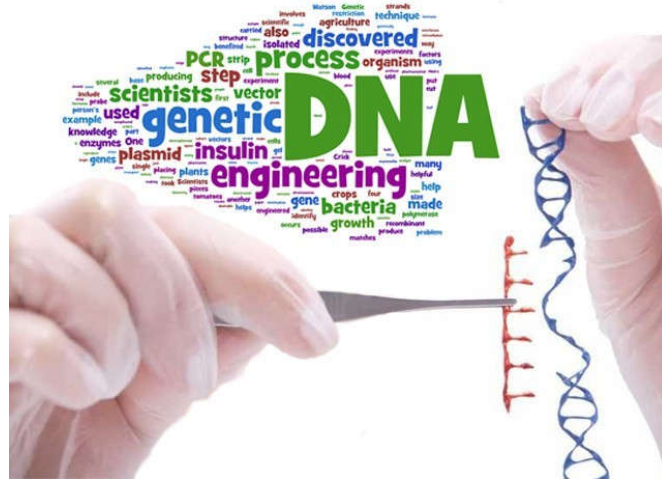




## Chương 7

# Kỹ thuật tạo dòng



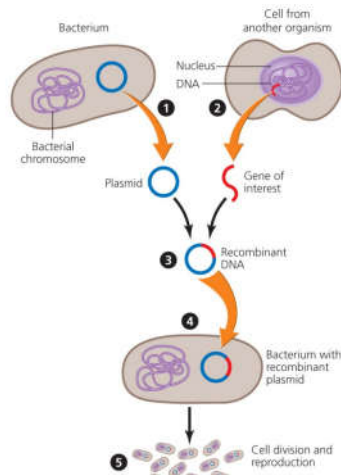
5/18/2020

1

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Kỹ thuật di truyền



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

5/18/2020

2

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Các công cụ sử dụng trong kỹ thuật tạo dòng

- Enzymes - cắt, nối nucleic acid ...
- Vector- tạo dòng phân tử
- PCR (Polymerase chain reaction)
- Giải trình tự DNA (DNA sequencing)
- Điện di (Electrophoretic separation)
- Phát hiện gene:  
DNA-Southern blotting; lai tại chỗ (in situ hybridization); kỹ thuật FISH;  
RNA- Northern blotting  
Pr-Western blotting; lai miễn dịch IHC (immunohistochemistry)
- Tinh sạch
- Sinh vật chuyển gene
- .....

5/18/2020

3

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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

5/18/2020

4

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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.

5/18/2020

5

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Restriction Endonuclease

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 trình tự nhận biết.

5/18/2020

6

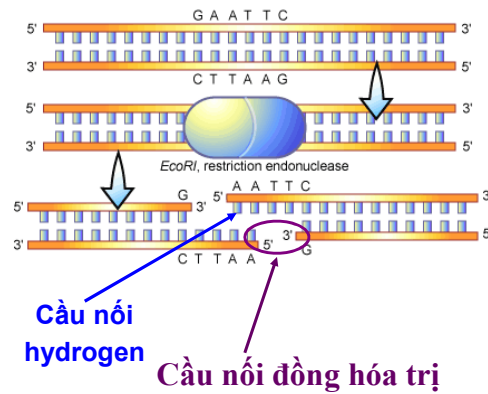
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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)



5/18/2020

7

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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<br>CCTAGG     |
| Not I   | GCGGCCGC<br>CGCCGGCG |
| Sau3A I | GATC<br>CTAG         |
| Sac I   | GAGCTC<br>CTCGAG     |
| Sst I   | GAGCTC<br>CTCGAG     |
| Hinf I  | GANTC<br>CTNAG       |
| Xho II  | PuGATCPy<br>PyCTAGPu |

5/18/2020

8

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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.

5/18/2020

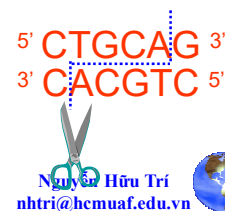
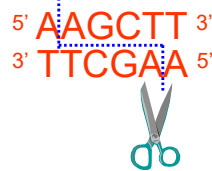
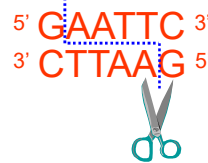
9

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Các RE phổ biến

- ***EcoRI***
  - *Escherichia coli*
  - 5' nhô ra
- ***HindIII***
  - *Haemophilus influenzae*
  - 5' nhô ra
- ***PstI***
  - *Providencia stuartii*
  - 3' nhô ra



5/18/2020

10

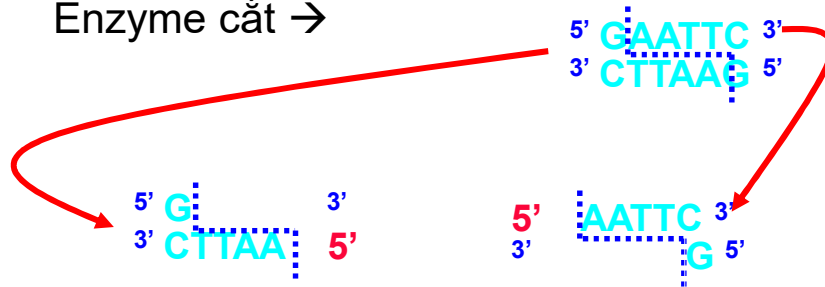
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





# Trình tự lặp đảo

Enzyme cắt →



Tạo ra đầu 5' nhô ra (theo hướng 5')

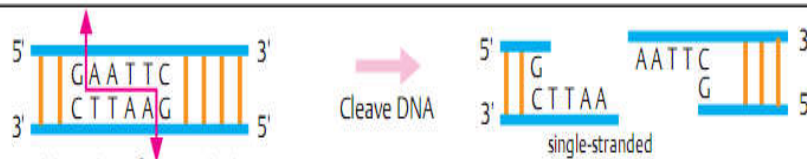
Đầu bằng: quá trình nối sau này không đặc hiệu



5/18/2020

11

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



1. Recognition site of a restriction enzyme

2. Fragments with single-stranded ends



3. Recognition site of *HaeIII*

4. Blunt-ended fragments

A. DNA cleavage by restriction nucleases

5/18/2020

12

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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' TGACGGGTTCGA**GGCC**AG 3'  
3' ACTGCCCAAGGT**CCGG**TC 5'

5/18/2020

13

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



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

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



5/18/2020

14

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





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

5' TGACGGGTTTCGAGG                      CCAG 3'  
3' ACTGCCCAAGGTCC                      GGTC 5'

5/18/2020

15

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



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

Chủng **R** của vi khuẩn *E.coli*

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

5/18/2020

16

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn







Recognition sites of some common restriction endonucleases

| Bacterial species/strain            | Enzyme name   | Recognition sequences and cleavage sites                     |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H | <i>Bam</i> H1 | $\downarrow$<br><b>GGATCC</b><br><b>CCTAGG</b><br>$\uparrow$ |
| <i>Escherichia coli</i> Ry13        | <i>Eco</i> R1 | $\downarrow$<br><b>GAATTC</b><br><b>CTTAAG</b><br>$\uparrow$ |
| <i>Providencia stuartii</i> 164     | <i>Pst</i> 1  | $\downarrow$<br><b>CTGCAG</b><br><b>GACGTC</b><br>$\uparrow$ |
| <i>Serratia marcescens</i> SB       | <i>Sma</i> H1 | $\downarrow$<br><b>CCCGGG</b><br><b>GGGCCC</b><br>$\uparrow$ |
| <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> | <i>Rsa</i> 1  | $\downarrow$<br><b>GTAC</b><br><b>CATG</b><br>$\uparrow$     |

5/18/2020

17

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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)



5/18/2020

18

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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



5/18/2020

19

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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*

5/18/2020

20

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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

5/18/2020

21

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



5/18/2020

22

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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

5/18/2020

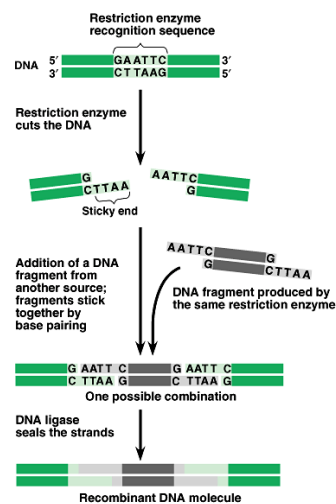
23

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## DNA tái tổ hợp

- **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.



5/18/2020

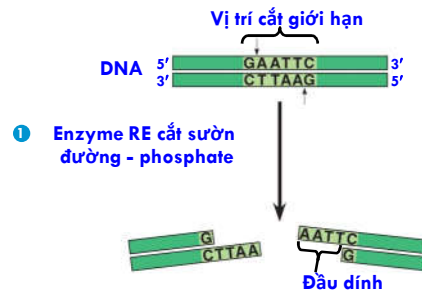
24

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## DNA tái tổ hợp



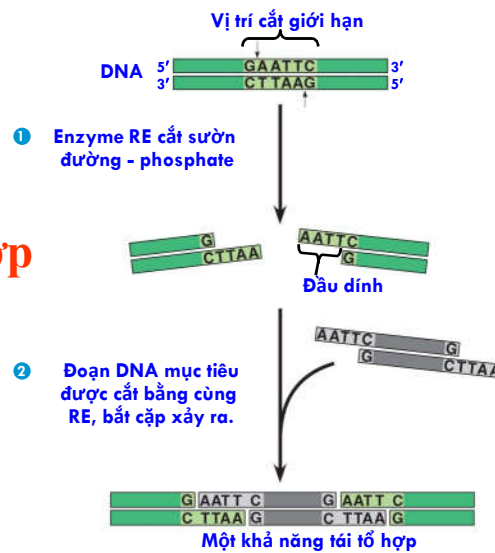
5/18/2020

25

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## DNA tái tổ hợp



5/18/2020

26

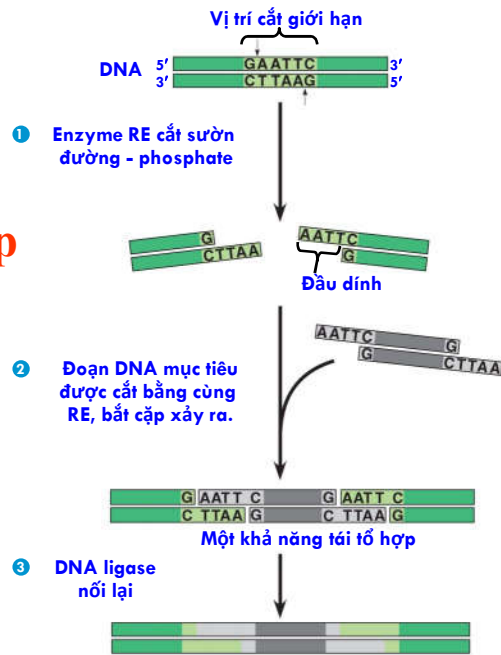
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



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



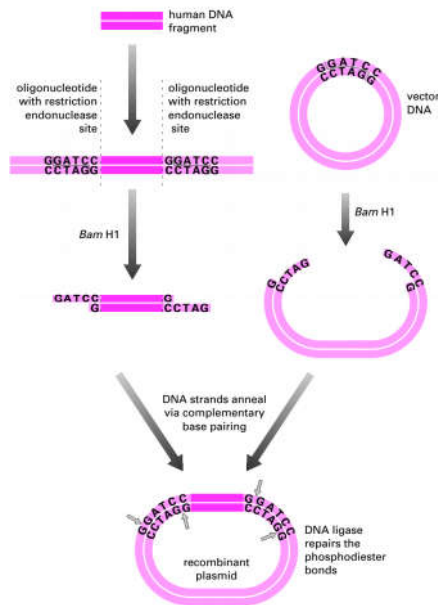
# DNA tái tổ hợp



5/18/2020

27

Phân tử DNA tái tổ hợp Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



5/18/2020

28

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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

5/18/2020

29

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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)

5/18/2020

30

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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

5/18/2020

31

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Thế mang gene: vector

- Vector: phân tử DNA kích thước nhỏ dùng để mang gene, sao chép, thao tác trên gene.
- 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 gene.

5/18/2020

32

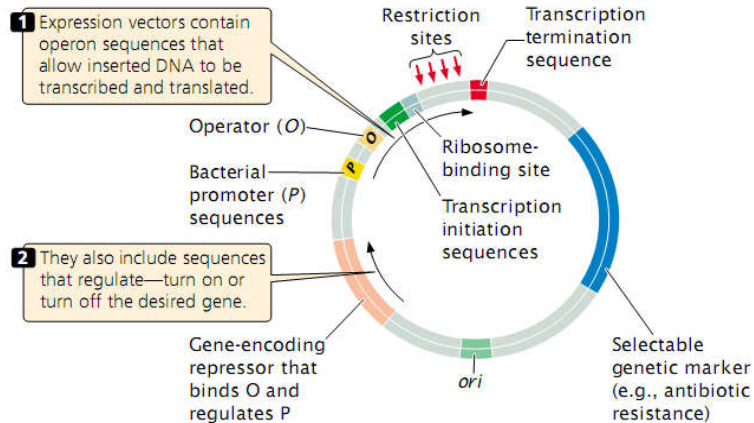
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn







## Vector



5/18/2020

33

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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)

5/18/2020

34

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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 vi khuẩn sẽ chết (chắc chắn rằng chỉ có những vi khuẩn được biến nạp thành công mới sống)

5/18/2020

35

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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<sup>R</sup>; 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

5/18/2020

36

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





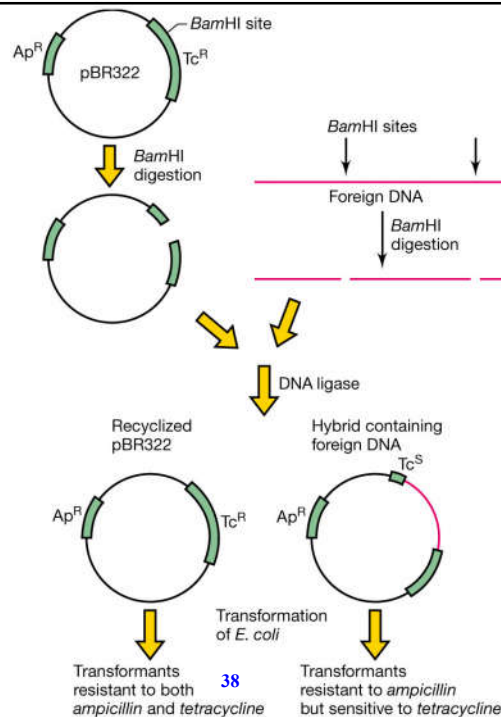
## Các loại plasmid

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

5/18/2020

37

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn

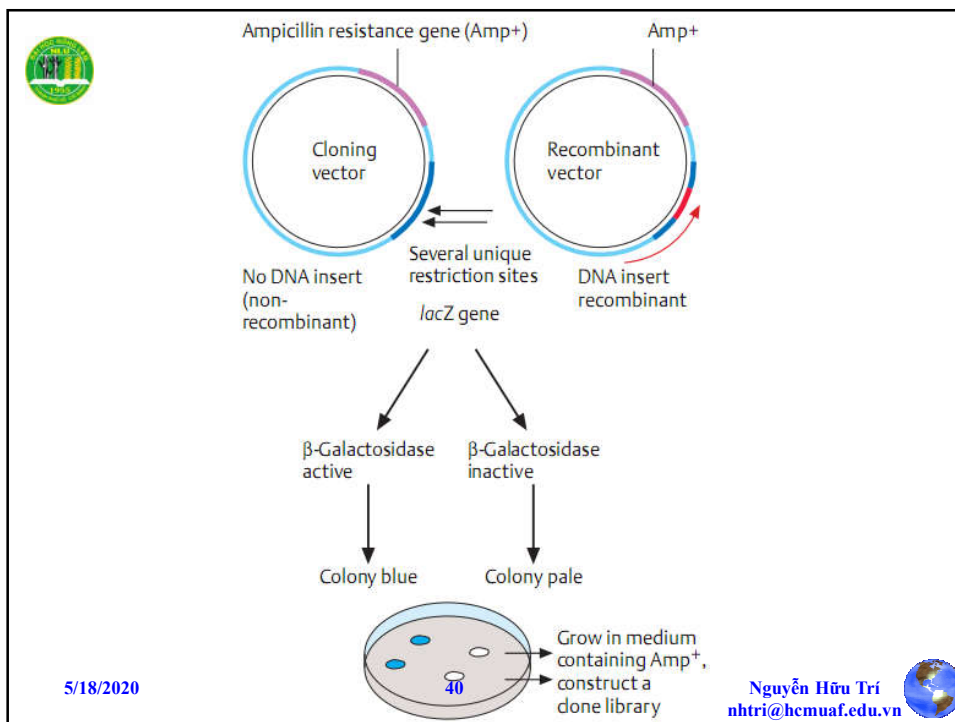
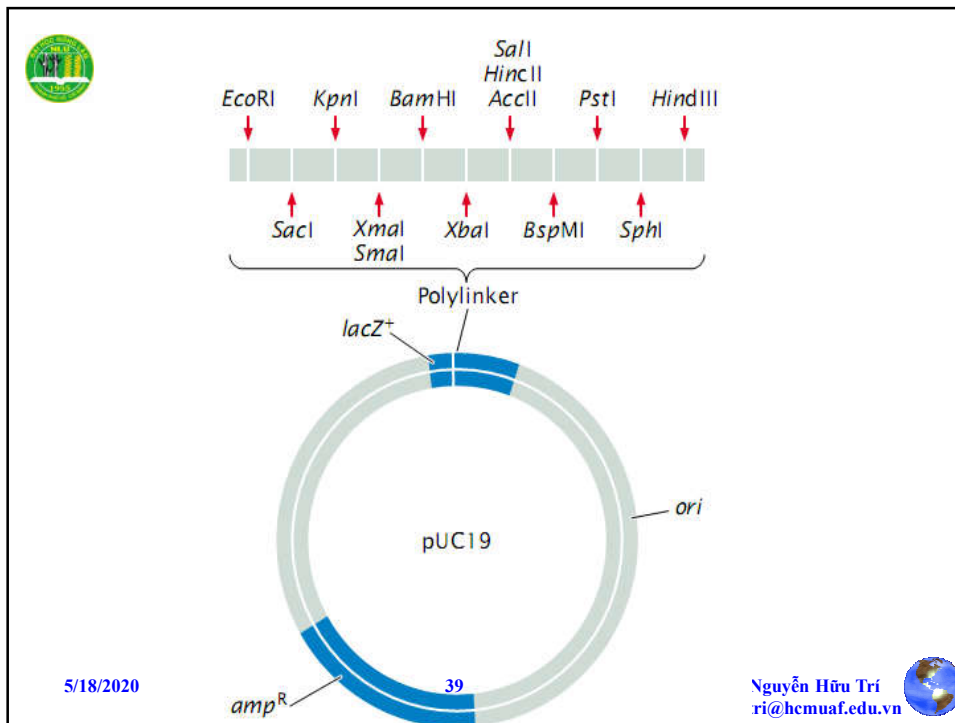


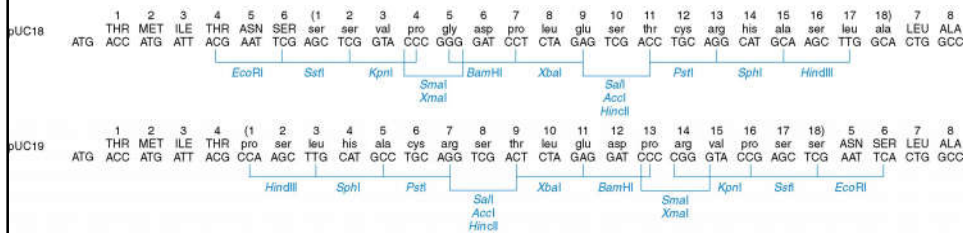
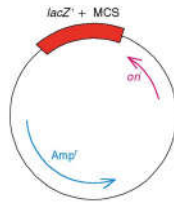
5/18/2020

38

Nguyễn Hữu Trí  
ri@hcmuaf.edu.vn







5/18/2020

41

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Vector tạo dòng là phage

### + Bacteriophage vector

- + Được thiết kế để đi vào chu trình tan
- + Có khả năng sinh sôi nhanh, hiệu quả xâm nhiễm cao hơn hẳn plasmid
- + Tạo dòng tốt với những đoạn DNA lớn hơn nhiều so với plasmid (5-20 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
- + Ưu điểm của vector này là tạo được một số lượng lớn DNA mạch đơn
- + Thường dùng để giải trình tự DNA

5/18/2020

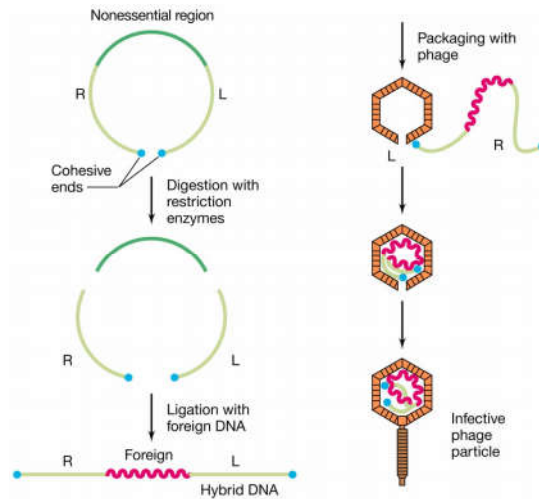
42

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Vector tạo dòng là phage



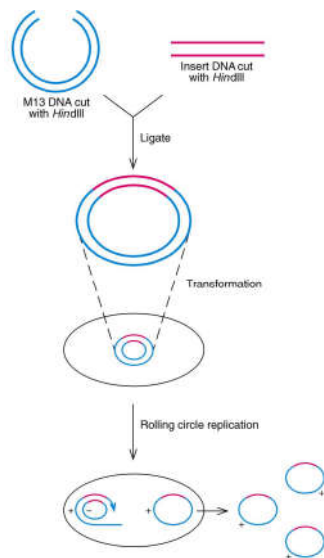
5/18/2020

43

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Vector tạo dòng là phage



5/18/2020

44

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Vector tạo dòng là 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*.

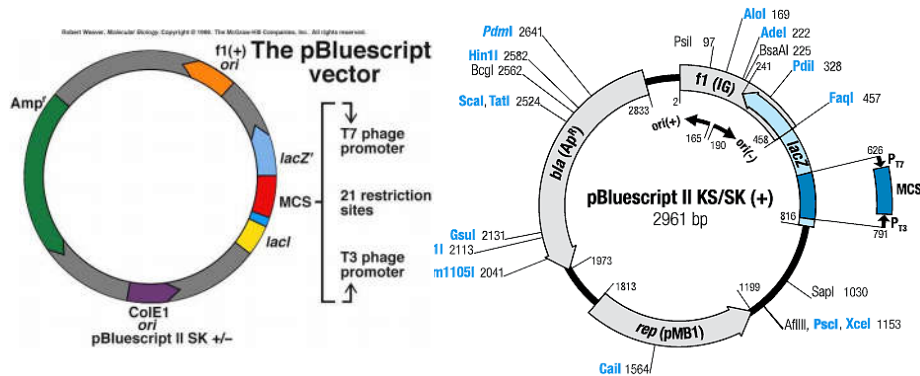
5/18/2020

45

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Vector tạo dòng là Phagemid



5/18/2020

46

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Vector tạo dòng là Cosmid

- Thiết kế nhân tạo bởi sự kết hợp được ưu điểm plasmid DNA và trình tự *cos* từ phage  $\lambda$
- Khi vào trong tế bào chủ, có khả năng sao chép như plasmid. Plasmid tái tổ hợp bền hơn trong tế bào chủ
- Rất tốt để tạo dòng những đoạn gen rất lớn DNA (35-45 kb). Hiệu suất chuyển gen cao hơn
- Plasmids càng lớn thì càng khó thao tác

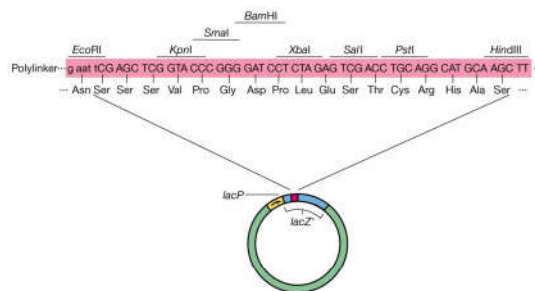
5/18/2020

47

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



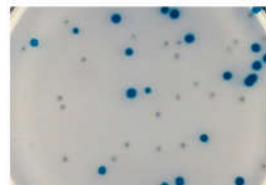
## Vector tạo dòng là Cosmid



(a) M13mp18



(b)



(c)

5/18/2020

48

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn







## Vector tạo dòng là BAC

- BAC (Bacterial artificial chromosome – NST nhân tạo vi khuẩn)
  - 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 tố f; sử dụng giống plasmid.
  - BAC có thể mang đoạn DNA với kích thước từ 75-300 kb.

5/18/2020

49

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Eukaryotic vector

- **Ti plasmid** của *Agrobacterium tumefaciens* dùng để tạo dòng ở thực vật. Kích thước từ 180 – 205 kb, có thể mang đoạn DNA kích thước khá lớn, lên đến khoảng từ 30 - 150 kb.
- **YAC** (Yeast artificial chromosome – NST nhân tạo nấm men) Kích thước 10kb mang được DNA 100 – 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).
- **MAC** (mammalian artificial chromosome – NST nhân tạo động vật hữu nhũ): gồm có tâm động, telomere và ORI của động vật hữu nhũ, mang được đoạn gene từ 10 kb đến nhỏ hơn 1000kb.

5/18/2020

50

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Vector tạo dòng

| Vector                                | Basis                                                                                      | Size limits of insert | Major application                                                          |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Plasmid                               | Naturally occurring multicopy plasmids                                                     | ≤ 10 kb               | Subcloning and downstream manipulation, cDNA cloning and expression assays |
| Phage                                 | Bacteriophage λ                                                                            | 5–20 kb               | Genomic DNA cloning, cDNA cloning, and expression libraries                |
| Cosmid                                | Plasmid containing a bacteriophage λ <i>cos</i> site                                       | 35–45 kb              | Genomic library construction                                               |
| BAC (bacterial artificial chromosome) | <i>Escherichia coli</i> F factor plasmid                                                   | 75–300 kb             | Analysis of large genomes                                                  |
| YAC (yeast artificial chromosome)     | <i>Sacharomyces cerevisiae</i> centromere, telomere, and autonomously replicating sequence | 100–1000 kb (1 Mb)    | Analysis of large genomes, YAC transgenic mice                             |
| MAC (mammalian artificial chromosome) | Mammalian centromere, telomere, and origin of replication                                  | 100 kb to > 1 Mb      | Under development for use in animal biotechnology and human gene therapy   |

5/18/2020

51

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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

5/18/2020

52

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Tế bào chủ

**- *Escherichia 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 gene eukaryote.

**- *Pichia pastoris*:**

**- *Arabidopsis thaliana*:**

5/18/2020

53

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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

5/18/2020

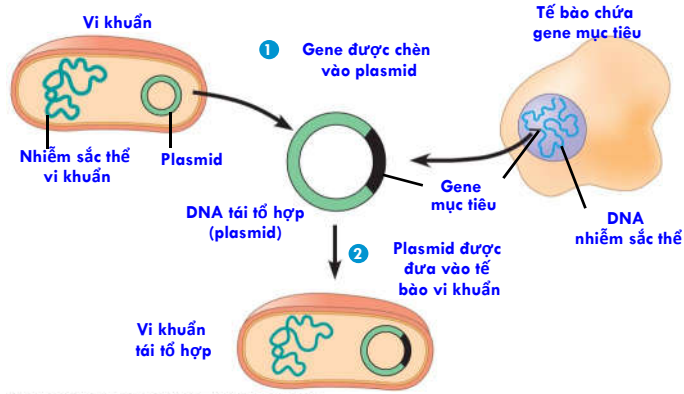
54

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





# Các bước tạo dòng

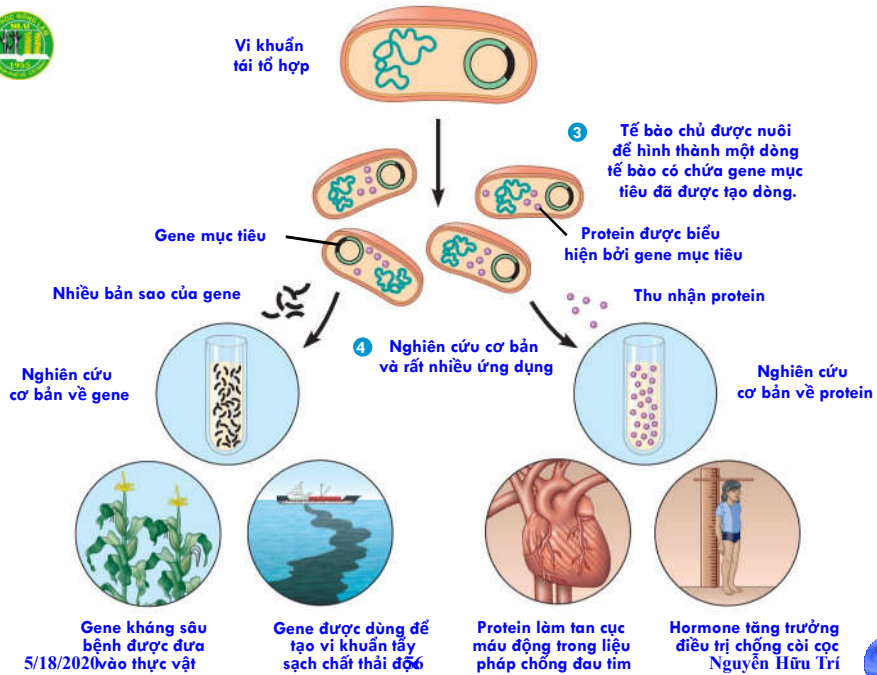


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

5/18/2020

55

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



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



## Tạo dòng một gene từ Eukaryotic vào một plasmid

- Trong tạo dòng gene, plasmid được gọi là vector tạo dòng.
- Một vector tạo dòng là một phân tử DNACó thể mang DNA ngoại lai vào một tế bào chủ và nhân lên độc lập với DNA tế bào chủ.

5/18/2020

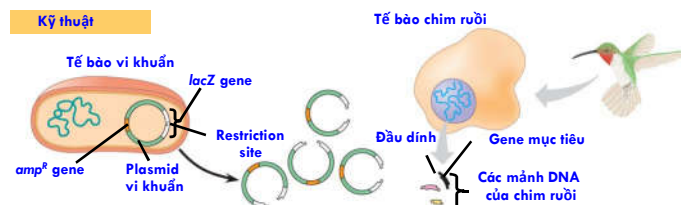
57

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Tạo dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp

- Các bước để tạo dòng gene  $\beta$ -globin từ chim ruồi (hummingbird) vào một plasmid vi khuẩn.



5/18/2020

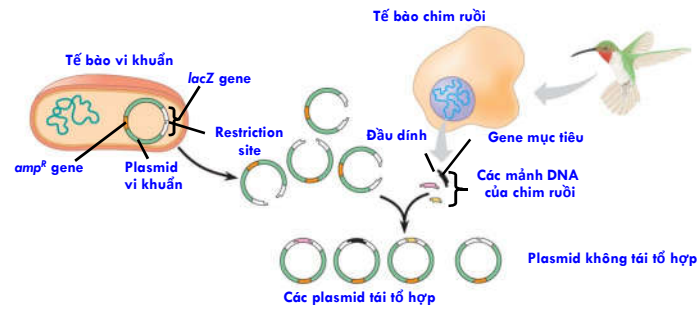
58

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Tạo dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp



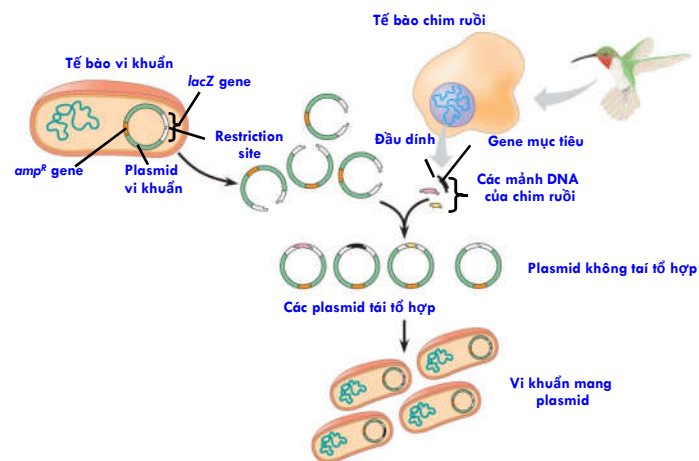
5/18/2020

59

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Tạo dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp

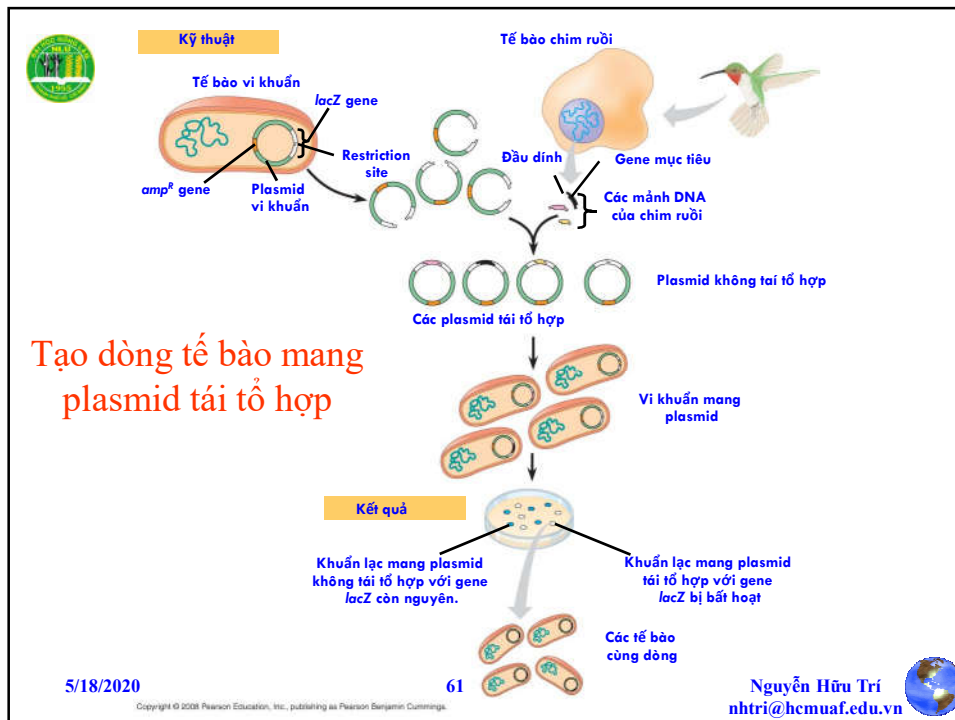


5/18/2020

60

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





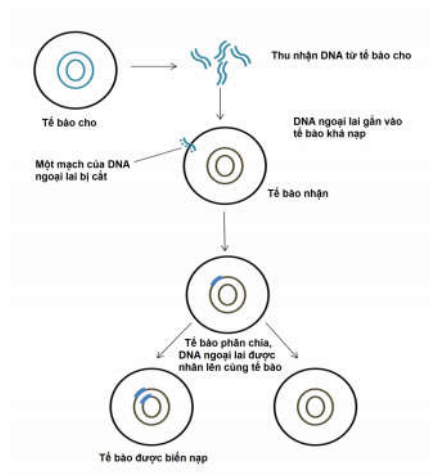
## Tái tạo dòng (subcloning)

- 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

5/18/2020 62 Nguyễn Hữu Trí nhtri@hcmuaf.edu.vn



# Sự biến nạp



5/18/2020

63

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



**TABLE 20.1: LIST OF SELECTED AGENT AS POTENTIAL TO MAKE CELL COMPETENT**

| Bacterial Strains               | Competent agents                                                                         |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | mitomycin C, fluoroquinolone                                                             |
| In <i>B. subtilis</i>           | UV light                                                                                 |
| <i>Helicobacter pylori</i>      | ciprofloxacin                                                                            |
| <i>Legionella pneumophila</i>   | mitomycin C, norfloxacin, ofloxacin, nalidixic acid, bicyclomycin, hydroxyurea, UV light |
| <i>E.Coli</i>                   | Calcium chloride, Rubidium Chloride                                                      |

5/18/2020

64

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn

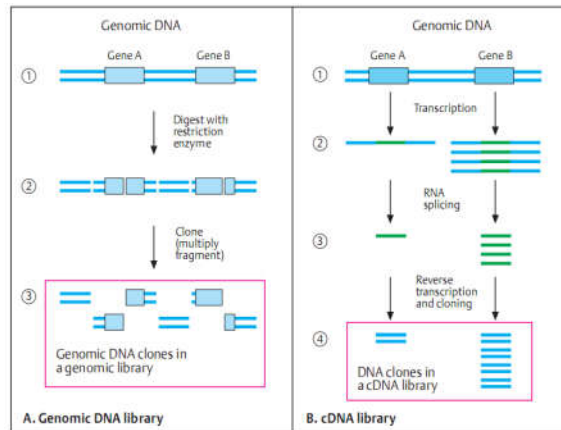






## Thư viện DNA

- 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



5/18/2020

65

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Thư viện bộ gen (Genomic library)

- Thư viện bộ gen được lập là tập hợp tất cả các trình tự DNA cấu thành bộ gen đầy đủ 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. Vector có thể là plasmid hoặc phage.
- Thư viện bộ gen thường được lập cho prokaryote

5/18/2020

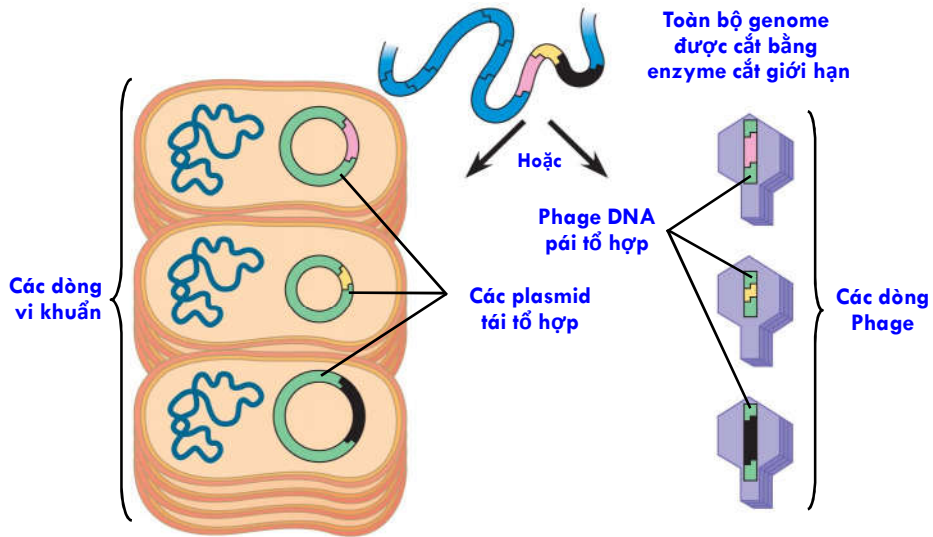
66

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Thư viện bộ gen (Genomic library)



5/18/2020 (a) Thư viện Plasmid

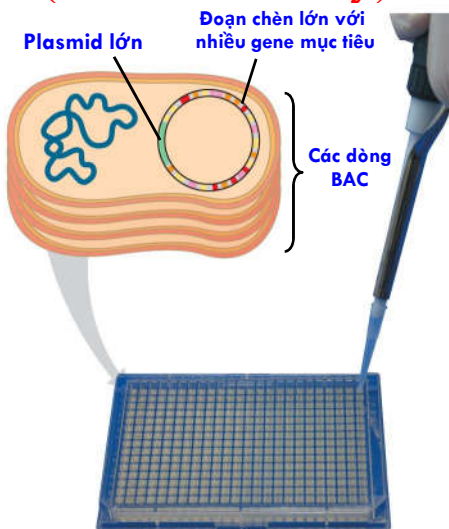
67

(b) Thư viện Phage  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Thư viện bộ gen (Genomic library)

- **Bacterial artificial chromosome (BAC)** là một plasmid lớn đã được biến đổi để có thể mang được đoạn DNA lớn.
- BACs là một loại khác của vector được sử dụng trong xây dựng thư viện DNA.



5/18/2020

68

(c) Một thư viện các dòng  
bacterial artificial chromosome (BAC)  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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.**

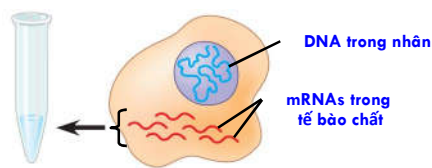
5/18/2020

69

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Tổng hợp cDNA



5/18/2020

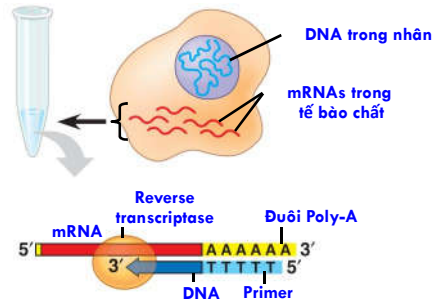
70

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





# Tổng hợp cDNA



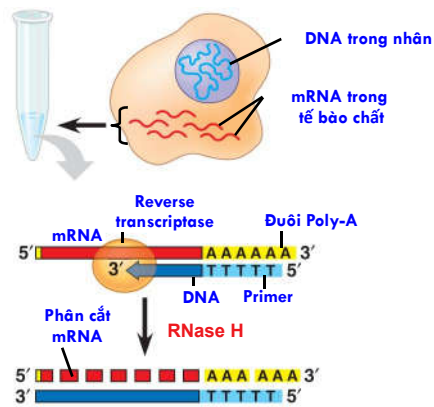
5/18/2020

71

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



# Tổng hợp cDNA

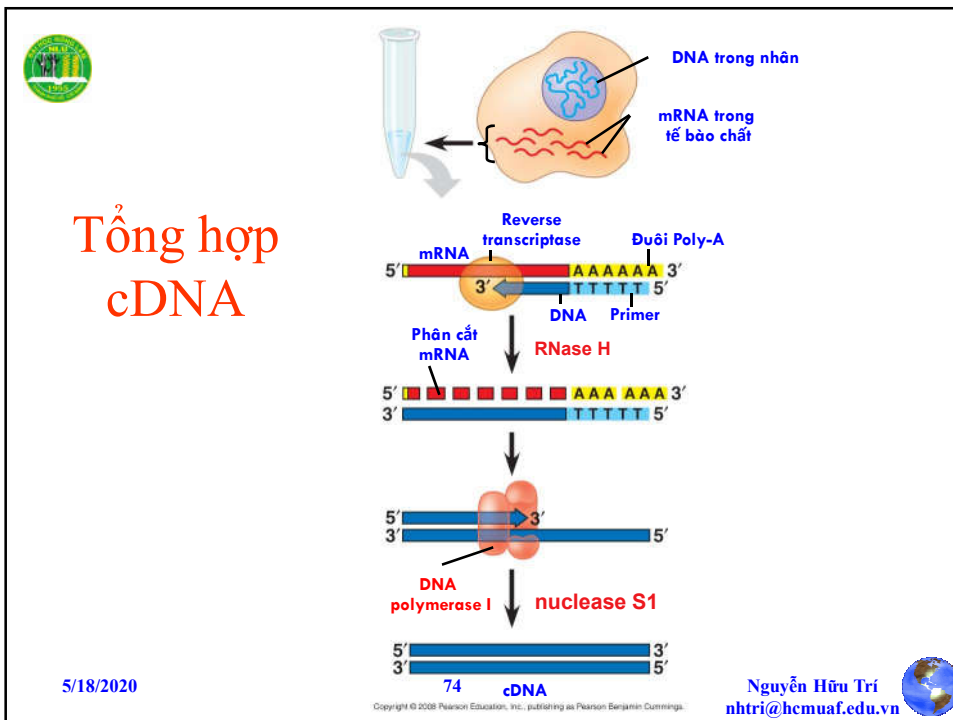
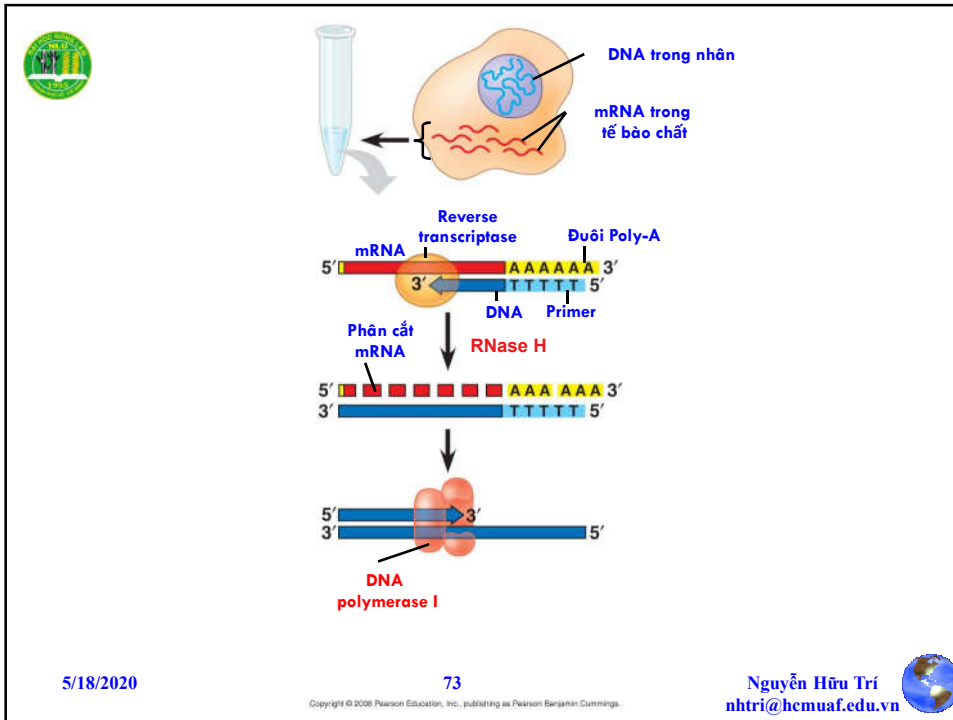


5/18/2020

72

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





# Tổng hợp cDNA



## 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.

5/18/2020

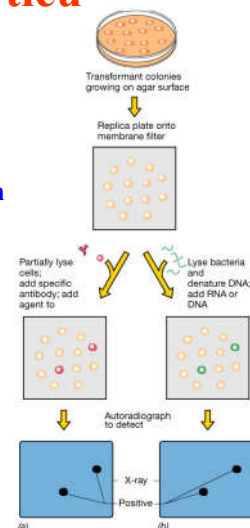
75

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## 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
  - + Bổ 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 *in situ*:
  - + Lai khuẩn lạc (colony hybridization): vector là plasmid
  - + Lai plaque (plaque colonization): vector là phage



5/18/2020

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn

76





## Tuyển chọn dòng mục tiêu

- Một dòng mang gene mục tiêu có thể được xác định bằng cách dùng **nucleic acid probe** có trình tự bổ sung với gene.

Gene mục tiêu 5' **...GGCTAACTTAGC...** 3'

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

Probe (Được đánh dấu) 3' **CCGATTGAATCG** 5'

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

- Quá trình này được gọi là lai **nucleic acid**.

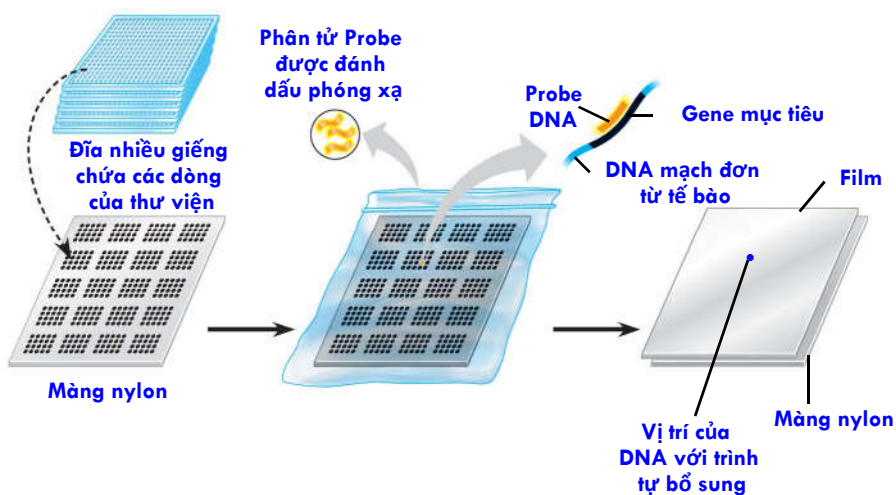
5/18/2020

77

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Tuyển chọn dòng mục tiêu



5/18/2020

78

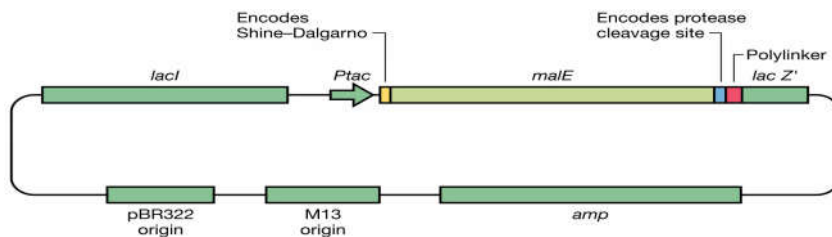
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## 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* (cơ chế tắt mở)



5/18/2020

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn

79



## 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

5/18/2020

80

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn







Những con dê có chứa gen mã hóa cho các protein đông máu của người trong sữa của chúng



Cá hồi 14 tháng tuổi được chuyển gen mã hóa hormon tăng trưởng người GH

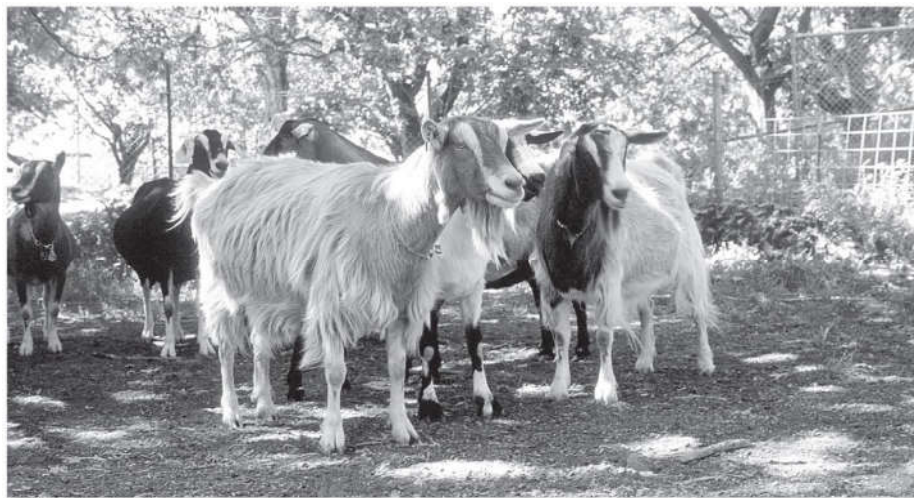
5/18/2020

81

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn

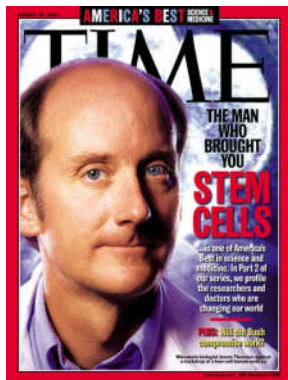


Dê chuyển gene có thể tổng hợp protein trong sữa của chúng – “Bioreactors”



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

nhtri@hcmuaf.edu.vn



20 /08/2001

5/18/2020



30 /08/2004

83



07 /08/2006

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Các động vật chuyển gene

| Đặc điểm                        | Sản phẩm                          | Loài     | Tham khảo              |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------|------------------------|
| Tăng tốc độ phát triển; giảm mỡ | Growth hormone                    | Lợn      | Nottle et al. 1999     |
| Tăng tốc độ phát triển; giảm mỡ | Insulin-like growth factor-1      | Lợn      | Pursel et al. 1999     |
| Tăng chất béo không bền         | Desaturase (spinach)              | Lợn      | Saeki et al. 2004      |
| Tăng chất béo không bền         | Desaturase (C. elegans)           | Lợn      | Lai et al. 2006        |
| Biến dưỡng phosphate            | Phytase                           | Lợn      | Golovan et al. 2001    |
| Thành phần của sữa              | $\alpha$ -lactalbumin             | Lợn      | Wheeler et al. 2001    |
| Kháng cúm                       | Mx protein                        | Lợn      | Muller et al. 1992     |
| Tăng cường miễn dịch            | IgA                               | Lợn, cừu | Lo et al. 1991         |
| Phát triển lông                 | Insulin-like growth factor-1      | Cừu      | Damak et al. 1996a,b   |
| Kháng Visna virus               | Visna virus envelope              | Cừu      | Clements et al. 1994   |
| Kháng BSE                       | Prion protein                     | Gia súc  | Richt et al. 2007      |
| Thành phần béo của sữa          | Stearoyl desaturase               | Dê       | Reh et al. 2004        |
| Protein sữa                     | $\beta$ -casein, $\kappa$ -casein | Gia súc  | Brophy et al. 2003     |
| Protein sữa                     | Human lactoferrin                 | Gia súc  | Platenburg et al. 1994 |
| Kháng viêm vú                   | Lysostaphin                       | Gia súc  | Wall et al. 2005       |

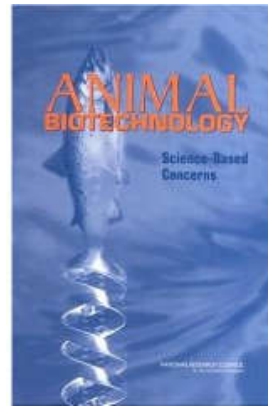
5/18/2020

84

Niemann, H. & W.A. Kues. *Reprod Fertl Dev* 2007; 19: 762-770.

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



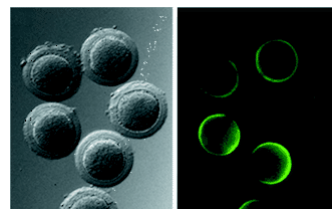


Alba, thỏ **EGFP** (enhanced GFP) được tạo ra năm 2000 như là một tác phẩm nghệ thuật về chuyển gen

5/18/2020

85

Nguyễn Hữu Trí  
[nhtri@ohsu.edu](mailto:nhtri@ohsu.edu)  
<http://www.ekac.org/gfp/bunny.htm#bunnyanchor>



ANDi, động vật linh trưởng đầu tiên chuyển gen được sinh vào tháng 1/2000  
224 trứng chưa thụ tinh của khỉ nâu được cho nhiễm **GFP virus**  
~ Khoảng một nửa trứng được thụ tinh và phân chia  
40 trứng được cấy vào 20 con khỉ mẹ khác  
năm con đực được sinh ra, hai con bị chết non  
ANDi là con khỉ duy nhất còn sống và mang gene **GFP**

5/18/2020

86

Nguyễn Hữu Trí  
[nhtri@ohsu.edu](mailto:nhtri@ohsu.edu)  
<http://www.ohsu.edu/ncpr/archive/2007/01/001andi.shtml>





2003

GloFish –là động vật cảnh đầu tiên được chuyển gen! Thật thú vị.



GloFish, được phát triển ở Singapore. Cá vằn (zebrafish) bình thường có màu đen và bạc được chuyển thành màu xanh hoặc đỏ bằng cách chèn vào các gen GFP khác nhau.

Glofish được bán rộng rãi ở Mỹ ngoại trừ California

Glofish được bán lẻ khoảng \$5 một con.

87

<http://www.cbsnews.com/stories/2003/12/03/eveningnews/main586693.shtml>

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## “Enviro-pigs”

- Lộn chuyển gen phytase vào trong tuyến nước bọt của chúng
- Gen phytase được đưa vào thông qua vi tiêm DNA và sử dụng promoter của các protein tiết của tuyến nước bọt mang tai để kiểm soát sự biểu hiện ở trong tuyến nước bọt
- Lợn và gia cầm không thể tiêu thụ phytate và thường thì một lượng lớn phosphor bị bài tiết ra ngoài
- “Enviro-pigs” giảm đến 75% lượng phosphor bị bài tiết ra



Enviro-pig™ là một động vật thân thiện với môi trường vì đã sử dụng có hiệu quả phospho.

5/18/2020

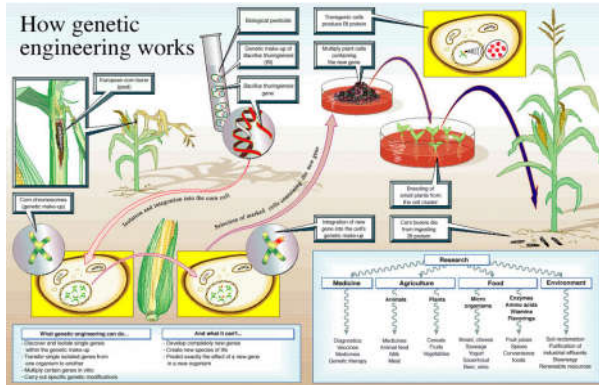
88

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Cây trồng GMO là gì?



Chuyển một gen từ vi khuẩn trong đất vào trong cây trồng để tổng hợp một protein.

Protein đó có tính độc và tiêu diệt một loại côn trùng chọn lọc.

Ví dụ: Bắp BT, bông BT, đậu nành BT, khoai tây BT.



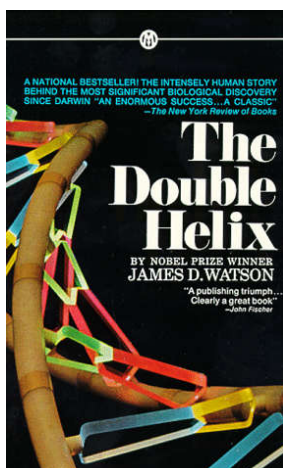
5/18/2020

89

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Những sự kiện quan trọng



- 1953: Khám phá cấu trúc DNA
- 1973: Lần đầu tiên tạo dòng thành công

5/18/2020

90

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





# 1982



FDA cho phép sử dụng insulin tổng hợp nhờ kỹ thuật di truyền.



5/18/2020

91

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Sữa GMO

- Vào những năm 1980, gene tổng hợp growth hormone (somatotropin; BST) của bò được phân tách thành công và được chuyển vào trong tế bào vi khuẩn để tổng hợp một lượng lớn BST. Khi bò được tiêm 30 mg BST làm tăng một cách có nghĩa lượng sữa được tổng hợp (10–30%) và còn làm gia tăng tiếp sản lượng phụ thuộc vào việc tiêm một cách đều đặn.
- Ở đây không có bằng chứng cho thấy sự tăng nồng độ của BST trong sữa hoặc thành phần cấu tạo của sữa khi tiến hành những biến đổi trên.



5/18/2020

92

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Những sự kiện quan trọng



• 1990: Chymosin tái tổ hợp được chấp nhận FDA (Food and Drug Administration)

- Là enzyme dùng trong sản xuất phô mai
- Thường được thu nhận từ dạ dày bê
- Gen thu nhận từ bò được biểu hiện trong vi sinh GRAS (Generally recognized as safe)
- Được sử dụng để sản xuất 80% phô mai ở Mỹ.
- Phô mai dành cho người ăn chay ở Anh

5/18/2020

93

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Các sản phẩm khác từ vi sinh biến đổi gen



- Enzyme thực phẩm
- Amino acid
- Peptide
- Chất tạo hương
- Acid hữu cơ
- Polysaccharide
- Vitamin

5/18/2020





94

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Một vài thực phẩm biến đổi gen

| Several Notable Examples of Genetically Modified Food Technology                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Food                                                                                                            | Development                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|  <p>Golden rice</p>            | <p>Millions of people in the developing world get too little vitamin A in their diets, causing diarrhea, blindness, immune suppression, and even death. The problem is worst with children in east Asia, where the staple grain, white rice, contains no vitamin A. Researchers took genes from plants that produce vitamin A and spliced the genes into rice DNA to create more-nutritious "golden rice" (the vitamin precursor gives it a golden color). Critics charged that biotech companies hyped their product, which contains only small amounts of the nutrient and may not be the best way to combat vitamin A deficiency. India's foremost critic of GM food, Vandana Shiva, charged that "vitamin A rice is a hoax . . . a very effective strategy for corporate takeover of rice production, using the public sector as a Trojan horse." Backers of the technology counter that the nutritive value can be further improved and could enhance the health of millions of people.</p>                                                                                                                                                                               |
|  <p>Flavr Savr tomato</p>      | <p>By reversing the function of a normal tomato gene, the Calgene Corporation created the Flavr Savr tomato, which Calgene maintained would ripen longer on the vine, taste better, stay firm during shipping, and last longer in the produce department. The U.S. Food and Drug Administration approved the Flavr Savr tomato for sale in the United States in 1994. Calgene stopped selling the Flavr Savr in 1996, however, for several reasons, including problems with the technique and public safety concerns.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|  <p>Ice-minus strawberries</p> | <p>University of California-Berkeley researcher Steven Lindow removed a gene that facilitated the formation of ice crystals from the DNA of a particular bacterium, <i>Pseudomonas syringae</i>. The modified, frost-resistant bacteria could then serve as a kind of antifreeze when sprayed on the surface of frost-sensitive crops such as strawberries. The multiplying bacteria would coat the berries, protecting them from frost damage. However, early news coverage of this technique showed scientists spraying plants while wearing face masks and protective clothing, an image that caused public alarm.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|  <p>Bt crops</p>               | <p>By equipping plants with the ability to produce their own pesticides, scientists hoped to boost crop yields by reducing losses to insects. By the late 1980s, scientists working with <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) had pinpointed the genes responsible for producing that bacterium's toxic effects on insects, and had managed to insert the genes into the DNA of crops. The USDA and EPA approved Bt versions of 18 crops for field testing, from apples to broccoli to cranberries. Corn and cotton are the most widely planted Bt crops today. Proponents say Bt crops reduce the need for chemical pesticides. However, critics worry that the continuous presence of Bt in the environment will induce insects to evolve resistance to the toxins and that Bt crops might cause allergic reactions in humans. Another concern is that the crops may harm nontarget species. A 1999 study reported that pollen from Bt corn can kill the larvae of monarch butterflies, a nontarget species, when corn pollen drifts onto milkweed plants, monarchs eat. Another study that year showed that the Bt toxin could leach from corn roots and poison the soil.</p> |

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

5/18/2020

95

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Những sự kiện quan trọng



- 1994: FDA chấp nhận cà chua “Flavr Savr”
  - Thời gian sử dụng được kéo dài
  - Phẩm chất tốt
    - Không bị mềm
    - Không bị nhũn
    - Lâu hư

5/18/2020

96

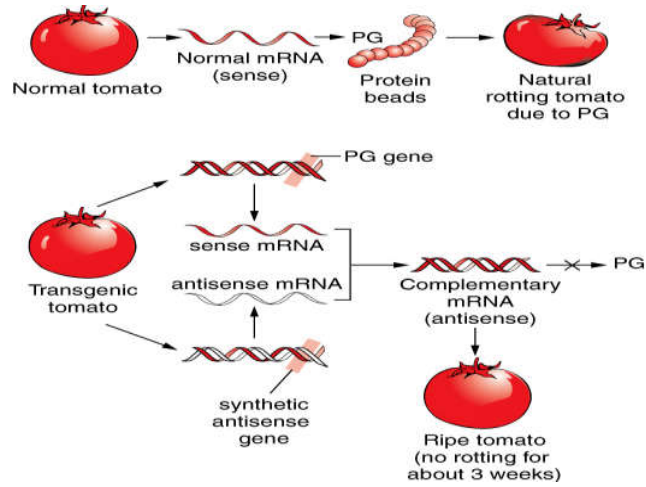
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn







## Cải thiện các đặc điểm sau khi thu hoạch



Trong cà chua enzyme polygalacturonase phá vỡ vách tế bào dẫn đến làm mềm của quả trong quá trình chín.

5/18/2020

97

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Các loại cây trồng biến đổi gen khác



- Trong nông nghiệp
  - Bắp BT
  - Đậu nành
  - Kháng bệnh
- Thực phẩm chất lượng
- Chất dinh dưỡng
- Sản phẩm biến dưỡng
- Vaccine

5/18/2020

98

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Bắp Bt



- Thuốc trừ sâu tự nhiên *Bacillus thuringiensis*
- Không độc đối với con người
- Côn trùng mục tiêu: sâu đục thân bắp.
- Lợi ích:
  - Giảm lượng thuốc trừ sâu
  - Giảm độc tố nấm
- 40% bắp sản xuất ở Mỹ là bắp Bt (2006)

5/18/2020

99

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Kháng thuốc diệt cỏ



- Đậu nành, bắp, cải dầu
- Cho phép cây tiếp tục phát triển sau khi xịt thuốc
- Gia tăng sản lượng
- Tiện ích trong canh tác
- Chiếm 89% diện tích đậu nành ở Mỹ (2006)



5/18/2020

100

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Kháng thuốc diệt cỏ

Diệt cỏ đại bằng cách sử dụng các thuốc diệt cỏ đặc hiệu → cải thiện năng suất >< sức khỏe con người và môi trường.

Tạo ra cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ nhờ vào kỹ thuật di truyền.

Ví dụ: thuốc diệt cỏ dạng glufosinate, thuốc này phá vỡ sự tổng hợp glutamine và dẫn tới độc do sự tích tụ amoniac. Trong ngô, sự kháng này được thực hiện bằng chèn một gen phosphinothricin N-acetyltransferase (pat)

5/18/2020

101

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Câu chuyện về RoundUp Ready

- Glyphosate là một loại thuốc diệt cỏ phổ rộng
  - Là thành phần hoạt động trong thuốc diệt cỏ RoundUp
    - Tiêu diệt tất cả thực vật tiếp xúc với nó
  - Ức chế enzyme chìa khóa (**EPSP synthase**) trong con đường tổng hợp một amino acid.
- Thực vật chết vì thiếu amino acid thiết yếu này
- Một EPSP synthase gene kháng cho phép ngũ cốc có thể tồn tại được sau khi phun thuốc

5/18/2020

102

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Thực vật mẫn cảm với RoundUp

Shikimic acid + Phosphoenol pyruvate

+ Glyphosate

~~Plant~~  
~~EPSP synthase~~

~~3-Enolpyruvyl shikimic acid-5-phosphate~~  
~~(EPSP)~~

Không có amino acid, thực vật chết



~~Aromatic amino acids~~

5/18/2020

103

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Thực vật kháng RoundUp

Shikimic acid + Phosphoenol pyruvate

+ Glyphosate

*Bacterial*  
*EPSP synthase*

RoundUp không có tác dụng;  
Enzyme kháng được thuốc diệt cỏ

3-enolpyruvyl shikimic acid-5-phosphate  
(EPSP)

Có amino acid,  
thực vật sống



Aromatic amino acid

5/18/2020

104

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Ngũ cốc RoundUp Ready



Trước xử lý

Sau xử lý

5/18/2020

105

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Kháng bệnh



Đu đủ biến đổi gen giúp kháng virus  
gây bệnh đốm trên đu đủ

5/18/2020

106

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Sức khỏe và dinh dưỡng



5/18/2020

107

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



- Gạo vàng
  - Tăng cường Vitamin A và Sắt
- Đậu nành, bắp giúp tăng cường cân bằng amino acid cho
- Chuối bổ sung vaccine



## Golden Rice là một sản phẩm GM cung cấp nhu cầu vitamin A



Trên thế giới , 7% trẻ em thiếu vitamin A.

5/18/2020

108

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Câu chuyện về Golden Rice

- Thiếu vitamin A là một vấn đề trầm trọng
  - Nguyên nhân gây ra mù lòa
  - Gây ra sỏi, tiêu chảy
- >100 triệu trẻ em bị thiếu vitamin A
- Bổ sung vitamin A trên diện rộng bằng cách sử dụng lương thực

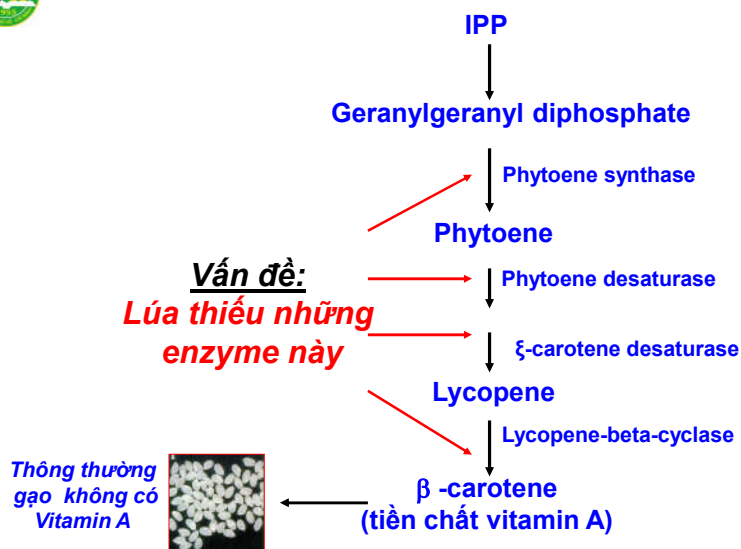
5/18/2020

109

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Con đường tổng hợp $\beta$ -Carotene ở thực vật

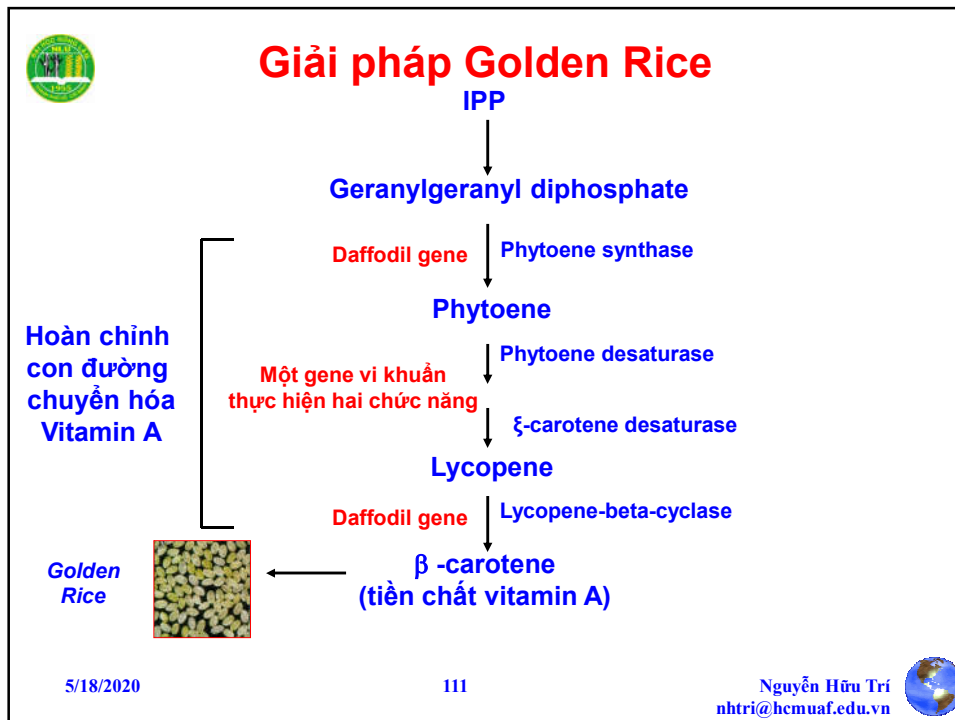


5/18/2020

110

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





**Những sự kiện quan trọng**

- 1999: Sản phẩm bắp, đậu nành GM được hiện 80% trong thực phẩm được chế biến ở Mỹ
  - Bắp:
    - Tinh bột, syrup bắp có nồng độ fructose cao, dầu
  - Đậu nành:
    - Dầu, lecithin, protein

5/18/2020

112

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Những sự kiện quan trọng



- 1999: EU đòi hỏi phải dán nhãn GM, ngăn chặn nhập khẩu bắp, đậu GM

5/18/2020

113

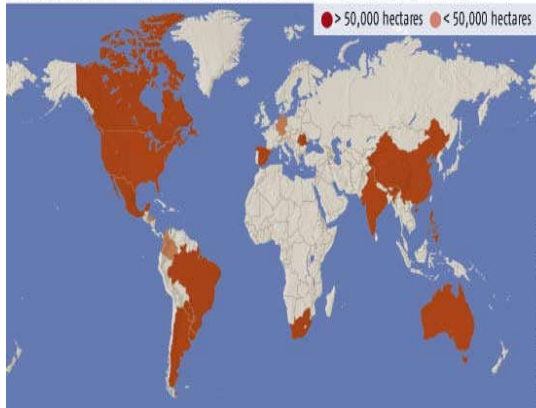
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Những sự kiện quan trọng

### COUNTRIES GROWING GENETICALLY MODIFIED CROPS

In 2004, 81 million hectares worldwide were planted with GM crops, up 20% from 2003



- 2005: 88,8 triệu hecta được trồng trên toàn thế giới
  - Ngũ cốc biến đổi gen
    - 55% ở Mỹ
  - Đậu nành
  - Bắp
  - Bông
    - Ấn độ, Trung Quốc
  - Cải dầu

5/18/2020

114

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



<http://www.isaaa.org>  
<http://www.newscientist.com/data/images/archive/2483/24833301.jpg>



## Cá hồi là động vật chuyển gen đầu tiên được chấp thuận trở thành thực phẩm ở Mỹ.



Nature doi:10.1038/nature.2015.18838

Ngày 19/11/2015 quyết định, được đưa ra bởi Ủy ban kiểm soát Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA), giải phóng cho cá hồi sau hai thập kỷ bị kiểm soát. Quyết định này đã đối mặt với những phản đối từ những nhóm bảo vệ môi trường và an toàn thực phẩm.

Giống cá được biến đổi di truyền, gọi là cá hồi 'AquAdvantage', được tạo ra bởi công ty AquaBounty Technologies of Maynard, Massachusetts, có khả năng biểu hiện ở mức cao hormone tăng trưởng so với giống cá hồi tự nhiên. Giống cá mới này có khả năng phát triển chỉ trong vòng 18 tháng để có được kích cỡ đầy đủ thay vì 3 năm đối với giống tự nhiên.

5/18/2020

115

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## Giá trị của các sản phẩm liên quan đến công nghệ sinh học (2000)

- Thực phẩm và đồ uống – 35 tỉ USD
- Công nghiệp dược phẩm – 24 tỉ USD
- Công nghiệp hóa chất – 12 tỉ USD



5/18/2020

116

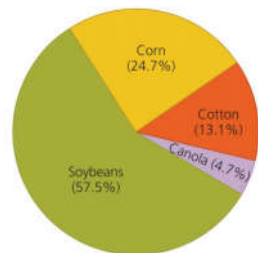
Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Công nghệ sinh học thay đổi cả thế giới

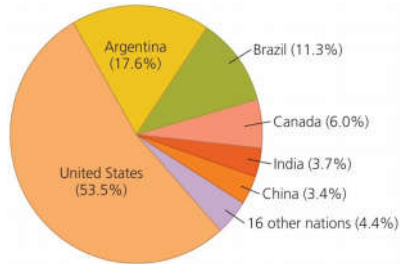
- Thực phẩm biến đổi gen trở thành ngành có giá trị thương mại lớn nhất
- Hầu hết ngũ cốc GM kháng thuốc diệt cỏ



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

5/18/2020

117

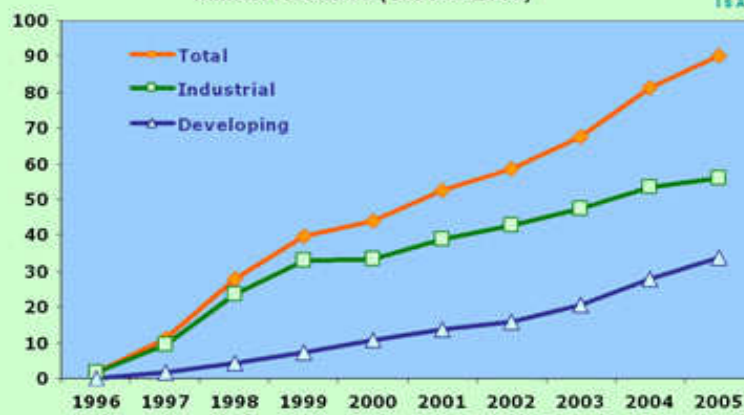


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



## GLOBAL AREA OF BIOTECH CROPS Million Hectares (1996 to 2005)



Increase of 11%, 9.0 million hectares or 22 million acres, between 2004 and 2005.

Source: Clive James, 2005

5/18/2020

118

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn





## Thực phẩm Frankenstein Không kiểm soát được?



- Chèn gene một cách ngẫu nhiên
- Độc tính
  - Các gen mới tổng hợp?
  - Dị ứng
- Ăn DNA!

5/18/2020

119

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn



5/18/2020

120

Nguyễn Hữu Trí  
nhtri@hcmuaf.edu.vn