

11

Kỹ thuật di truyền



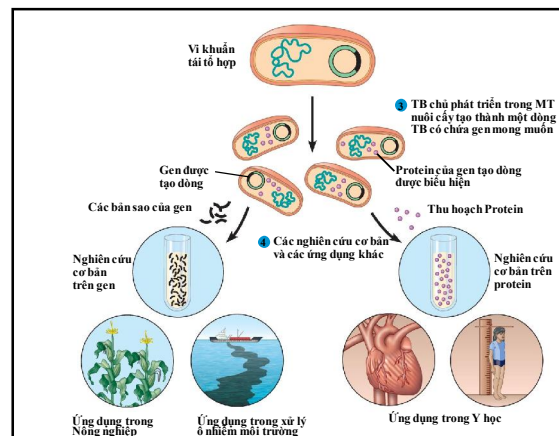
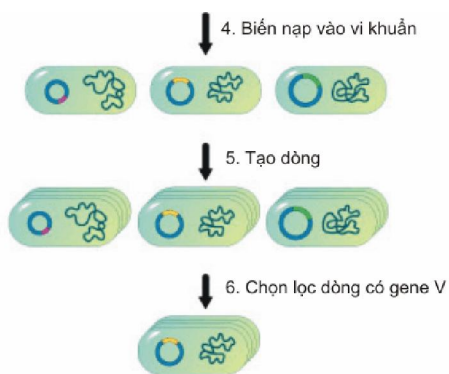
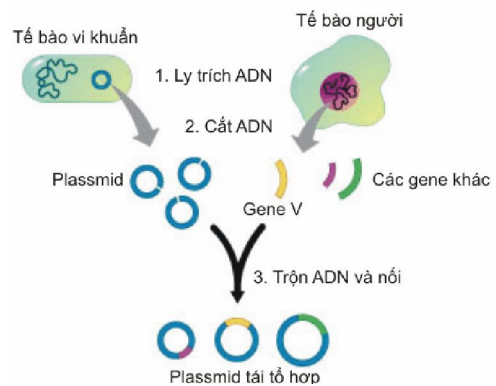
Bùi Tấn Anh – Khoa Khoa Học Tự Nhiên

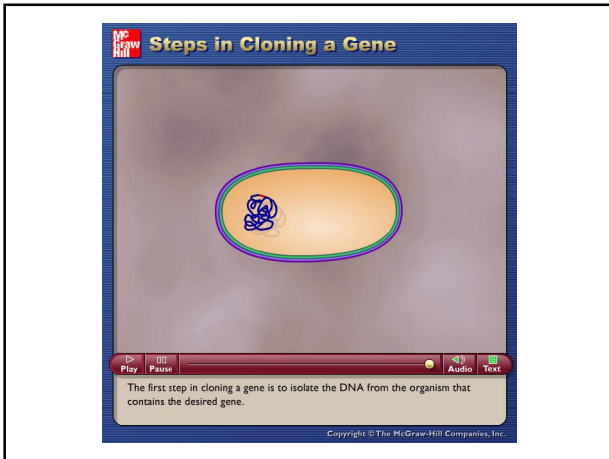
Kỹ thuật di truyền

- Kỹ thuật tái tổ hợp ADN
 - Cắt và nối ADN
 - Chèn ADN tái tổ hợp vào tế bào
 - Phân lập và tạo dòng gen
- Phản ứng PCR
- Ứng dụng của kỹ thuật di truyền

Kỹ thuật tái tổ hợp ADN

- Là kỹ thuật thao tác và tổ hợp ADN từ hai nguồn khác nhau (thường là của hai loài khác nhau)
- Kỹ thuật tái tổ hợp ADN còn được gọi là kỹ thuật tạo dòng gen, gồm các bước:





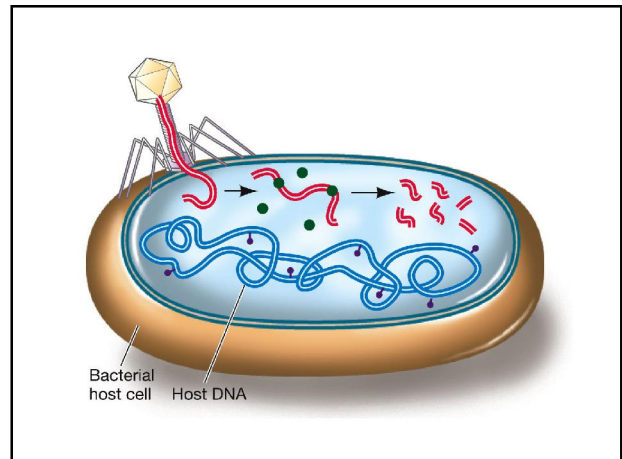
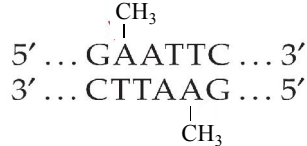
Các enzyme giới hạn

- Vi khuẩn tự bảo vệ chống lại sự xâm nhiễm của các virus bằng cách tạo ra các enzyme giới hạn (**RE = restriction enzymes**)
 - RE cắt liên kết phosphodiester làm cho phân tử ADN của virus bị đứt thành nhiều đoạn nhỏ
 - ADN của ký chủ không bị cắt bởi RE nhờ các vị trí cắt đã được methyl hóa (enzyme methylase gắn nhóm $-CH_3$ vào base A hoặc C tại vị trí cắt)

- Thí dụ: *EcoRI* cắt liên kết giữa G và A tại trình tự:



- Sau khi methyl hóa, RE không nhận biết trình tự cắt



Tên gọi của enzyme giới hạn

- Tên của RE được gọi dựa theo tên của loài vi khuẩn mà enzyme được ly trích.
 - Chữ thứ nhất viết hoa: là chữ đầu tiên trong tên của chi.
 - Chữ thứ hai và ba không viết hoa là hai chữ cái đầu trong tên của loài
 - Chữ thứ tư (nếu có) được viết hoa = tên chủng
- Trong trường hợp ở cùng một loài vi khuẩn người ta tìm được nhiều RE thì sẽ gán thêm số La mã để chỉ thứ tự của RE được phát hiện

- Thí dụ:

- enzyme *EcoRI* là RE đầu tiên được phát hiện ở *Escherichia coli*, chủng RY 13
- enzyme *TaqI* là RE thứ nhất được tìm thấy ở vi khuẩn *Thermus aquaticus*

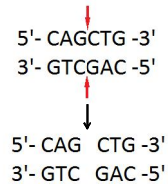
Cơ chế hoạt động của enzyme giới hạn

- Có nhiều loại enzyme giới hạn, mỗi loại nhận biết và cắt tại một vị trí xác định của **trình tự nhận biết (recognition sequence)**
 - Mỗi trình tự có từ 4 đến 6 cặp base
 - Trình tự có tính **đối xứng nghịch đảo (palindrom)**: hai mạch của trình tự hoàn toàn giống nhau khi đọc theo cùng một chiều 5'– 3'

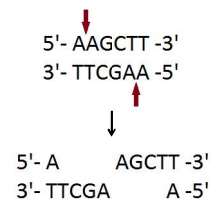
Bảng 1. Trình tự nhận biết và vị trí cắt của một số enzyme giới hạn

Enzyme	Trình tự nhận biết
<i>AluI</i>	A G ↓ C T
<i>BamHI</i>	G ↓ G A T C C
<i>BglII</i>	A ↓ G A T C T
<i>ClaI</i>	A T ↓ C G A T
<i>EcoRI</i>	G ↓ A A T T C
<i>HaeIII</i>	G G ↓ C C
<i>HindII</i>	G T P y ↓ P u A C
<i>HindIII</i>	A ↓ A G C T T
<i>HpaII</i>	C ↓ C G G
<i>KpnI</i>	G G T A C ↓ C
<i>MboI</i>	↓ G A T C
<i>PstI</i>	C T G C A ↓ G
<i>PvuI</i>	C G A T ↓ C G
<i>SaII</i>	G ↓ T C G A C
<i>SmaI</i>	C C C ↓ G G G
<i>XmaI</i>	C ↓ C C G G G
<i>NciI</i>	G C ↓ G G C C G C

- Một số enzyme giới hạn cắt hai mạch ADN tại cùng một vị trí tạo ra **đầu tẻ (Blunt end)**
- Thí dụ: *Pvu II*



- Một số khác có vị trí cắt lệch nhau tạo ra các đầu so le gọi là **đầu dính (sticky end)**
- Thí dụ: enzyme *Hind III*



- Khi dùng *EcoRI* để cắt một phân tử ADN dài sẽ tạo thành nhiều đoạn có chiều dài trung bình là 4.098 cặp base. **Tại sao??**

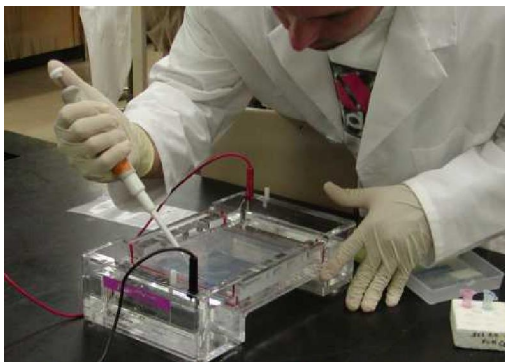
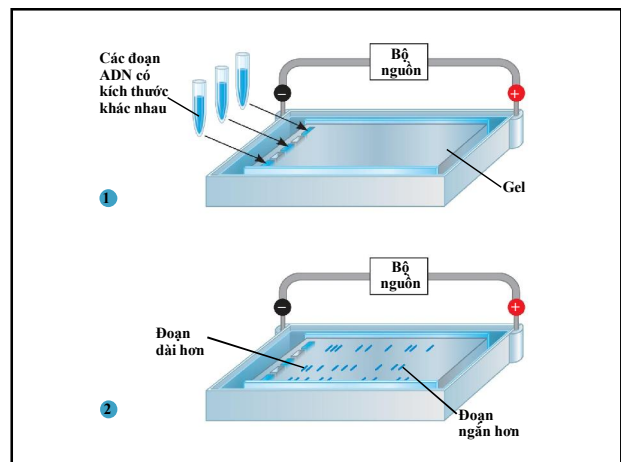
Phương pháp điện di

- Sau khi ADN bị cắt, các đoạn có kích cỡ khác nhau có thể được tách ra bằng cách dùng phương pháp điện di (**electrophoresis**).
 - ADN tích điện âm – do nhóm phosphate bị ion hóa
 - Trong một dung dịch điện ly có pH gần trung tính, các đoạn ADN sẽ dịch chuyển về phía cực dương của điện trường.

- Tốc độ di chuyển phụ thuộc vào:
 - Kích thước của đoạn ADN: đoạn có kích thước nhỏ di chuyển nhanh hơn đoạn lớn
 - Điện thế
 - Thành phần của dung dịch đệm
 - Nồng độ của gel
 - Nhiệt độ

- Hai loại Gel thường được dùng là Agarose hoặc Polyacrylamide
 - Gel Polyacrylamide thường dùng để tách các đoạn có kích thước từ 6 – 1000 bp (cặp base)
 - Gel Agarose thường dùng để tách các đoạn có kích thước từ 70 – 10.000 bp

- Sau khi tách, các đoạn ADN sẽ hiện hình khi soi bằng đèn tử ngoại nếu chúng được nhuộm bằng Ethidium bromide (một loại phẩm phát huỳnh quang dưới ánh sáng của đèn tử ngoại)

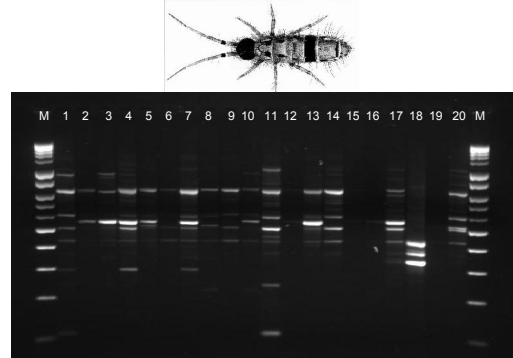


Phương pháp điện di cung cấp hai thông tin:

1. Kích cỡ của đoạn ADN:

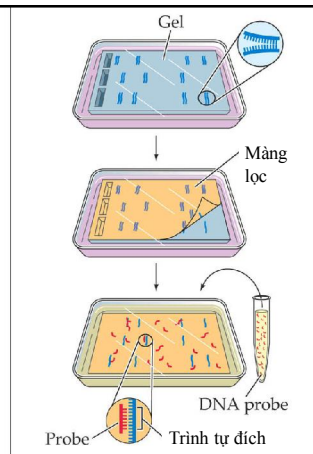
- Có thể xác định kích cỡ của đoạn ADN bằng cách so sánh với một đoạn ADN có kích cỡ biết trước (marker) đã được cho vào gel khi chạy điện di.

Phân tích tính đa hình của quần thể *Ochichela cincta* bằng phương pháp RAPD



2. Trình tự của ADN:

- Có thể xác định trình tự của đoạn ADN bằng cách dùng mẫu dò (probe)
- Mẫu dò là một đoạn ADN mạch đơn có trình tự các nucleotide biết trước đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ



Vector chuyển gen

• **Vectors** phải có 4 đặc điểm:

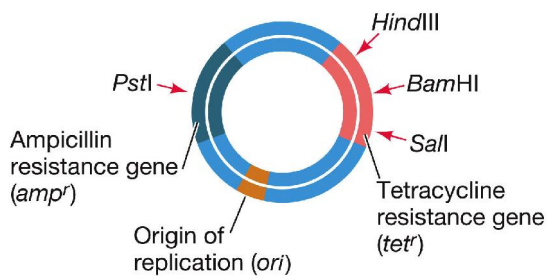
- Kích thước tương đối nhỏ so với NST của TB chủ
- Có thể nhân đôi độc lập trong TB chủ
- Mỗi enzyme giới hạn chỉ có một trình tự nhận biết duy nhất.
- Phải có dấu chuẩn di truyền (genetic marker) cho phép phát hiện chúng trong TB chủ

Plasmid

• **Plasmids** là các vector lý tưởng cho việc chuyển ADN tái tổ hợp vào trong vi khuẩn

- Plasmids thường có các gen kháng chất kháng sinh, đóng vai trò là một dấu chuẩn di truyền
- Plasmids có thể dùng để chuyển các gen có kích thước ≤ 10.000 bp

(A) Plasmid pBR322
Host: *E. coli*



Thực khuẩn thể

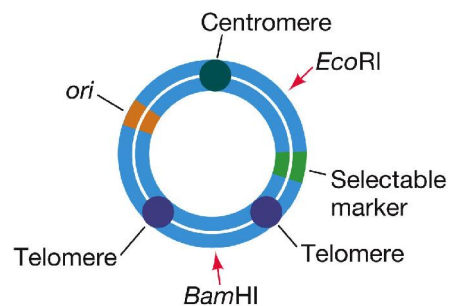
- **Thực khuẩn thể** có thể dùng làm vector để chuyển các gen có trình tự lớn hơn (≤ 20.000 bp)
 - Các gen của thực khuẩn thể gây sinh tan TB chủ có thể được cắt bỏ và thay bằng một đoạn ADN khác

NST nhân tạo của nấm men (YAC)

• **NST nhân tạo của nấm men (Yeast artificial chromosome)**

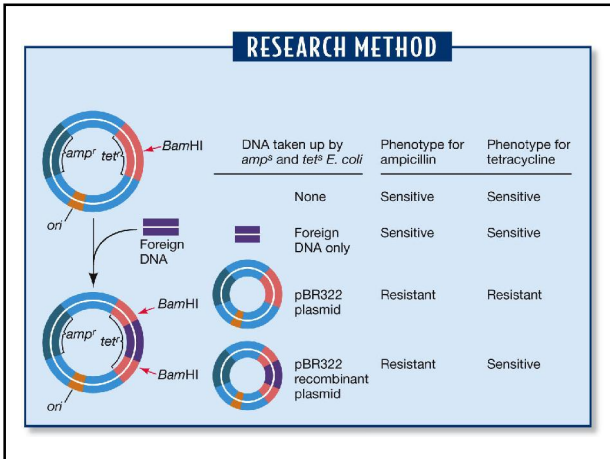
- có điểm khởi đầu sao chép (origin of replication) của nấm men, trình tự tâm động, và đầu tận cùng (telomeres) giống như cấu trúc một NST của TB chân hạch
- Có thể chuyển các đoạn ADN kích thước lên đến 1,5 triệu pb

(B) Yeast artificial chromosome
Host: yeast



- Sau khi biến nạp, thường chỉ có một phần nhỏ tế bào chủ có các vector tái tổ hợp.
- Lúc này trong môi trường nuôi cấy có 3 loại TB chủ:
 - TB không biến nạp được plasmid
 - TB có biến nạp, nhưng không có plasmid tái tổ hợp
 - TB có biến nạp plasmid tái tổ hợp
- Như vậy bằng cách nào có thể nhận dạng được TB có chứa plasmid tái tổ hợp?

- Một cách thường được thực hiện là dùng *E. coli* làm TB chủ và vector là một plasmid có gen kháng chất kháng sinh
 - Plasmid có gen kháng ampicillin và tetracycline.
 - Plasmid chỉ có một vị trí cắt cho enzyme *Bam*HI, nằm bên trong gen kháng tetracycline
 - Nếu ADN được chèn vào vị trí cắt nó sẽ làm bất hoạt gen kháng tetracycline
 - Plasmid vẫn còn gen kháng ampicillin, do đó ampicillin có thể được dùng để chọn lọc các TB chủ có vector tái tổ hợp



Phản ứng PCR

- The **Polymerase Chain Reaction (PCR)** là một phương tiện cực kỳ nhạy để khuếch đại một lượng tương đối lớn ADN
- Lần đầu tiên được Kary Mullis mô tả năm 1985 (đến năm 1993 nhận giải thưởng Nobel)
- Kỹ thuật này có thể được tiến hành nhờ sự phát hiện ra enzyme *Taq* polymerase, một loại ADN polymerase có trong vi khuẩn *Thermus aquaticus* ở vùng suối nước nóng

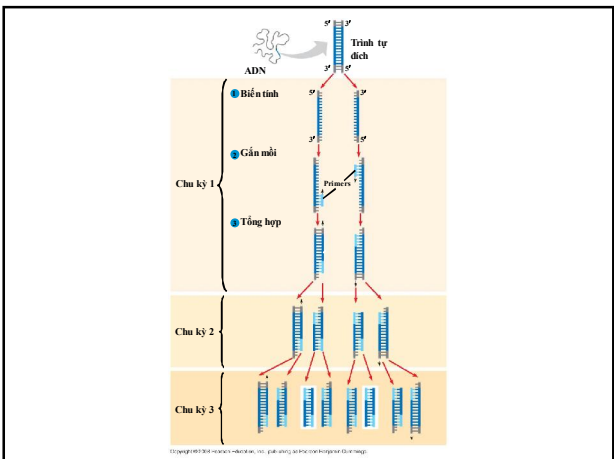
Phản ứng PCR

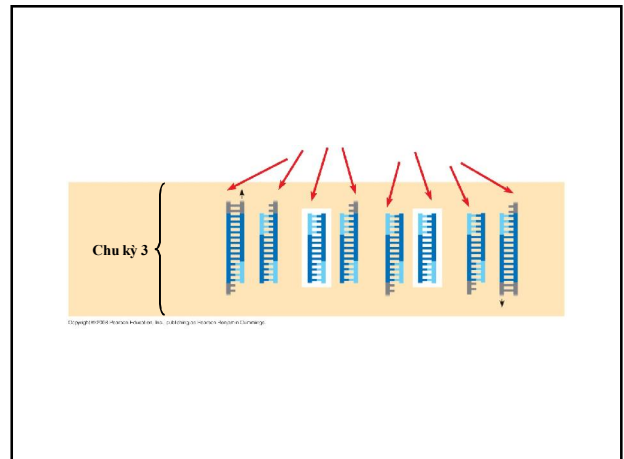
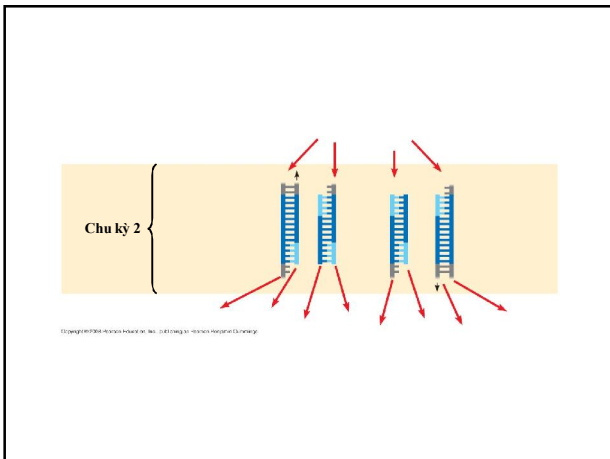
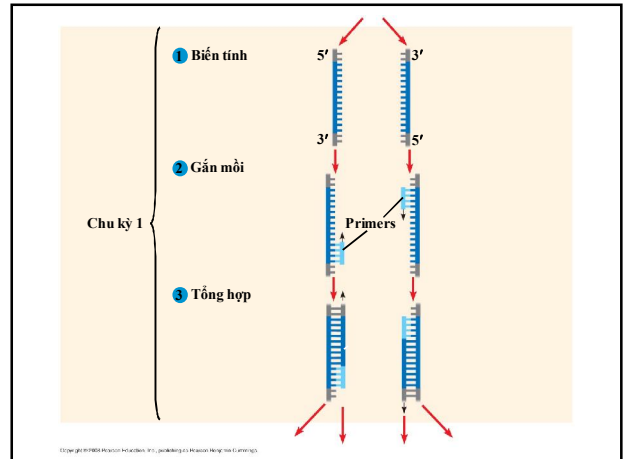
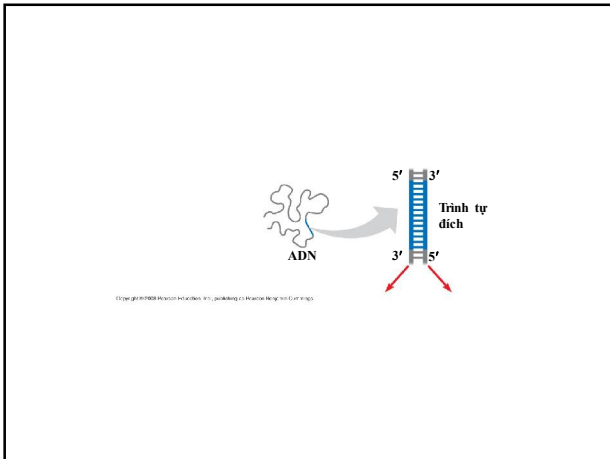
- Các nguyên liệu và phương tiện cần thiết:
 - Các nucleotides tự do: dNTP
 - ADN khuôn
 - Một cặp mồi (Primer): mồi ngược và mồi xuôi
 - Taq* polymerase
 - Dung dịch đệm (buffer)
 - Máy luân nhiệt (Thermocycler)



Polymerase Chain Reaction

- PCR được thực hiện từ 20 – 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước:
 - Biến tính (Denaturation)
 - Gắn mồi (Annealing)
 - Tổng hợp (Extension)





Polymerase Chain Reaction

Play Pause Audio Text

The polymerase chain reaction is a method for making many copies of a specific segment of DNA, starting with a very small amount.

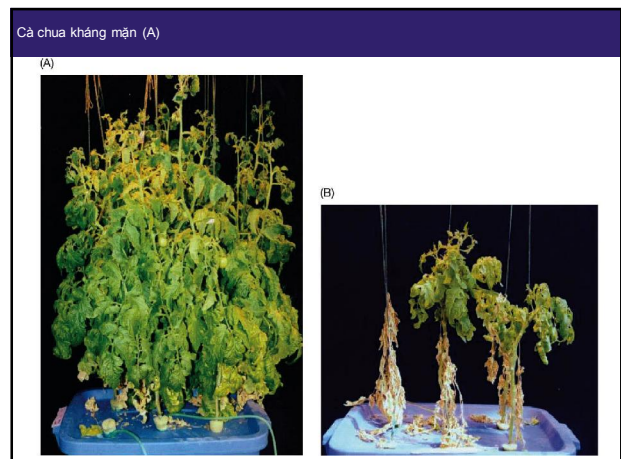
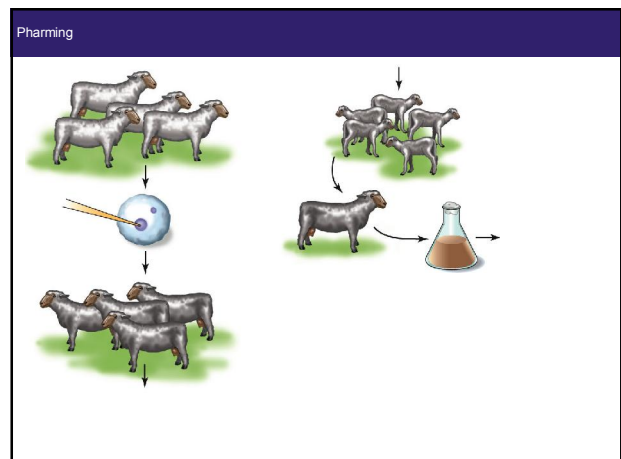
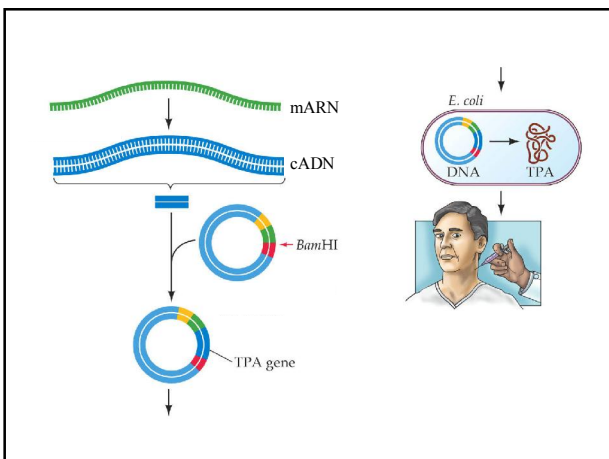
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

Ứng dụng của Kỹ thuật Di truyền

- **Công nghệ sinh học (Biotechnology)** sử dụng các tế bào sống để tạo ra các nguyên liệu hữu dụng cho con người
 - Nấm men được dùng sản xuất bia, rượu vang; vi khuẩn được dùng sản xuất cheese, yogurt, v.v...
 - Các vi khuẩn được dùng sản xuất các chất kháng sinh, rượu và một số sản phẩm khác

- Ngày nay, sự tạo dòng gen được dùng để sản xuất một lượng lớn protein
 - Phần lớn các gen có thể được chèn vào vi khuẩn hoặc nấm men. Các tế bào này có thể được dùng tạo ra một lượng lớn sản phẩm

- Nhiều loại dược phẩm đã được tạo ra nhờ kỹ thuật tái tổ hợp ADN
- Thí dụ:
 - TPA (tissue plasminogen activator) đang được sản xuất từ vi khuẩn *E. coli* nhờ kỹ thuật tái tổ hợp ADN
 - TPA là một enzyme xúc tác sự biến đổi plasminogen trong máu thành plasmin. Plasmin là một protein có khả năng hòa tan cục máu (clot)



Đậu nành được chuyển gen Bt từ vi khuẩn

