25 bp từ recognition sequence

Restriction Enzyme

- Restriction enzyme (endonuclease) cắt DNA tại trình tự đặc hiệu

- Những loại cầu nối nào bị RE cắt?

- Cầu nối đồng hóa trị (trong một chuỗi)
- Cầu nối hydrogen (giữa hai chuỗi)



RE hoạt động như thế nào?

- Vị trí nhận biết của enzyme

- Mỗi enzyme cắt DNA tại một trình tự đặc biệt → **restriction site**
- Enzyme nhận biết 4-, 6- hoặc 8- cặp base, trình tự lặp đảo (palindromic sequence)

Enzyme	Recognition Sequence
BamH I	GGATCC CTAGG
Not I	GGGGCGC CGCCGCG
Sau3A I	GATC CTAG
Sac I	GAGCTC CTCAG
Sst I	GAGCTC CTCAG
Hinf I	GANTC CTNAG
Xho II	PuGATCPy PyCTAGPu

Hoạt động của RE

Dò

GGACGCTAGCTGATGAATTCGCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTACTTAAGCGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Trình tự đặc hiệu

GGACGCTAGCTGATGAATTCGCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTACTTAAGCGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Cắt

GGACGCTAGCTGATG AATTCGCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTACTTAA GCGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Enzyme	Nguồn từ vi sinh	Trình tự nhận biết
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5' TCGA 3' 3' AGCT 5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' AAGCTT 3' 3' TTGCAA 5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5'
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5' AGCT 3' 3' TCGA 5'

Các RE phổ biến

- EcoRI**

- Escherichia coli*

- 5' nhô ra

- HindIII**

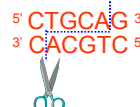
- Haemophilus influenzae*

- 5' nhô ra

- PstI**

- Providencia stuartii*

- 3' nhô ra



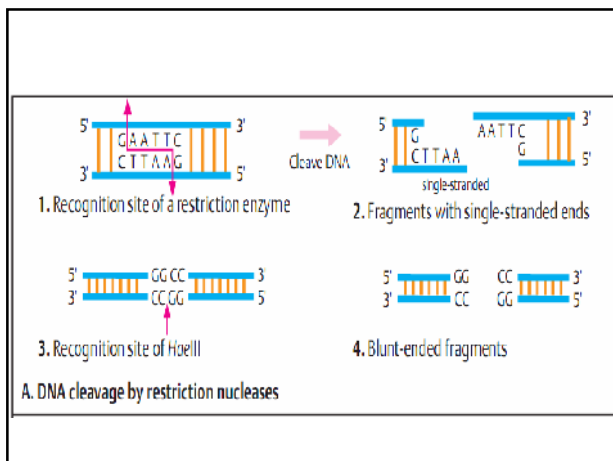
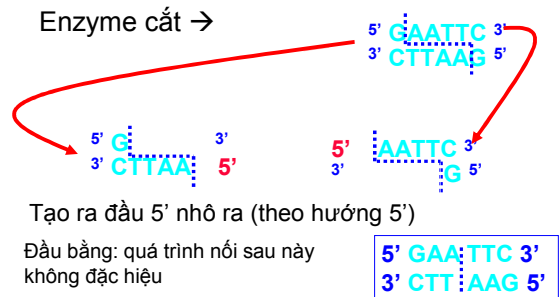
Producing 5' overhangs EcoRI (<i>Escherichia coli</i> R factor)	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' → 5' AATTC 3' 3' G CTTAA 5'
1.	
3' overhangs PstI (<i>Providencia stuartii</i>)	5' CTGCA 3' 3' GACGTC 5' → 5' G CTTGCA 3' 3' ACCTC G 5'
2.	
Blunted ends AluI (<i>Arthrobacter luteus</i>)	5' CTT 3' 3' TCGA 5' → 5' CT 3' 3' GA TC 5'
3.	
Non-palindromic sequence MluI (<i>Moraxella nonliquefaciens</i>)	5' CCTCNNNNNN 3' 3' CGACNNNNNN 5' → 5' CCTNNNNNN 3' 3' N GCACNNNNNN 5'
4.	

B. Examples of restriction enzymes

Đầu dính và đầu bằng

- Khi các enzyme cắt, chúng có thể tạo ra
 - Đầu dính: một số RE, vị trí cắt lệch nhau trên hai mạch. Trong trường hợp này các đầu dính có thể bắt cặp trở lại
 - Đầu bằng: một số RE cắt hai mạch DNA tại cùng một điểm, sau khi cắt hai đầu bằng không có khả năng tự kết hợp lại. Để nối chúng lại phải dùng enzyme T4 ligase.

Trình tự lắp đảo



HaeIII

HaeIII là một restriction enzyme dò trên phân tử DNA cho đến khi tìm thấy một trình tự của 4 base

5' TGACGGGTTCGAGGCCAG 3'
3' ACTGCCCAAGGTCCGGTC 5'

5' TGACGGGTTCGAG**GGCC**AG 3'
3' ACTGCCCAAGGT**CCGG**TC 5'

Khi trình tự xác định được tìm ra HaeIII sẽ cắt DNA

5' TGACGGGTTCGAG**GGCC**AG 3'
3' ACTGCCCAAGGT**CCGG**TC 5'



Những sản phẩm này được gọi với tên “đầu bằng” = “blunt ends”

5' TGACGGGTTCGAG**GG** **CC**AG 3'
3' ACTGCCCAAGGT**CC** **GG**TC 5'

Tên của restriction enzyme đến từ:

- Loại vi khuẩn mà enzyme được tìm thấy
- Thứ tự mà restriction enzyme được xác định và phân lập.

EcoRI là một ví dụ

Chữ **R** của vi khuẩn **E.coli**

I là restriction enzyme đầu tiên của E.coli được khám phá.

Ứng dụng RE

Việc sử dụng RE có ý nghĩa quyết định trong sự phát triển của sinh học phân tử eukaryote. Chúng cho phép cắt nhỏ bộ nhiễm sắc thể khổng lồ ở eukaryote

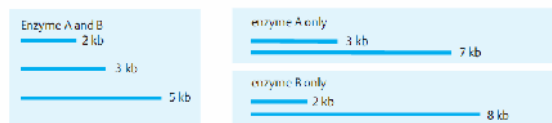
Các RE chủ yếu được sử dụng trong việc tạo dòng với mục đích tạo ra một số lượng lớn các bản sao của một trình tự DNA xác định.

Chúng cũng được ứng dụng để lập bản đồ cắt giới hạn (restriction map) vào việc phân tích so sánh bộ gen ở các loài khác nhau thông qua kỹ thuật RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism – Tính đa hình kích thước của các trình tự giới hạn)



Bản đồ enzyme cắt giới hạn

Experiment: effect of two enzymes A and B on the same DNA segment

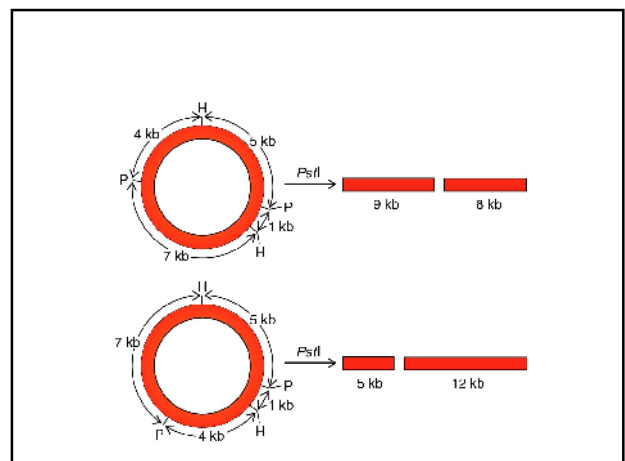
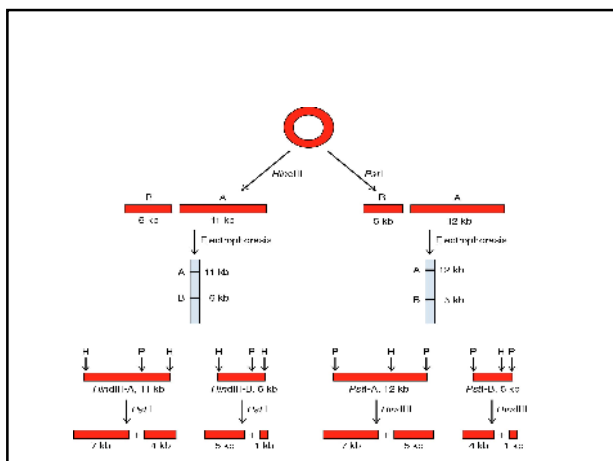
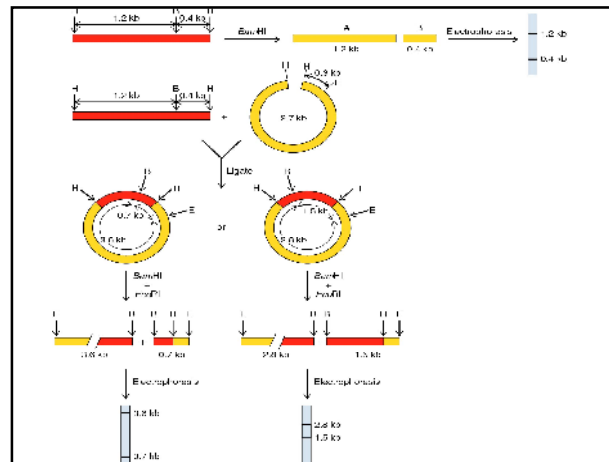


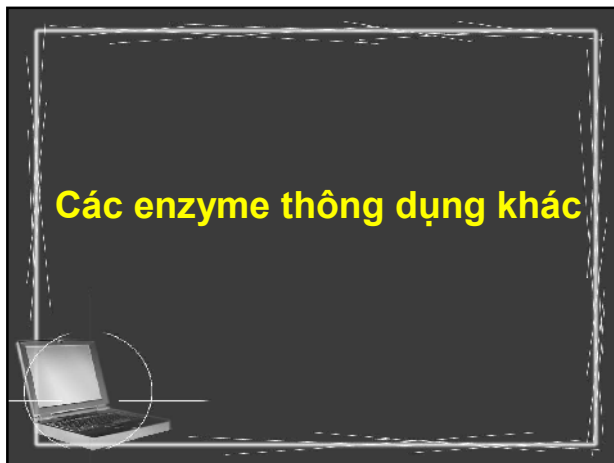
Interpretation: 3 kb, 5 kb, 2 kb

C. Determining the location of restriction sites



D. Restriction map





Polymerase

- DNA pol xúc tác sự tổng hợp DNA theo chiều 5' → 3' như:
 - DNA pol I (Klenow pol): polymerase 5' → 3', exonuclease 3' → 5'
 - T4 DNA pol: giống Klenow pol nhưng exonuclease 3' → 5' mạnh hơn
 - Taq pol: phân lập từ *Thermus aquaticus*
 - Pfu pol: phân lập từ *Pyrococcus furiosus*
 - Reverse transcriptase: do các Retrovirus sản sinh
 - DNA terminal transferase: li trích từ tuyến ức bê
- RNA pol tham gia vào việc tổng hợp RNA theo chiều 5' → 3', thông dụng nhất là:
 - SP6 RNA polymerase: có nguồn từ phage xâm nhiễm *Salmonella typhimurium*
 - T3 và T7 RNA polymerase: có nguồn gốc từ phage xâm nhiễm *E. coli*

Các ligase

- Đây là enzyme xúc tác cho phản ứng nối giữa hai đoạn DNA (DNA ligase) hay RNA (RNA ligase).
- Có các ligase sau:
 - T4 DNA (RNA) ligase: li trích từ phage T4 xâm nhiễm *E. coli*
 - T4 polynucleotide kinase: li trích từ phage T4 xâm nhiễm *E. coli*
 - Alkaline phosphatase: li trích từ *E. coli* hay từ ruột bê

Các nuclease

- Đây là nhóm phân cắt DNA hay RNA. Gồm các enzyme chính sau:
 - DNAase I: có nguồn gốc từ tụy tạng bò
 - Nuclease S1: ly trích từ *Aspergillus oryzae*
 - Exonuclease III: tách chiết từ *E. coli*
 - RNAase A: hiện diện khắp mọi nơi
 - RNAase H: dùng trong tổng hợp cDNA

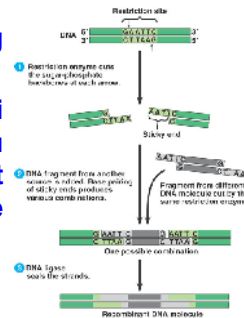


Tạo dòng phân tử (molecular cloning)

- Tạo dòng phân tử dùng kỹ thuật di truyền phân lập và làm thuần một gen:
 - + Tách và phân đoạn DNA nguồn
 - + Gắn các đoạn DNA bị cắt vào vector dòng hóa
 - + Biến nạp và giữ DNA tái tổ hợp trong tế bào chủ: ngân hàng DNA (DNA library, DNA bank)
 - + Phát hiện và làm thuần dòng mục tiêu
 - + Nuôi cấy dòng mục tiêu để ly trích và nghiên cứu DNA tái tổ hợp

Tái tổ hợp DNA

- Tái tổ hợp DNA sử dụng restriction enzyme
- Quan trọng: Để nối hai mảnh DNA lại với nhau chúng phải được cắt bằng một loại enzyme cắt giới hạn
 - Tại sao?

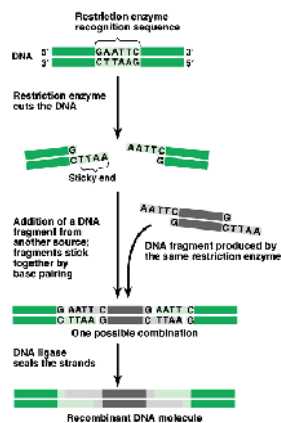


Câu hỏi...

- Loại cầu nối nào do DNA Ligase tạo ra?
 - Cầu nối đồng hóa trị (giữa nucleotide trong một chuỗi DNA)



- Restriction enzyme và DNA ligase** có thể được sử dụng để tạo DNA tái tổ hợp, DNA có thể được cắt nối lại với nhau từ các nguồn khác nhau
- Tạo dòng (Cloning)** có nghĩa là gắn một đoạn DNA (một gen vào một vector tạo dòng (cloning vector) sau đó đặt vào một tế bào sống ("Biến nạp") để khuếch đại gen mục tiêu.



- DNA Cloning**
 - Khuếch đại các đoạn DNA
- Nguồn DNA để tạo dòng**
 - DNA nhiễm sắc thể (bao gồm DNA "được dùng" và "không được dùng")
 - mRNA được chuyển thành cDNA
 - PCR- khuếch đại DNA mục tiêu

Tại sao phải tạo dòng DNA?

Sử dụng các DNA được tạo dòng là cách đầu tiên xây dựng bản đồ cắt giới hạn

- phân tích giải trình tự DNA được tạo dòng
- Sử dụng DNA tạo dòng làm probe xác định rõ mức độ phiên mã, kích thước của mRNA
- Sử dụng DNA tạo dòng như một probe để xác định DNA tương tự trong các loài khác nhau hoặc tạo thành thư viện tạo dòng
- Sản xuất thật nhiều gen được tạo dòng (Ví dụ insulin protein)
- Sử dụng tạo dòng để tạo antisense mRNA cho gene silencing
- Tạo một reporter gene để xác định sự biểu hiện của gen

Công cụ tạo dòng

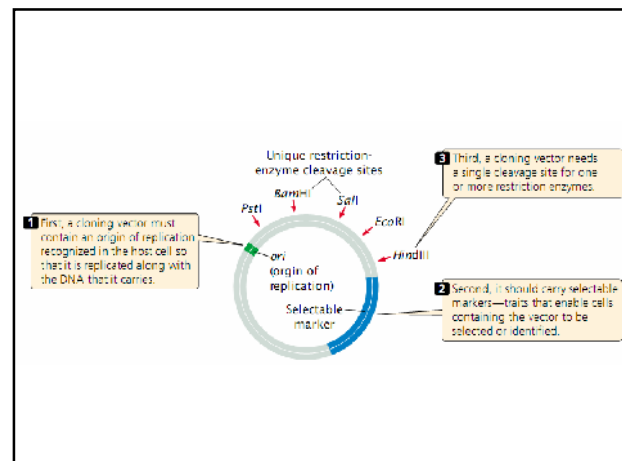
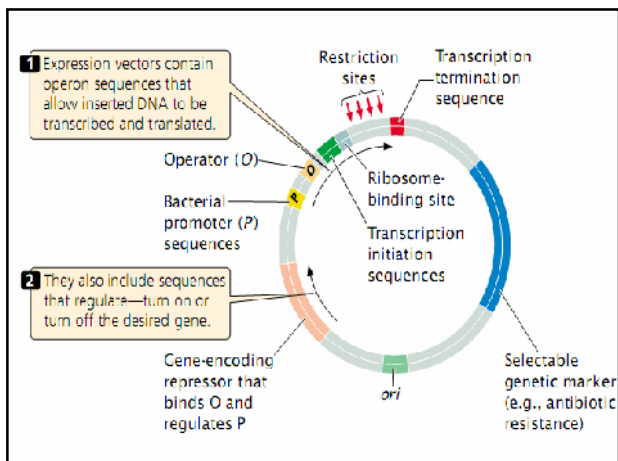
- Restriction endonuclease để cắt DNA
- DNA Ligase để nối DNA
- Vector để gắn DNA
- Tế bào chủ để khuếch đại DNA
- Công cụ để chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ
- Công cụ để giữ DNA trong tế bào chủ
- Công cụ để xác định xem tế bào nào đã được tạo dòng thành công (tầm soát)

Thế mang gen: vector

- ♦ Một vector cần có các đặc điểm tiêu chuẩn sau:
- ♦ Có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ, sao chép không phụ thuộc vào tế bào chủ
- ♦ Có đặc tính giúp dễ xác định tế bào có chúng
- ♦ Mang những vị trí nhận biết duy nhất của các enzyme cắt giới hạn
- ♦ Có kích thước càng nhỏ càng tốt, dễ xâm nhập, sao chép nhanh hiệu quả.
- ♦ Có số lượng bản sao trong tế bào cao
- ♦ Các vector cần biểu hiện thì phải có promoter mạnh

Thế mang gen: vector

- Vector: phân tử DNA kích thước nhỏ dùng để mang gen, sao chép, thao tác trên gen
- Vector tạo dòng và vector biểu hiện
- Vector tạo dòng: chuyển và lưu trữ gen tái tổ hợp trong tế bào chủ, nhân bản, thao tác, phân tích sau đó trên DNA tái tổ hợp sẽ dễ dàng hơn
- Vector biểu hiện: tạo sản phẩm của gen tái tổ hợp ở mức phiên mã, dịch mã, phân tích trình tự điều hòa sự biểu hiện của gen



Sự khác nhau của các vector tạo dòng

- Loại tế bào mà chúng có thể vào
- Cách thức mà chúng xâm nhập (bằng biến nạp hay bằng cách xâm nhiễm của virus/phage)
- Độ lớn của đoạn DNA ngoại lai mà chúng có thể mang
- Vị trí cắt giới hạn chính xác của enzyme cắt giới hạn
- Sự ổn định của DNA khi được chèn vào
- Những khía cạnh quan tâm
 - Hiệu quả tạo dòng
 - Số lượng bản sao (trên một tế bào chủ)
 - Khả năng tầm soát (ví dụ hệ thống Lac Z)

Plasmid là các vector tạo dòng

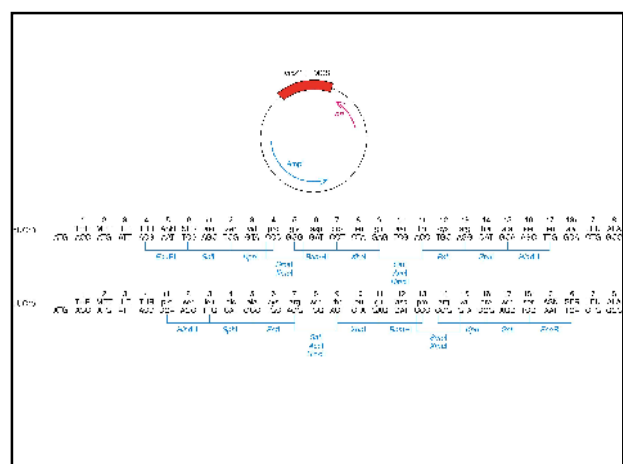
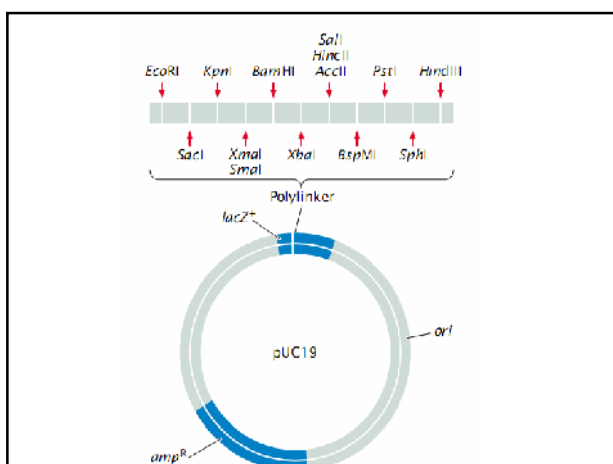
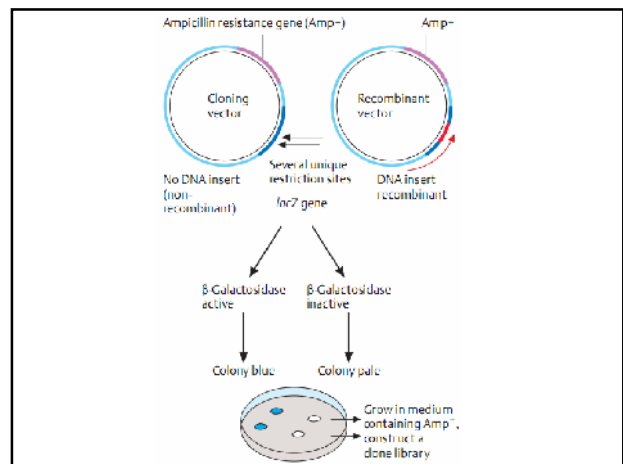
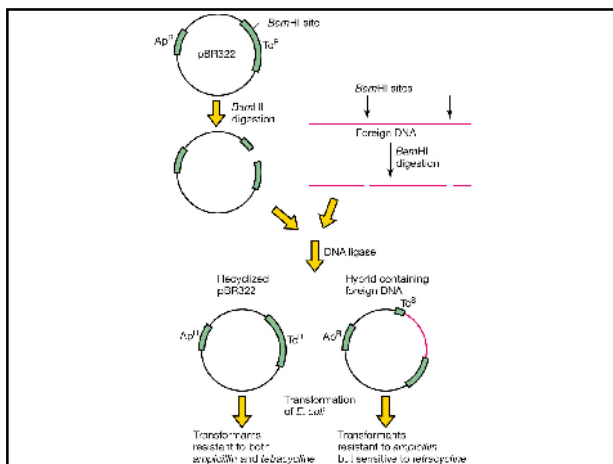
- Vị trí cắt hạn chế duy nhất để chèn DNA mục tiêu (vùng **polylinker**), có thể nằm cắt ngang gen **lacZ** mã hóa cho Beta-galactosidase, một enzyme chuyển khuẩn lạc thành màu xanh khi hiện diện X-gal (khuẩn lạc chuyển thành màu trắng khi có một đoạn DNA ngoại lai chèn thành công vào vùng polylinker và làm bất hoạt gen **lacZ**...)
- Có **promoter mạnh** nằm ở hai phía của vùng polylinker để biểu hiện DNA được tạo dòng.
- Một **oriC**
- **Marker chọn lọc** (Ví dụ. Gen kháng kháng sinh) nếu không có biến nạp vì khuẩn sẽ chết (chắc chắn rằng chỉ có những vi khuẩn được biến nạp thành công mới sống)

Plasmid

- Plasmid là những đoạn DNA ngắn (2-5kb) dạng chuỗi xoắn kép, dạng vòng, có thể tự nhân đôi độc lập với DNA bộ gen
- Có số bản copy cao trong tế bào *E. coli* (100)
- Gen kháng kháng sinh (marker chọn lọc, VD. Amp^R ; có nghĩa là *E. coli* có khả năng kháng khi biến nạp thành công nhận được plasmid)
- Tạo dòng tốt với đoạn DNA 5-10 kb (nhỏ)
- Rất dễ sử dụng

Các loại plasmid

- **Plasmid thể hệ thứ nhất:** tìm thấy trong tự nhiên (ColE1, pSC101...)
- **Plasmid thể hệ thứ hai:** plasmid nhân tạo (pBR322: kích thước 4364 bp, mang hai gen Amp^R , Tet^R và 20 vị trí nhận biết duy nhất của các enzyme cắt giới hạn)
- **Plasmid thể hệ thứ ba:** đây là các plasmid mạnh hiện nay có hai đặc tính cơ bản
 - Kích thước nhỏ
 - Có mang một polylinker



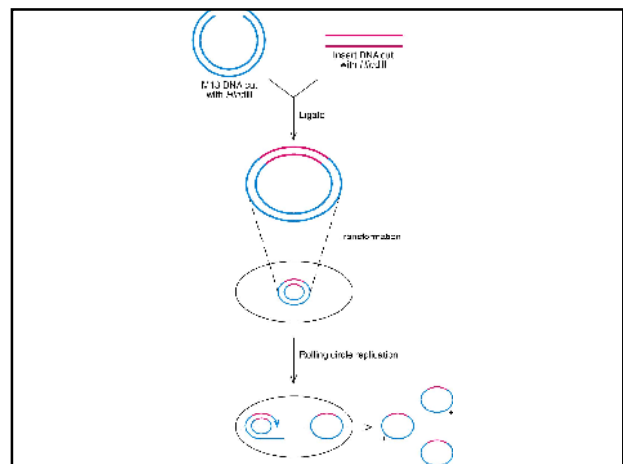
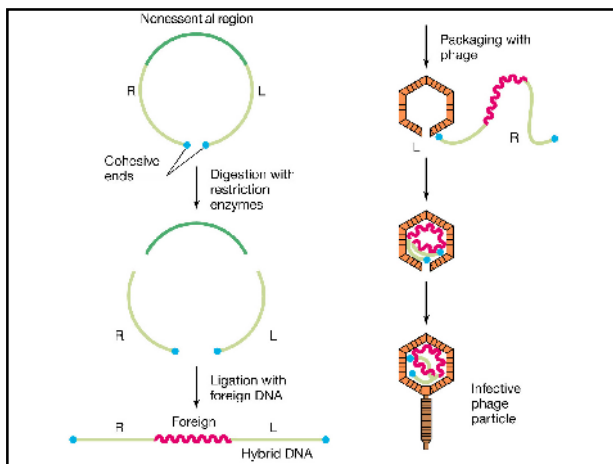
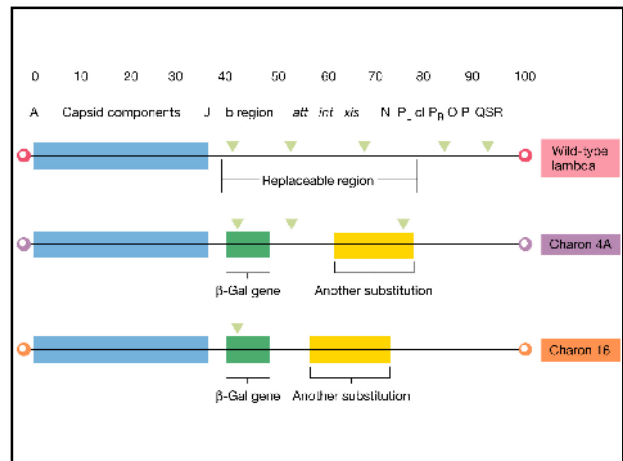
Vector tạo dòng là phage

+ Bacteriophage vector

- Được thiết kế để đi vào chu trình tan
- Tạo dòng tốt với những đoạn DNA lớn (10-23 kb)
- Phage không dễ thao tác như plasmid
 - Phage λ được loại bỏ 1/3 bộ gen chỉ giữ lại vùng chứa gen xâm nhập, tự sao và lắp ghép
 - DNA ngoại lai được đưa vào tế bào chủ qua phage này, nhân bản và lưu trữ cùng với phage
 - Vector phage λ chứa ít trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn

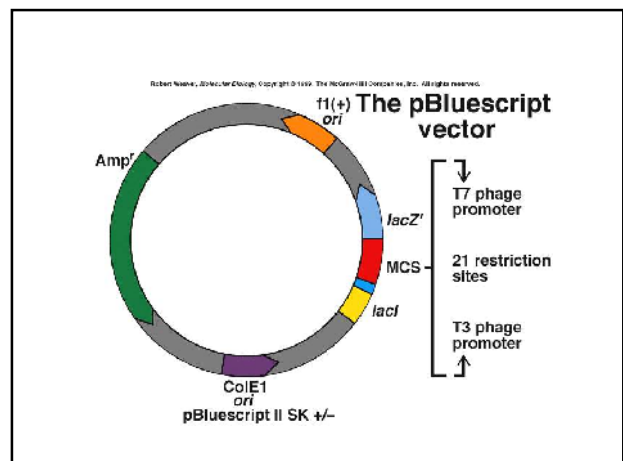
+ Thực khuẩn thể M13

- + Bộ gen mạch đơn có kích thước 6,4 kb
- + Thường dùng để giải trình tự DNA



+ Phagemid

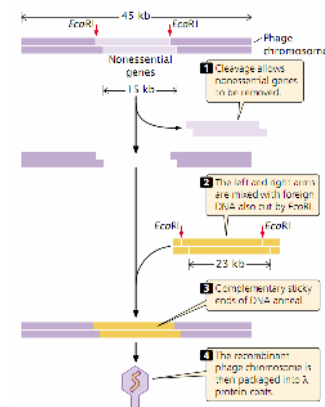
- Kết hợp giữa bacteriophage và plasmid
- Tạo ra + đóng gói ssDNA với sự trợ giúp của phage
- Hoặc có thể biến nạp vào *E. coli* khi nó thể hiện giống một plasmid (kích thước hạn chế giống một plasmid)
- Ví dụ. pBluescript (pBS)
- Có promoter phage T3 và T7 trên mỗi hướng cho việc tổng hợp ssRNA *in vitro*



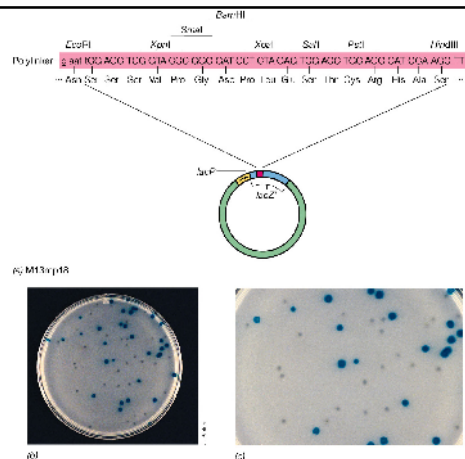
Các vector tạo dòng khác

+ Cosmid

- Thiết kế nhân tạo bởi sự kết hợp được ưu điểm plasmid DNA và trình tự *cos* từ phage λ
- Khi vào trong tế bào chủ, có khả năng sao chép như plasmid. Plasmid tái tổ hợp bền hơn trong tế bào chủ
- Nhưng trình tự *cos* cho phép đóng gói DNA vào phage để tải nạp vào tế bào khác
- Rất tốt để tạo dòng những đoạn gen rất lớn DNA (32-47 kb). Hiệu suất chuyển gen cao hơn
- Plasmids càng lớn thì càng khó thao tác



18.10 Phage λ is an effective cloning vector.

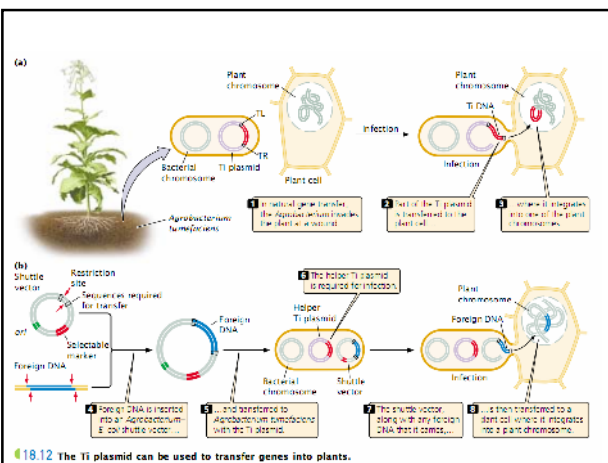


• BAC

- Nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn
- Dùng để tạo dòng những đoạn DNA rất lớn vào *E. coli* (tốt và ổn định – sử dụng trong tạo dòng HGP)
- Có chứa ORI của nhân tể f; sử dụng giống plasmid

• Eukaryotic vector

- VD. **Ti plasmid** của *Agrobacterium tumefaciens* dùng để tạo dòng ở thực vật.
- VD. **YAC** (Nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men) Kích thước 10kb mang được DNA 150 – 1000kb. Sao chép như một nhiễm sắc thể bình thường của nấm men. dùng để tạo bản đồ vật lý bộ gen ví dụ bộ gen người (nhưng không bền như BAC)



18.12 The Ti plasmid can be used to transfer genes into plants.

Table 18.3 Comparison of plasmids, phage lambda vectors, and cosmids			
Cloning Vector	Size of DNA That Can Be Cloned	Method of Propagation	Introduction to Bacteria
Plasmid	As large as 15 kb	Plasmid replication	Transformation
Phage lambda	As large as 23 kb	Phage reproduction	Phage infection
Cosmid	As large as 44 kb	Plasmid reproduction	Phage infection

Note: 1 kb = 1000 bp

Ưu điểm của Prokaryote

1. Phát triển nhanh
2. Thao tác dễ dàng

Nhược điểm của Prokaryote

1. Không thể tách các intron ra
2. Intron cần thiết cho sự biểu hiện của gen
3. Kích thước DNA đưa vào vi khuẩn bị hạn chế
4. Prokaryote không có cơ chế glycosyl hóa protein

Tế bào chủ

- *E. coli*:

- + Tế bào chủ phổ biến nhất, dễ nuôi, sinh sản nhanh
- + Vi sinh vật gây bệnh cơ hội
- + Không tiết enzyme

- *Bacillus subtilis*:

- + Không gây bệnh, không tạo nội độc tố, tiết protein
- + Plasmid không ổn định trong tế bào chủ

- *Saccharomyces cerevisiae*:

- + Tế bào eukaryote được nghiên cứu di truyền kỹ nhất
- + Sử dụng để thể hiện gen eukaryote

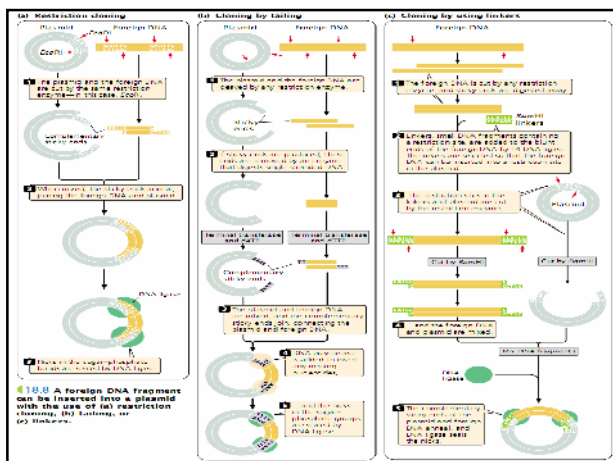
- Virút động vật (SV40, retrovirus...):

- + Dùng để dòng hóa gen vào tế bào hữu nhũ, cơ chế tiềm tan

Cải tiến tế bào chủ *E. coli*

- Thông thường *E. coli* dùng để tạo dòng thường được cải tiến:

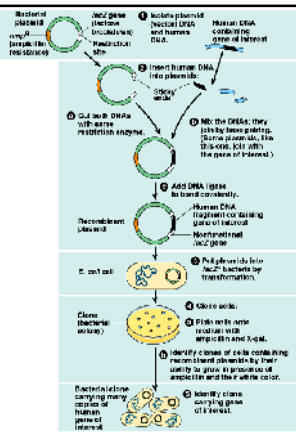
- Loại bỏ các hệ thống sửa đổi hạn chế bằng cách gây đột biến trong hệ thống sửa đổi hạn chế nội sinh
- Hệ thống tái tổ hợp DNA được sửa đổi để ngăn chặn sự tái tổ hợp
- Thay đổi hoạt tính endonuclease nhằm làm tăng lượng plasmid tích lũy trong tế bào



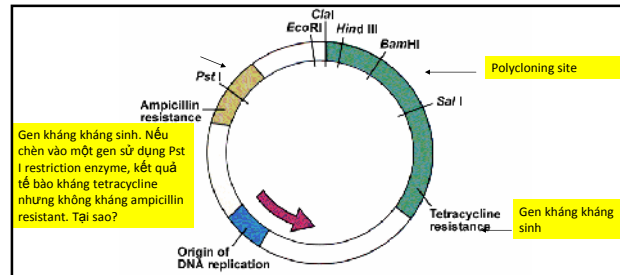
Các bước của kỹ thuật tạo dòng

1. Cô lập gen mục tiêu, cô lập plasmid DNA
2. Thao tác trên DNA
 - a, b. Cắt - Restriction enzyme
 - c. Nối - DNA ligase
3. Biến nạp vào vi khuẩn
4. Chọn lọc vi khuẩn đã biến nạp thành công.
5. Xác định dòng vi khuẩn mang gen cần tạo dòng

- Quá trình tạo dòng một gen người trong một vector tạo dòng là plasmid vì khuẩn có thể được chia thành 5 bước

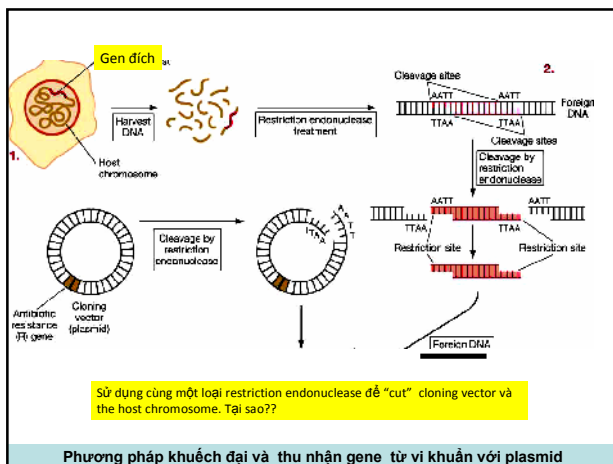


Copyright © 2002 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings



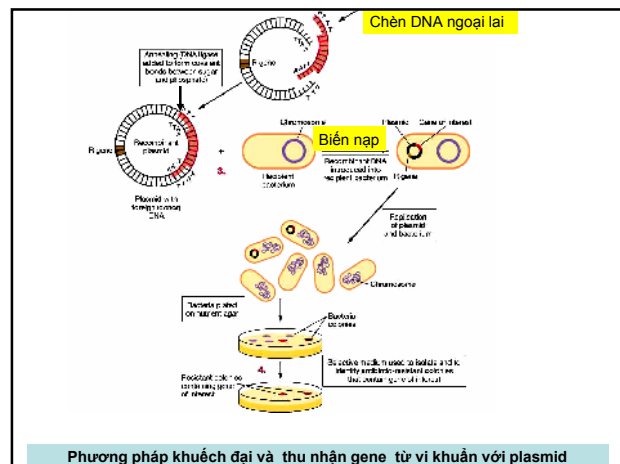
Gen kháng kháng sinh. Nếu chèn vào một gen sử dụng Pst I restriction enzyme, kết quả tế bào kháng tetracycline nhưng không kháng ampicillin resistant. Tại sao?

Vector tạo dòng điện hình. Antibiotic resistance important to help select for organisms that are transformed with the plasmid

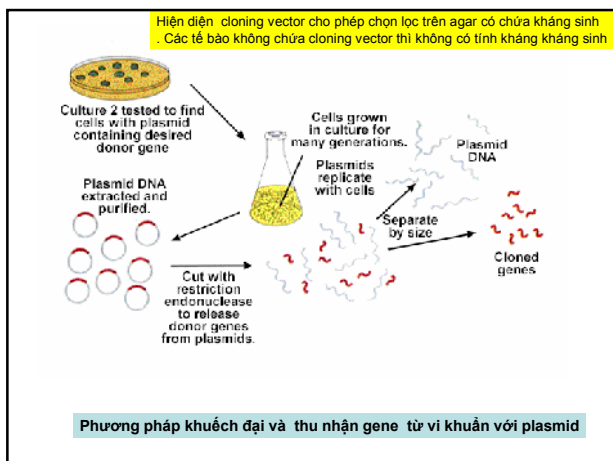


Sử dụng cùng một loại restriction endonuclease để "cut" cloning vector và the host chromosome. Tại sao??

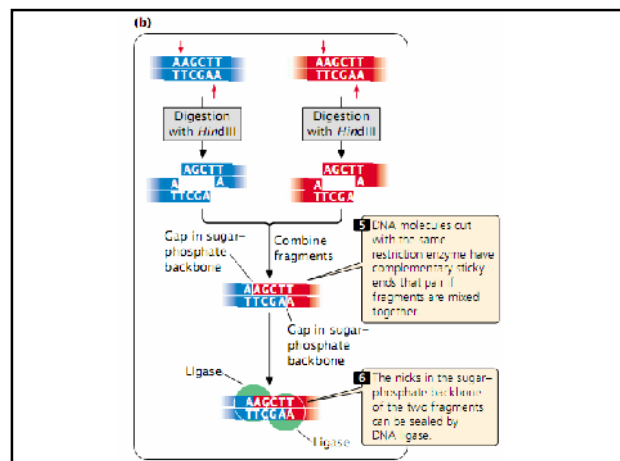
Phương pháp khuếch đại và thu nhận gene từ vi khuẩn với plasmid

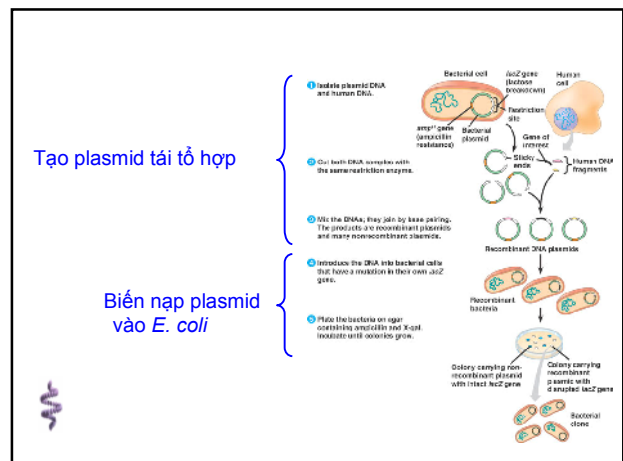
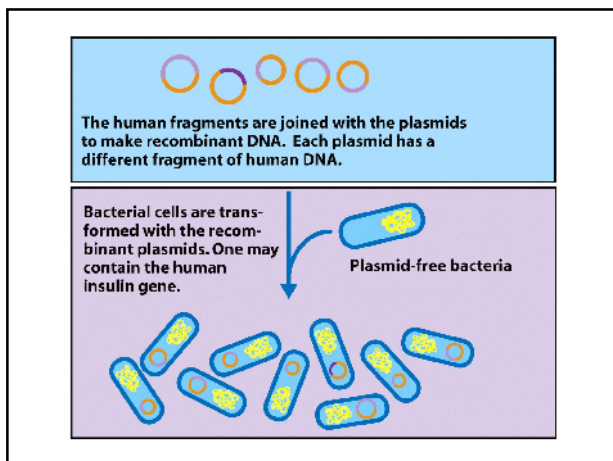
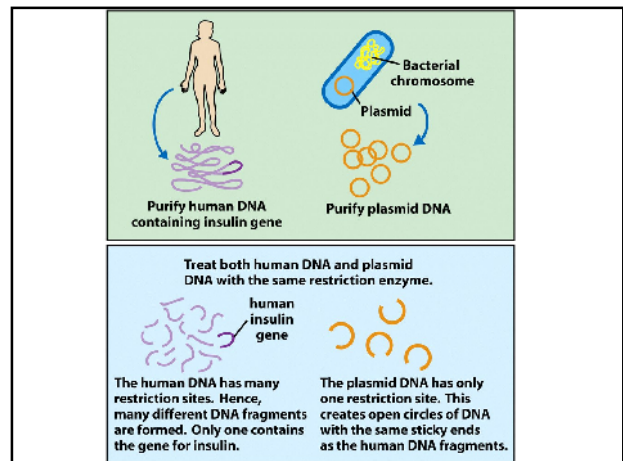
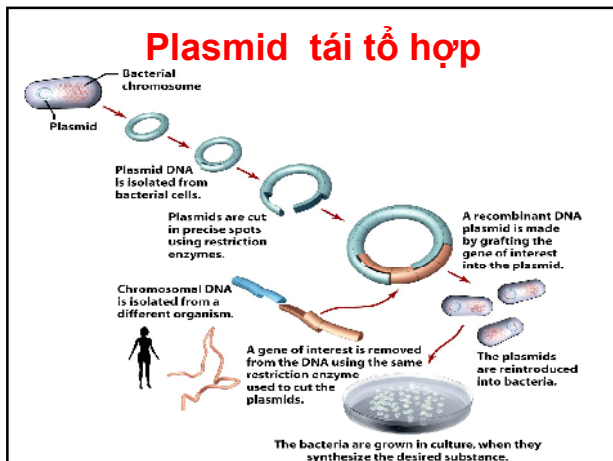


Phương pháp khuếch đại và thu nhận gene từ vi khuẩn với plasmid



Phương pháp khuếch đại và thu nhận gene từ vi khuẩn với plasmid





Tái tạo dòng (subcloning)

- Tái tạo dòng là kiểu đơn giản nhất của thí nghiệm tạo dòng, là quá trình chuyển DNA đã được tạo dòng từ vector này sang vector khác để biểu hiện nó trong một chủng chủ nhất định.
- Các bước cơ bản của tái tạo dòng cũng tương tự như tạo dòng

Thư viện DNA

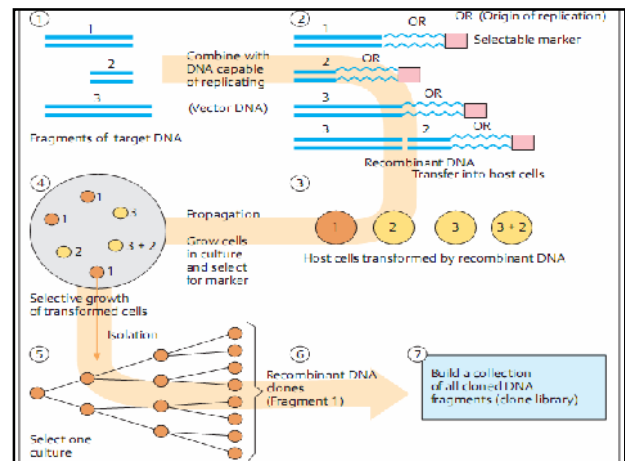
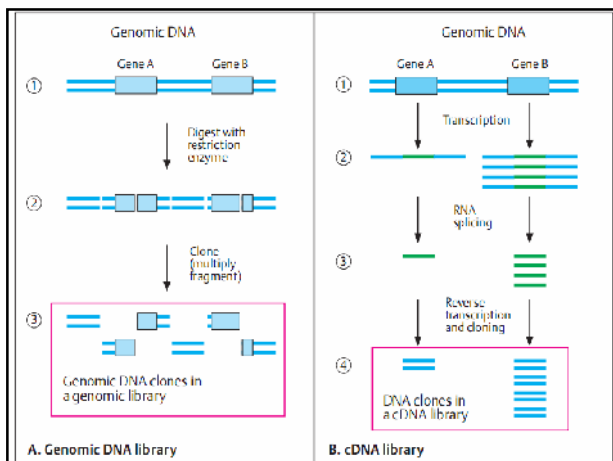
- Dựa vào bản chất của DNA cần tạo dòng người ta phân biệt hai loại thư viện gen:
 - thư viện bộ gen và thư viện cDNA

Thư viện bộ gen (Genomic)

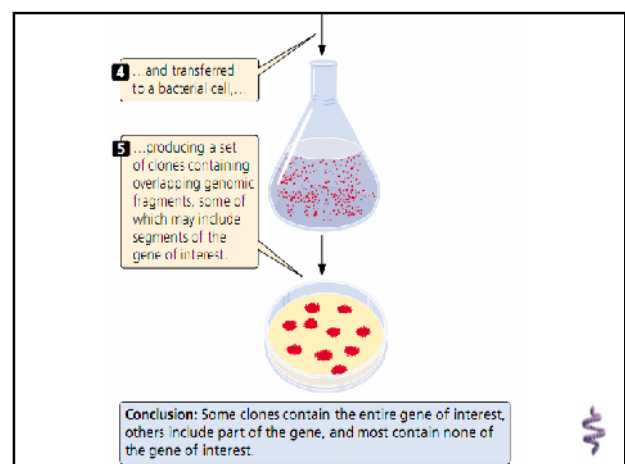
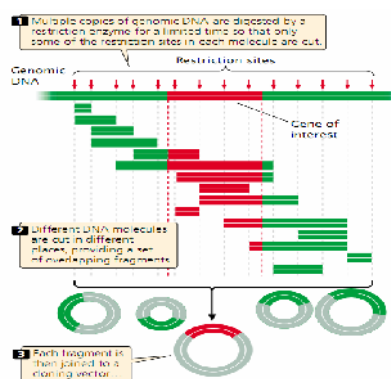
- Thư viện bộ gen của một sinh vật là tập hợp tất cả các trình tự DNA cấu thành bộ gen đã được gắn vào vector. Các vector tái tổ hợp sau đó được đưa vào tế bào chủ. Các tế bào chủ sau đó được nuôi cấy trên môi trường và tạo thành các dòng.
- Thư viện bộ gen thường được lập cho prokaryote
- Bộ sưu tập các dòng với ít nhất một bản sao cho mỗi đoạn DNA được tạo dòng trong YAC hay BAC

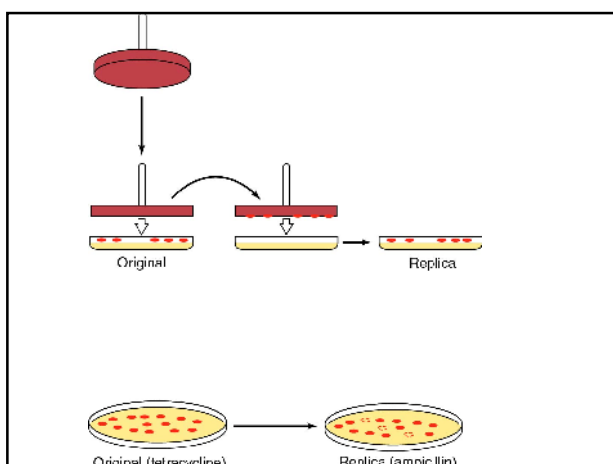
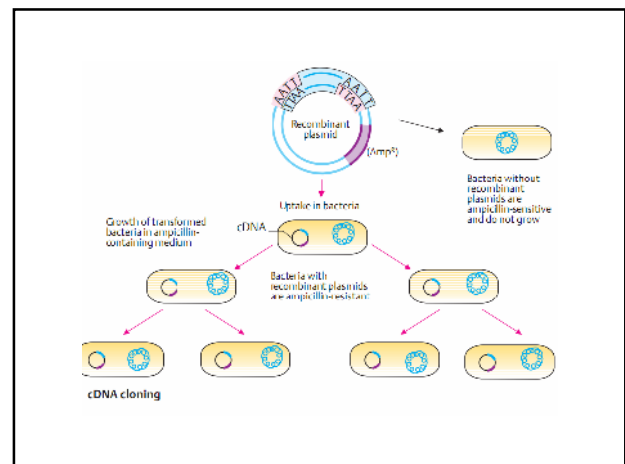
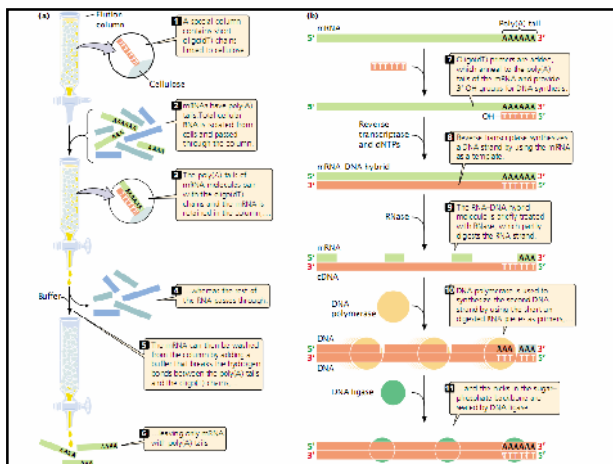
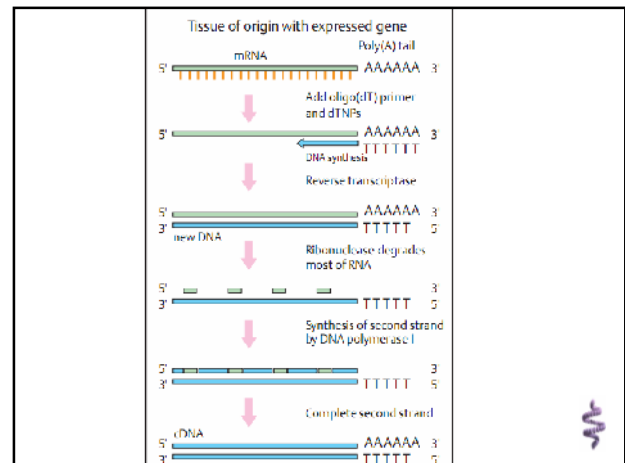
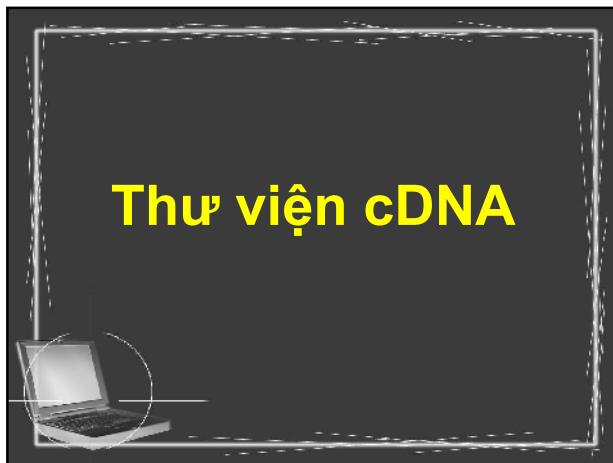
Thư viện cDNA

- Thư viện cDNA là tập hợp các bản sao cDNA từ tất cả các mRNA của một tế bào. Như vậy không giống với thư viện bộ gen, thư viện cDNA được thiết lập từ một tế bào xác định trong đó gen cần nghiên cứu phải biểu hiện thành mRNA
- Thường được lập cho eukaryote
- cDNA được tổng hợp từ mRNA trưởng thành (eukaryote) (Không có các đoạn intron) sử dụng enzyme **Reverse transcriptase**, **RNase H**, **DNA Polymerase I**, và **nuclease S1**.



Thư viện bộ gen





Tuyển chọn dòng mục tiêu

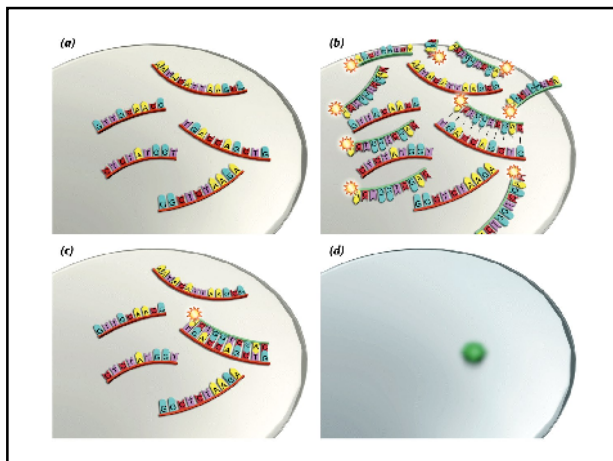
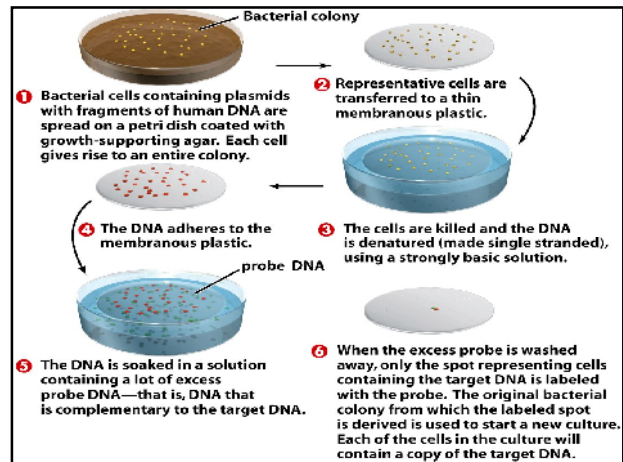
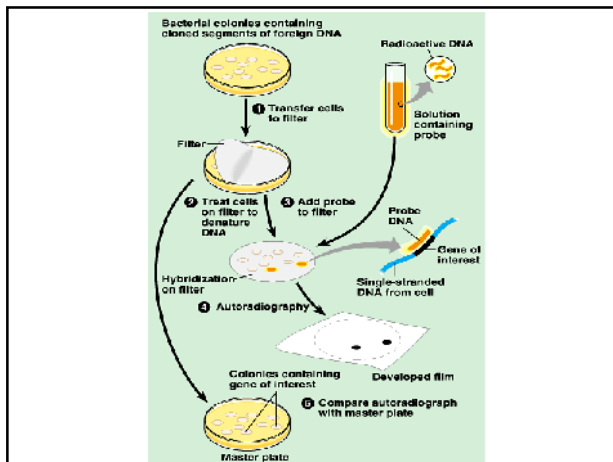
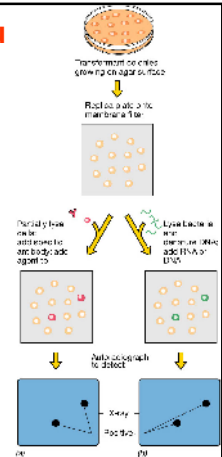
- Có thể sử dụng một kháng thể được đánh dấu để xác định protein được chọn
 - Đặt một vài khuẩn lạc vào màng lai; phá vỡ tế bào
 - Mẫu dò trên màng lai với một kháng thể đặc hiệu cho protein chọn
- Hoặc sử dụng một mẫu dò DNA (probe) bổ sung để tìm trực tiếp DNA

Tuyển chọn dòng mục tiêu

- Để có thể phân lập dòng tế bào chủ tái tổ hợp chứa gen mục tiêu trong một thư viện DNA hay một thư viện cDNA, người ta phải sử dụng các phương pháp sàng lọc.
- Thông thường các phương pháp sàng lọc được xây dựng dựa trên việc sử dụng mẫu dò DNA.
- Mẫu dò DNA (probe) là một đoạn oligonucleotide được đánh dấu và nó bổ sung hoặc bổ sung một phần với gen mục tiêu.

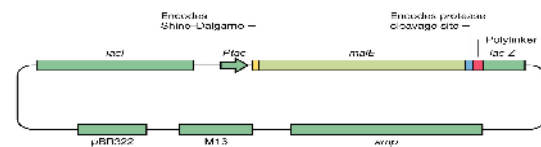
Tuyển chọn dòng mục tiêu

- Gen được biểu hiện trong tế bào chủ là vi khuẩn:
 - + Lai miễn dịch (Western blotting, Immunoblotting)
 - + Hoạt tính enzyme
 - + Bỏ trợ đột biến (gen ngoại lai đồng dạng với gen của tế bào chủ)
- Gen ngoại lai không biểu hiện trong tế bào chủ:
 - + Lai *insitu*:
 - + Lai khuẩn lạc (colony hybridization):
 - + Lai plaque (plaque colonization):
 - + vector là plasmid
 - + vector là phage



Vector biểu hiện (expression vector)

- Để biểu hiện gen ngoại lai:
 - + Thu protein tái tổ hợp
 - + Nghiên cứu các yếu tố điều hòa thể hiện của gen
- Gen ngoại lai được kiểm soát bằng promoter được nhận diện bởi RNA polymerase của tế bào chủ:
 - + Promoter mạnh
 - + Khung dịch mã đúng
 - + Promoter thường dùng: *lac*, *trp* (có chế tắt mở)



Ứng dụng thực tiễn của kỹ thuật di truyền

- Sản xuất những sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật
- Sản xuất vắc xin phòng chống virus
- Sản xuất protein của động vật hữu nhũ
- Tạo ra các thực vật, động vật chuyển gen
- Phân lập và ứng dụng nguồn gen vi sinh trong xử lý môi trường
- Tạo các thuốc điều hòa sự thể hiện của gen
- Liệu pháp gen chữa trị các bệnh di truyền

Ứng dụng của Sinh học phân tử

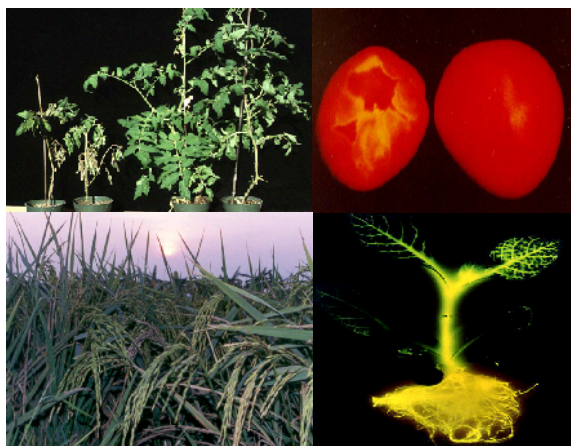
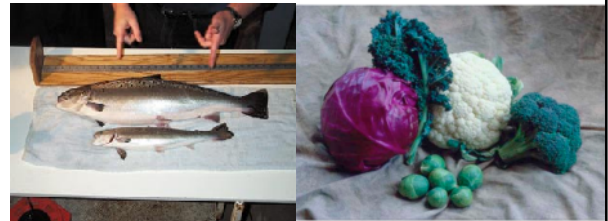
- Công nghệ tạo các sinh vật mới có ích.



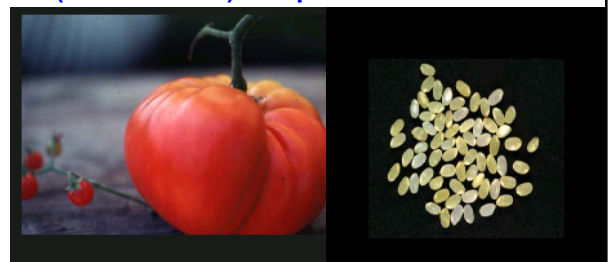
Trong nông nghiệp
Những nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc:

- Nâng cao năng suất nuôi trồng
- Tạo ra các thể hệ động vật mới
- Có thêm một số tính trạng mới
- Nhiều trứng hơn
- Tỷ lệ nạc cao hơn
- Sản phẩm công nghiệp

Công nghệ sản xuất giống cây trồng, vật nuôi vượt giới hạn của tiến hóa để chống chịu bệnh, thích nghi với các điều kiện sinh thái và cho năng suất cao.

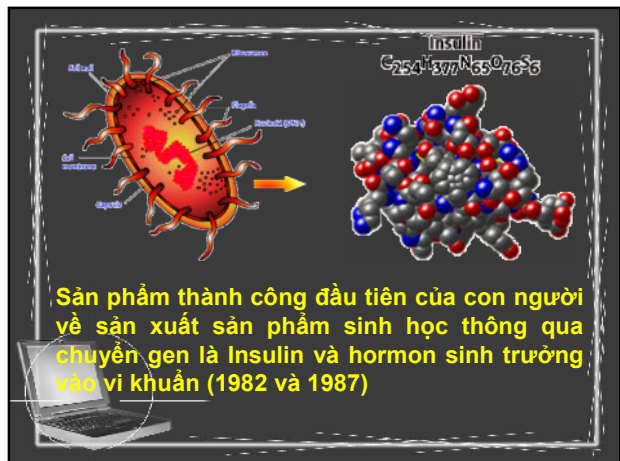


- Công nghệ sản xuất các loại thực phẩm mới có giá trị dinh dưỡng cao, có giá trị thuốc – dinh dưỡng, các chất bổ sung (các vitamin...) các protein đơn bào.



Từ những năm 1970, các nhà khoa học đã có thể chuyển một gen lạ vào vi khuẩn và bắt nó biểu hiện gen

Tuy nhiên, những protein phục vụ cho nhu cầu của con người ngày càng đòi hỏi phức tạp và cơ thể vi khuẩn không biểu hiện được và cần đến động vật chuyển gen

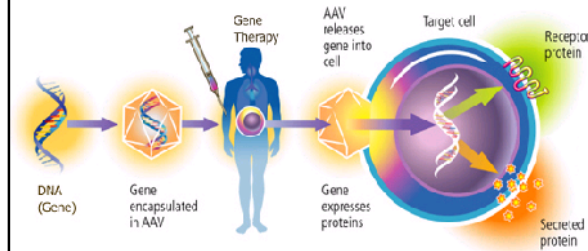


Năm 1998 có khoảng dưới 1% dược phẩm là protein được tổng hợp tái tổ hợp nhưng trị giá tới 12 tỷ USD

Người ta dự tính chỉ cần 600 con bò chuyển gen là có thể cung cấp đủ nhu cầu của cả thế giới về một dược phẩm là một protein nào đó (ví dụ human Serum albumin điều trị bỏng)



Trong Y học



1. Tìm hiểu các gen gây bệnh như gen gây loạn dưỡng cơ tim, ung thư, miễn dịch, hồng cầu lưới liềm.

Dùng phương pháp chuyển gen để tạo động vật thí nghiệm mà bị loại bỏ hoặc khoá các gen nào đó để xác định chức năng của gen.



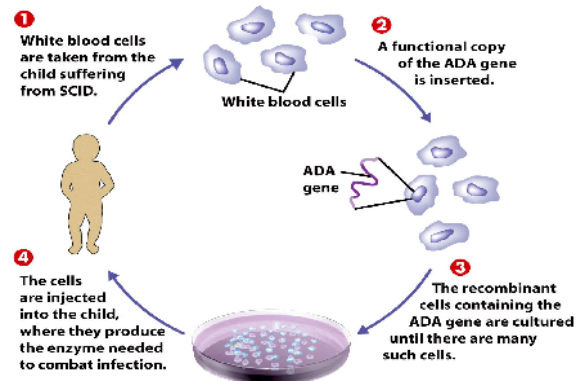
2. Tạo ra các loại protein, hormon, yếu tố sinh trưởng dùng trong trị liệu (chủ yếu trong sữa và trong huyết thanh)

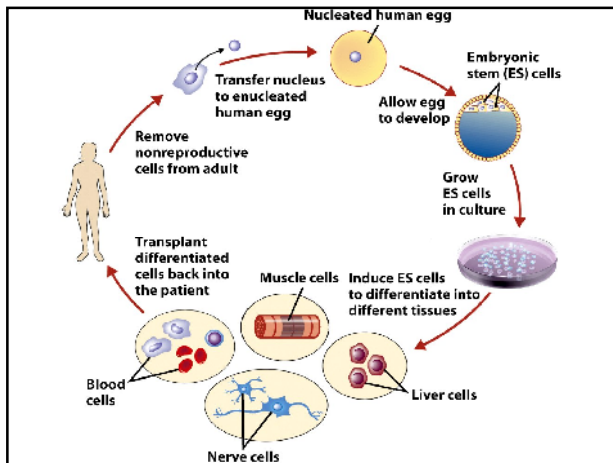


3. Thay đổi cấu trúc giải phẫu, sinh lý cơ quan, nội tạng (đưa một số gen mới, loại bỏ một số gen) nhằm phục vụ mục đích cấy ghép nội tạng.



• Liệu pháp gen và liệu pháp thay thế tế bào và mô.





Phương pháp chuẩn đoán bệnh mới

- Kỹ thuật tạo dòng (cloning) và đặc biệt là kỹ thuật PCR đưa đến kỹ thuật chuẩn đoán mới bằng lai DNA và RNA. Phương pháp này hiện đang được ứng dụng rộng rãi trong chuẩn đoán các bệnh di truyền, quan hệ dòng họ, tội phạm hình sự....

Một số thành tựu ở Việt Nam

- 1997, hoàn thiện quy trình công nghệ chuyển gen hormon sinh trưởng người vào cá vàng (*Carassius auratus*)
- Năm 2003, Viện Sinh học nhiệt đới đã chuyển gen Bt kháng sâu vào cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và cây ngô (*Zea mays*)
- Năm 2005, Viện Sinh học nhiệt đới đã chuyển gen hormon sinh trưởng người vào cá chép (*Cyprinus carpio*)

