



ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN - ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
KHOA SINH HỌC - BỘ MÔN DI TRUYỀN HỌC

CÔNG NGHỆ **ADN TÁI TỔ HỢP**

ĐINH ĐOÀN LONG

DI TRUYỀN HỌC PHÂN TỬ VÀ TẾ BÀO



NỘI DUNG

- 🌐 KHÁI NIỆM CHUNG**
- 🌐 ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?**
- 🌐 TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC**
- 🌐 TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP**
- 🌐 CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP**
- 🌐 NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN**
- 🌐 SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN**



NỘI DUNG

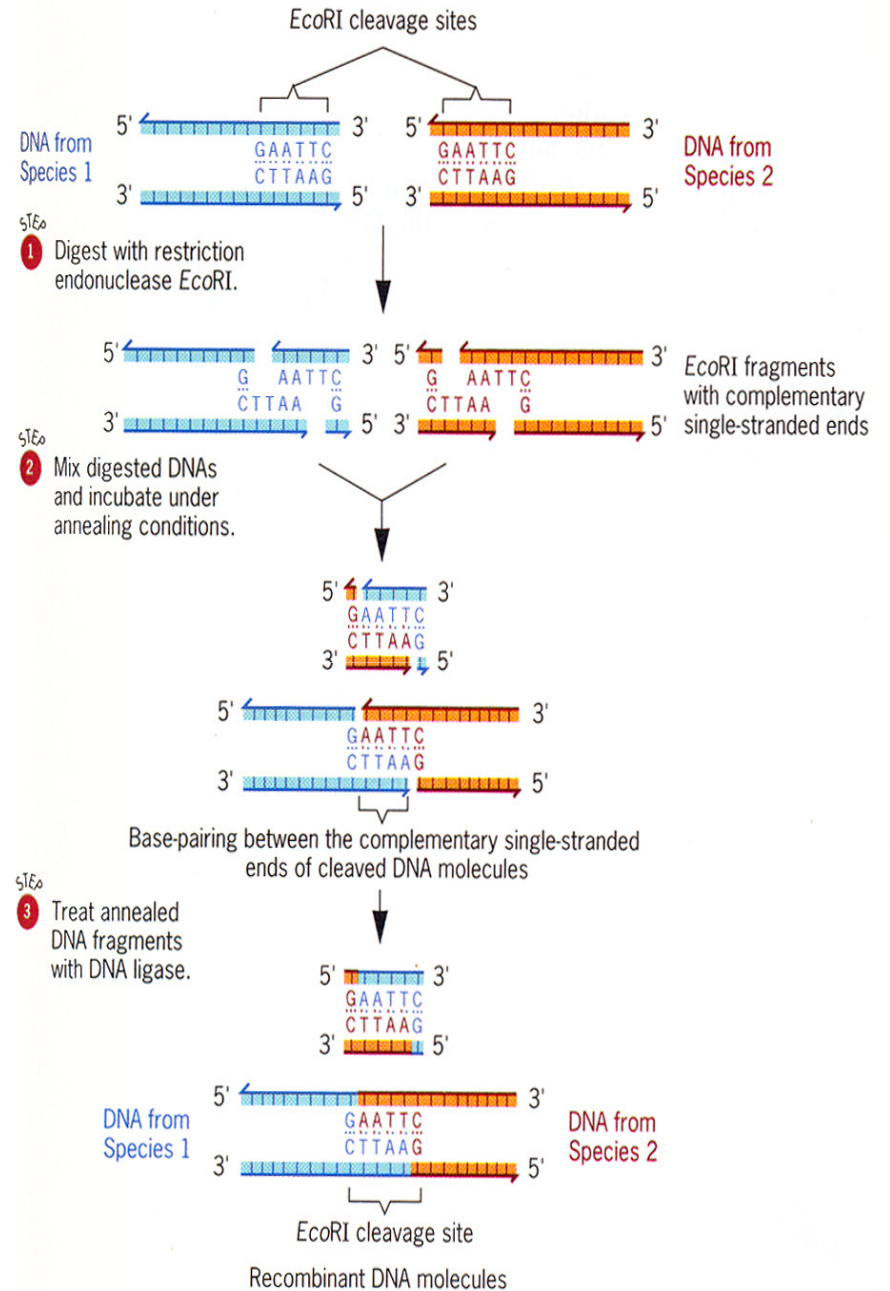
- 🌐 **KHÁI NIỆM CHUNG**
- 🌐 ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?
- 🌐 TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC
- 🌐 TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP
- 🌐 CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP
- 🌐 NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN
- 🌐 SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN



KHÁI NIỆM CHUNG

ADN tái tổ hợp (recombinant DNA) được dùng để chỉ các phân tử ADN được tạo ra từ hai hay nhiều phân đoạn ADN xuất xứ từ các nguồn gốc khác nhau.

Trong thực tế, **công nghệ ADN tái tổ hợp** đôi khi được dùng đồng nghĩa với các thuật ngữ **nhân dòng phân tử (molecular/DNA cloning)**, hay **kỹ thuật di truyền (genetic engineering)**. Nhưng thực chất các thuật ngữ này có khác nhau.





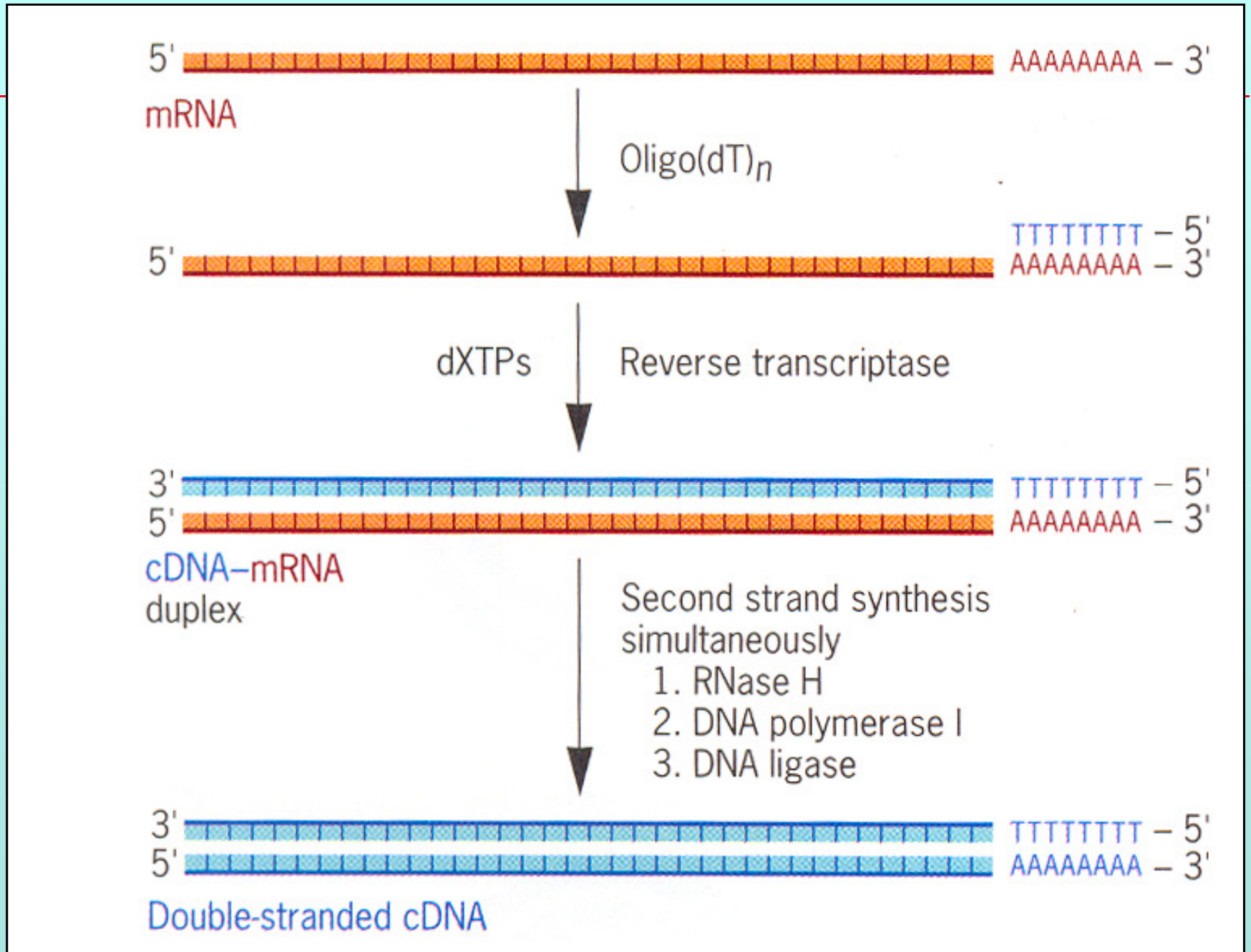
KHÁI NIỆM CHUNG

MỤC ĐÍCH

- 1. Phân lập các gen từ hỗn hợp nhiều gen trong tế bào, để có thể phân tích và nghiên cứu từng gen riêng lẻ.**
- 2. Nhân một dòng gen đã được phân lập lên một số lượng lớn, để đáp ứng đủ cho nhu cầu nghiên cứu.**
- 3. Khả năng tạo ra những gen/tổ hợp gen mới.**

VẬT LIỆU TÁCH DÒNG GEN

- 1. ADN**
- 2. mARN (sử dụng kỹ thuật RT-PCR).**





NỘI DUNG

- 🌐 KHÁI NIỆM CHUNG
- 🌐 **ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?**
- 🌐 TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC
- 🌐 TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP
- 🌐 CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP
- 🌐 NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN
- 🌐 SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN



ADN TÁI TỔ HỢP THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?

CÁC BƯỚC CƠ BẢN THỰC HIỆN ADN TÁI TỔ HỢP

- 1. Chọn nguồn gen cần tách dòng chứa trình tự quan tâm.**
- 2. Chuẩn bị ADN ngoại lai có các đầu 3', 5' phù hợp.**
- 3. Chọn lọc vectơ (thể truyền) phù hợp.**
- 4. Cải biến đầu 3' và 5' của vectơ và phân tử ADN ngoại lai.**
- 5. Nối phân tử ADN vectơ và ADN ngoại lai.**
- 6. Đưa vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ và nhân lên.**
- 7. Sàng lọc để chọn các dòng tế bào mang vectơ tái tổ hợp.**
- 8. Xác định đặc tính các dòng, và sử dụng các dòng cho các mục đích nghiên cứu khác nhau.**



NỘI DUNG

- 🌐 KHÁI NIỆM CHUNG
- 🌐 ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?
- 🌐 **TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC**
- 🌐 TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP
- 🌐 CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP
- 🌐 NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN
- 🌐 SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN



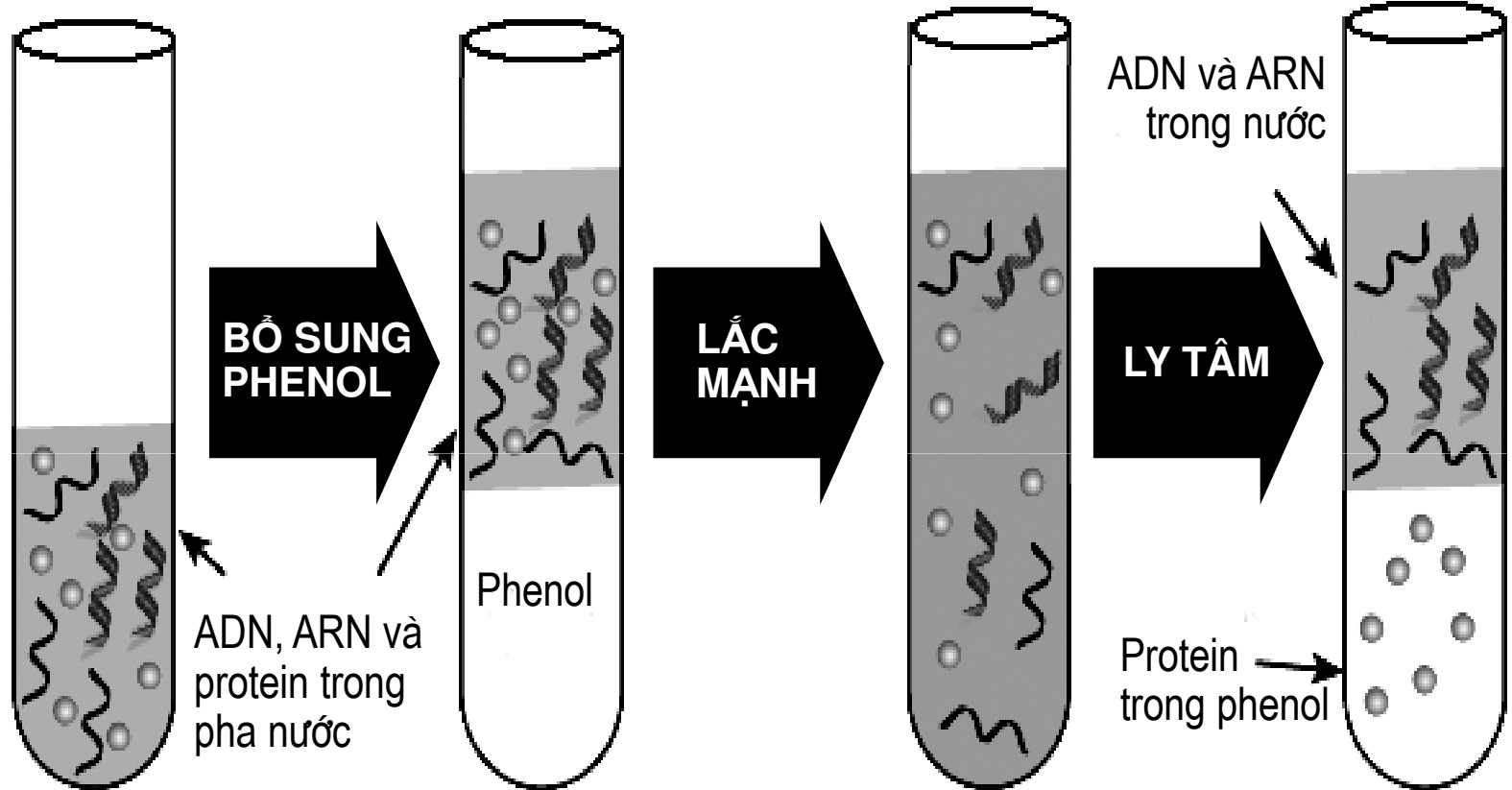
TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH AXIT NUCLEIC

MỘT SỐ NGUYÊN TẮC CƠ BẢN TÁCH CHIẾT ADN

- Các dung môi hữu cơ làm mất nước, thay đổi môi trường điện môi → kết tủa protein & ADN.
- Độ pH thường trung tính hoặc hơi kiềm (7,0 – 8,5).
- Phenol, chloroform, isoamylalcohol thường được dùng để kết tủa protein (vd. Chloroform/isoamylalcohol 24/1).
- Một số hợp chất chống oxy hóa như 2-mercapthoethanol, DTT (dithiothreitol), 8-hydroxyquinoline làm giảm nguy cơ gây biến tính axit nucleic. SDS làm vỡ màng tế bào. EDTA loại các ion kim loại.
- CTAB loại bỏ các hợp chất polysaccharide / polyphenol ở thực vật. Lysozyme được dùng để phân giải lớp peptidoglycan ở vi khuẩn.
- Các dung môi alcohol (vd. EtOH, MeOH, 2-propanol) được dùng để kết tủa axit nucleic. Các muối (vd. acetate) trung hòa điện tích và làm giảm khả năng tan của axit nucleic. T° -20°C / 0°C (1/2h – 24h).



TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH AXIT NUCLEIC



DÙNG PHENOL LOẠI PROTEIN KHỎI DỊCH CHIẾT ADN VÀ ARN



TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH AXIT NUCLEIC

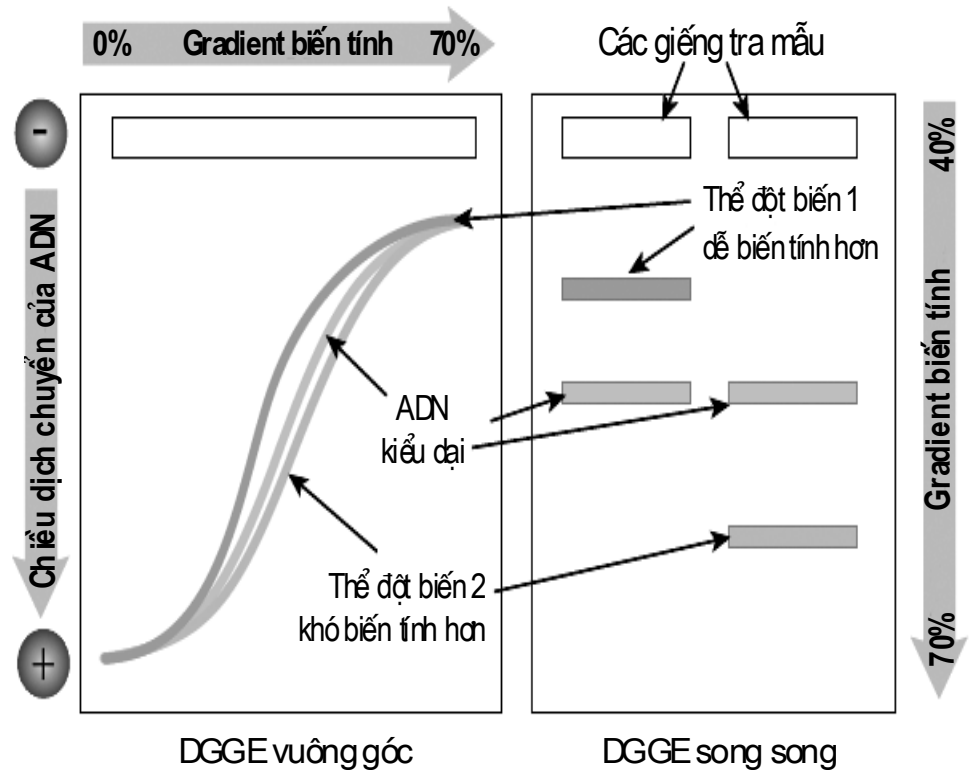
MỘT SỐ NGUYÊN TẮC CƠ BẢN TÁCH CHIẾT ARN

- Để tách chiết mARN, người ta thường dùng cột Oligo dT – cellulosa, hoặc cột hấp thụ từ tính với biotin-oligo(dT).
- Định tính và định lượng ADN dựa trên phương pháp điện di và đo quang phổ ở các bước sóng 260 và 280 nm.
 - ❖ $1,0 A_{260\text{nm}} \approx 50 \mu\text{g} / \text{ml dsADN}$
 - ❖ $1,0 A_{260\text{nm}} \approx 40 \mu\text{g} / \text{ml ssADN} / \text{ARN}$
 - ❖ $1,0 A_{260\text{nm}} \approx 33 \mu\text{g} / \text{ml dNTP} / \text{oligonucleotide}$



ĐIỆN DI PHÂN TÍCH AXIT NUCLEIC

- **Gel polyacrylamid** ADN 1 – 1000 bp
- **Gel agarose** ADN / ARN 20 bp – 20 kb
- **PFGE** ADN 10 kb – 10 Mb
- **DGGE** ADN/ARN Sai khác một vài nucleotit





NỘI DUNG

- 🌐 KHÁI NIỆM CHUNG
- 🌐 ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?
- 🌐 TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC
- 🌐 **TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP**
- 🌐 CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP
- 🌐 NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN
- 🌐 SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN



VỀ VECTƠ / THỂ TRUYỀN

- Vectơ nhân dòng
- Vectơ biểu hiện

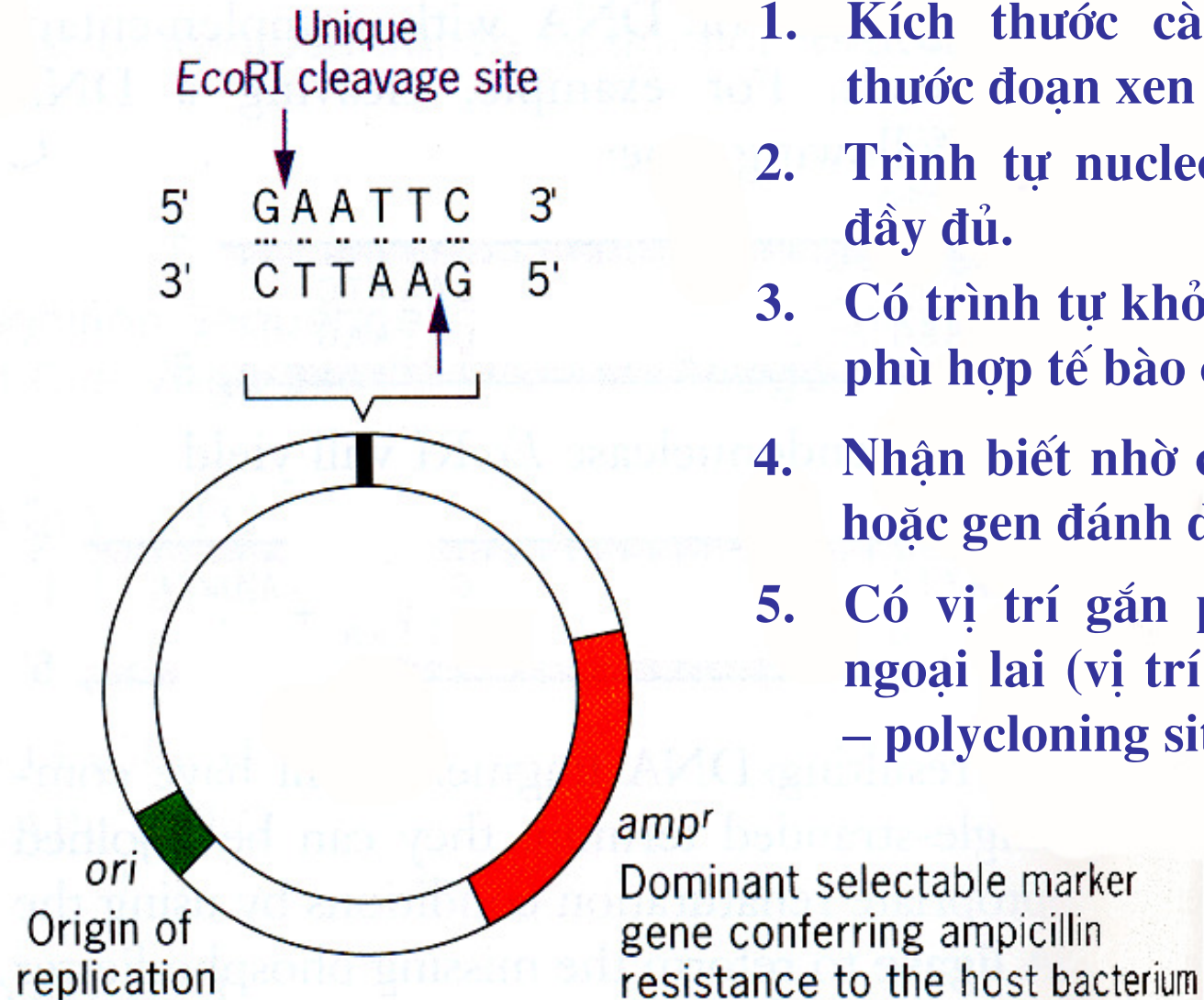
1. Kích thước càng nhỏ, kích thước đoạn xen càng lớn.
2. Trình tự nucleotit được biết đầy đủ.
3. Có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ.





CÁC ĐẶC TÍNH CHUNG CỦA VECTO

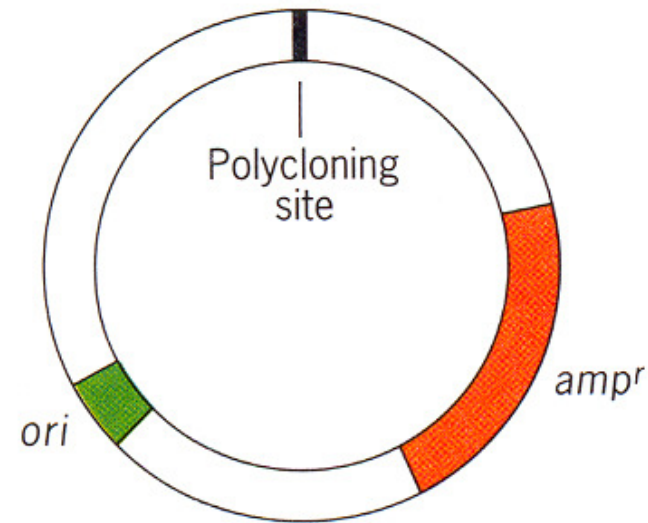
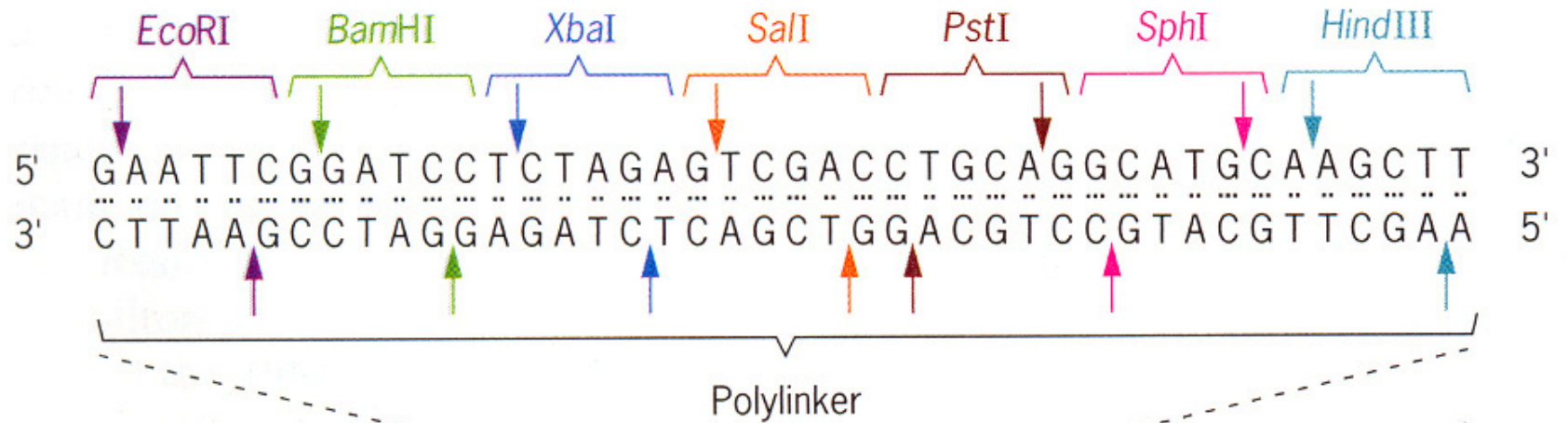
Vecto nhân dòng và Vecto biểu hiện



1. Kích thước càng nhỏ, kích thước đoạn xen càng lớn.
2. Trình tự nucleotit được biết đầy đủ.
3. Có trình tự khởi đầu sao chép phù hợp tế bào chủ.
4. Nhận biết nhờ các gen chỉ thị hoặc gen đánh dấu.
5. Có vị trí gắn phân tử ADN ngoại lai (vị trí đa tách dòng – polycloning site / MCS).



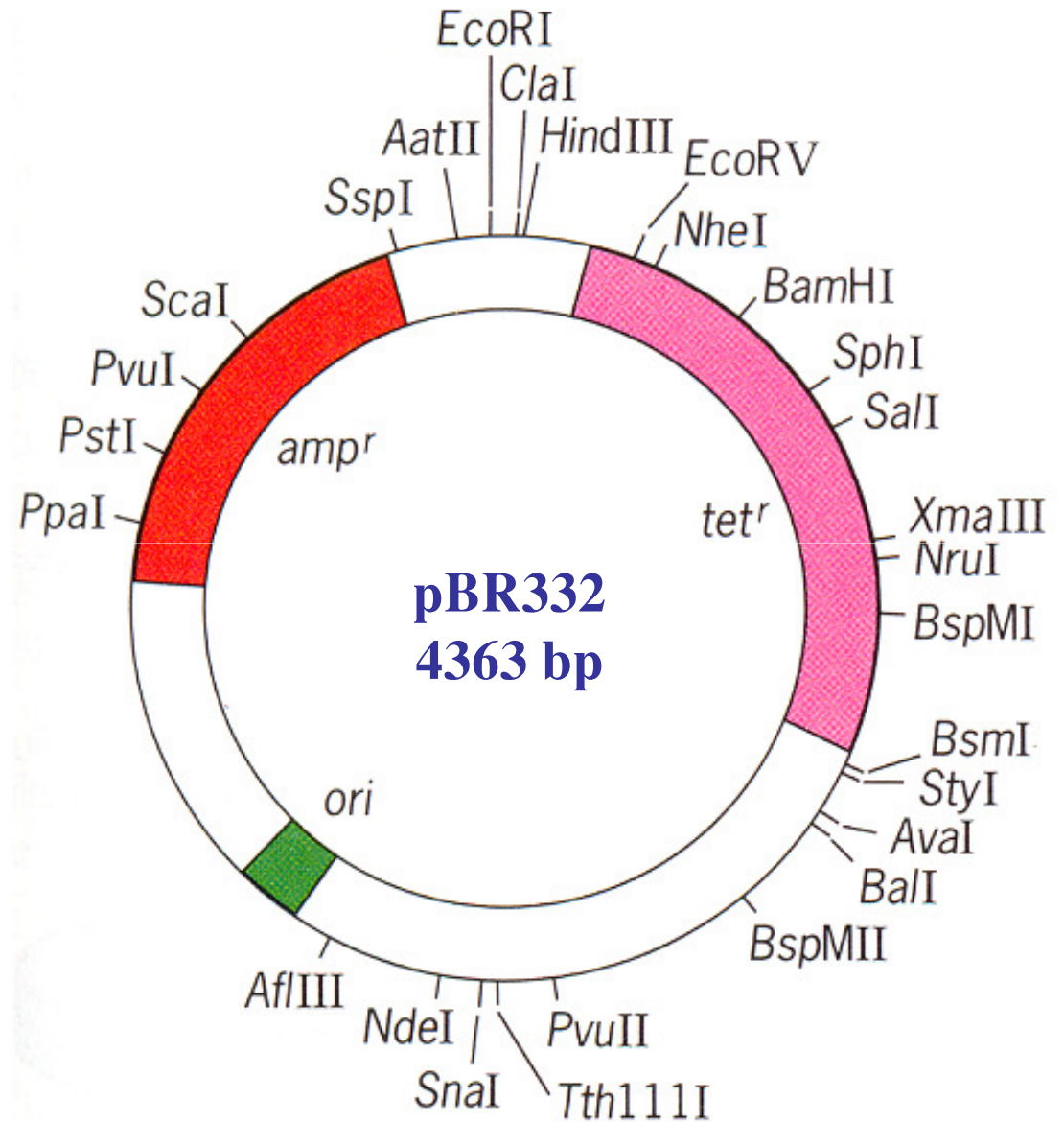
CÁC ĐẶC ĐIỂM CƠ BẢN CỦA VÉCTƠ TÁCH DÒNG





VÉCTƠ PLASMID

- Kích thước 1 – 200 kb, sợi kép, vòng.
- pBR332 do Bolivar và Rodriguez (1977) thiết kế cho phép mang đoạn ADN cài đến 6 kb.

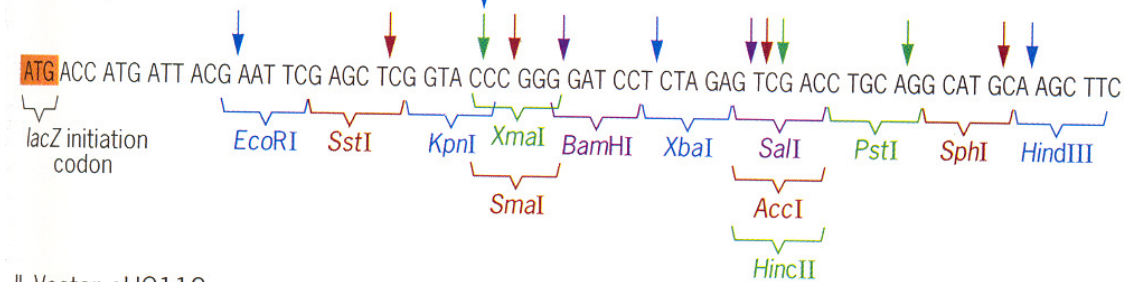




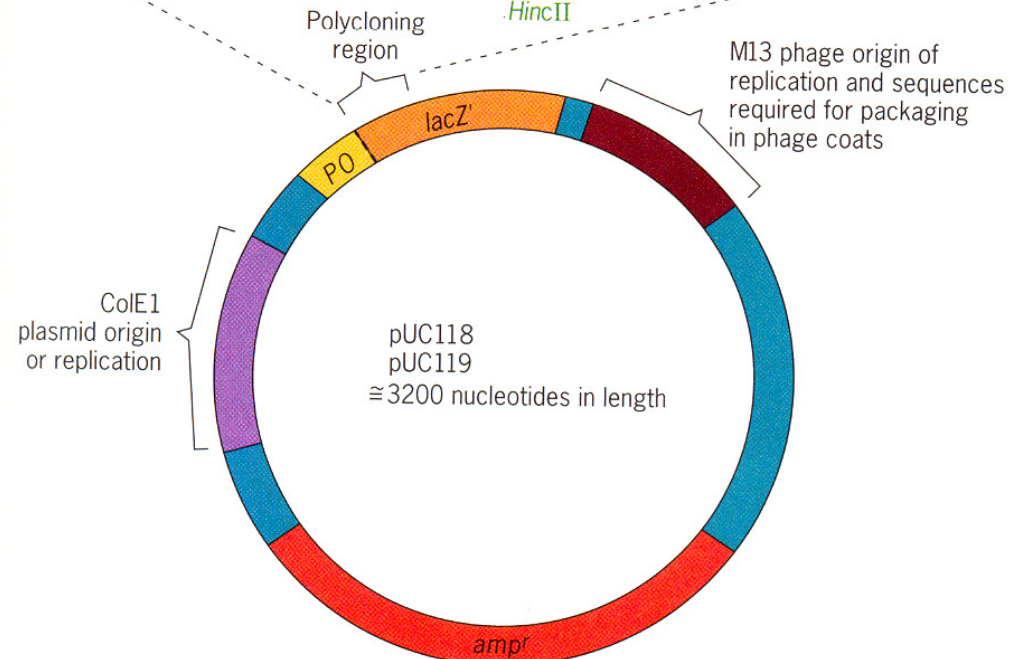
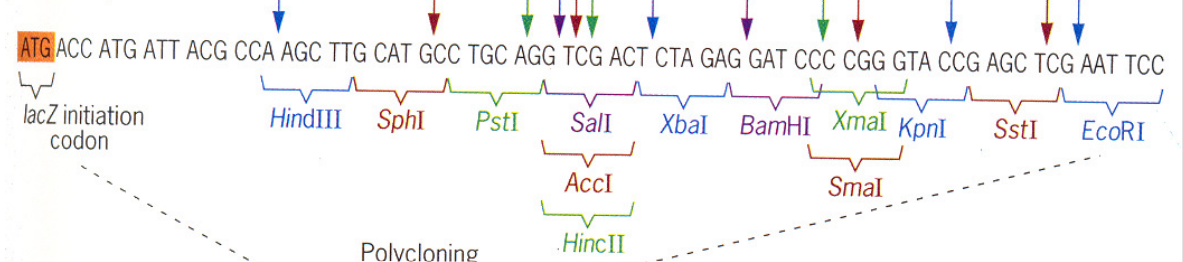
PLASMID

- Nhóm pUC là nhóm vectơ plasmid thuộc thế hệ thứ 3.
- Chứa cả điểm khởi đầu sao chép của phage M13 cho phép tách dòng nhờ vectơ helper.
- Thường mang dấu chuẩn là Amp^r và *LacZ*.

I. Vector pUC118

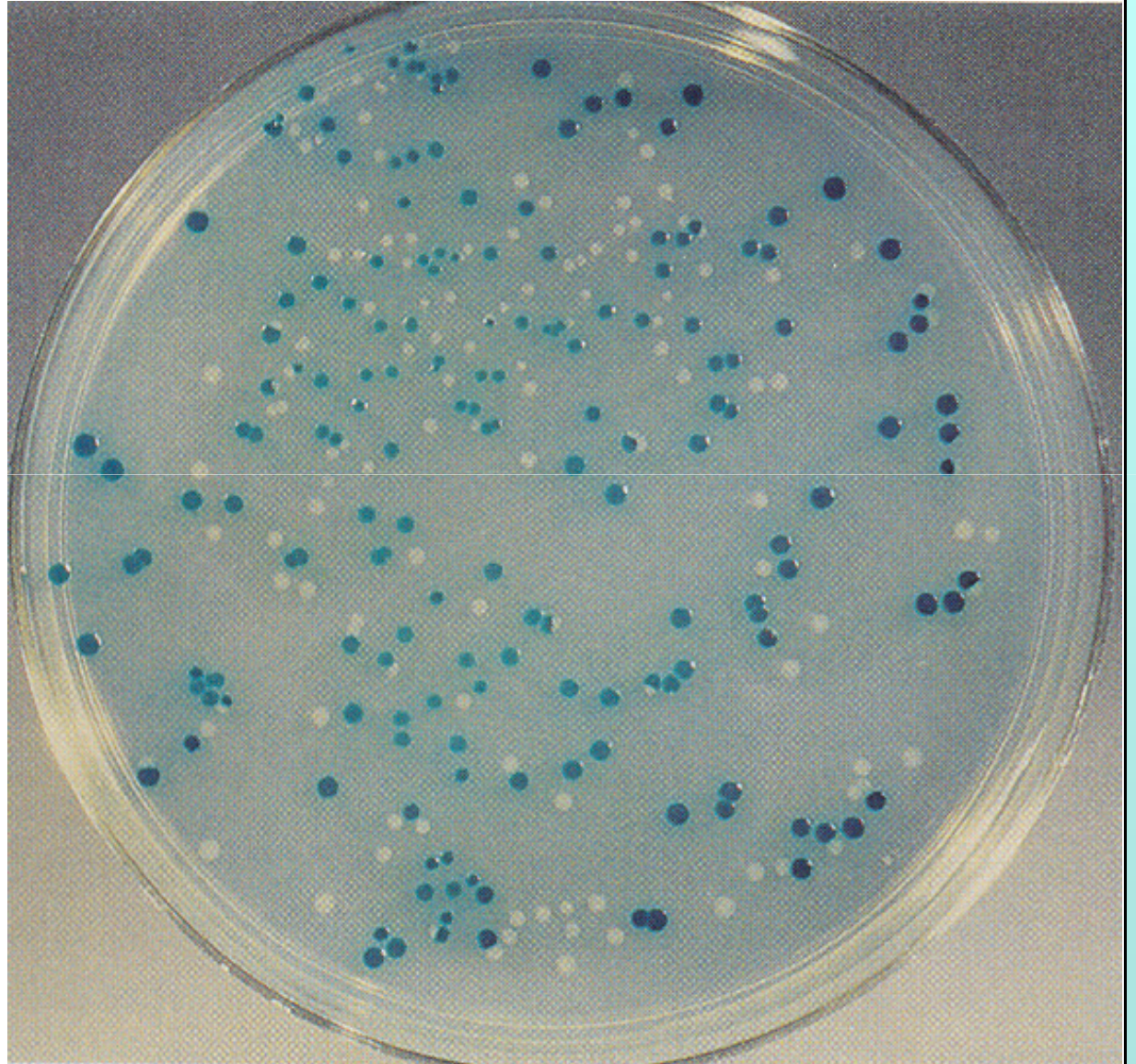


II. Vector pUC119





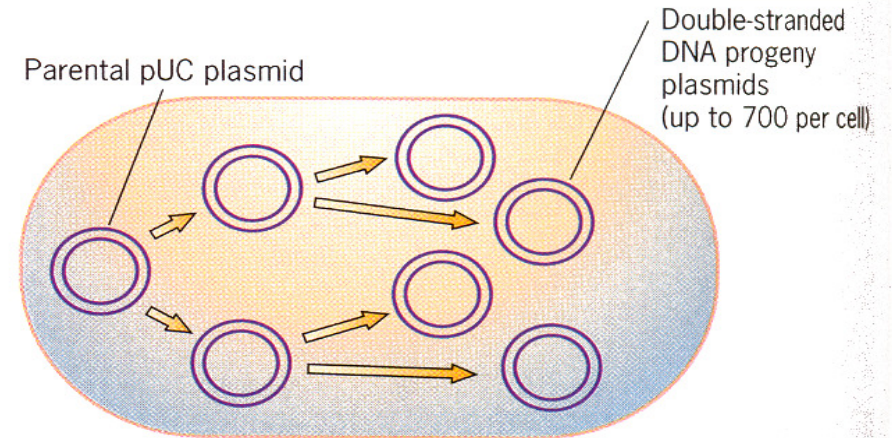
PLASMID pUC



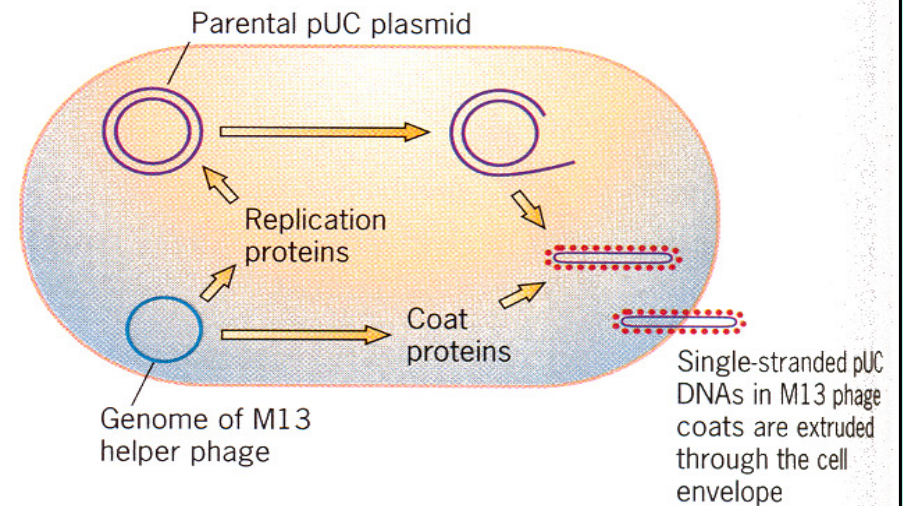


PLASMID pUC

- Các plasmid pUC sao chép theo kiểu θ khi không có véc tơ trợ giúp (helper).
- Khi có các véc tơ helper (vd. M13), các plasmid pUC sao chép theo kiểu vòng lăn, tạo mạch đơn và giải phóng ra ngoài nhờ protein vỏ virus.



(a) Replication of pUC118 and pUC119 as double-stranded plasmid DNAs in the absence of helper phage.

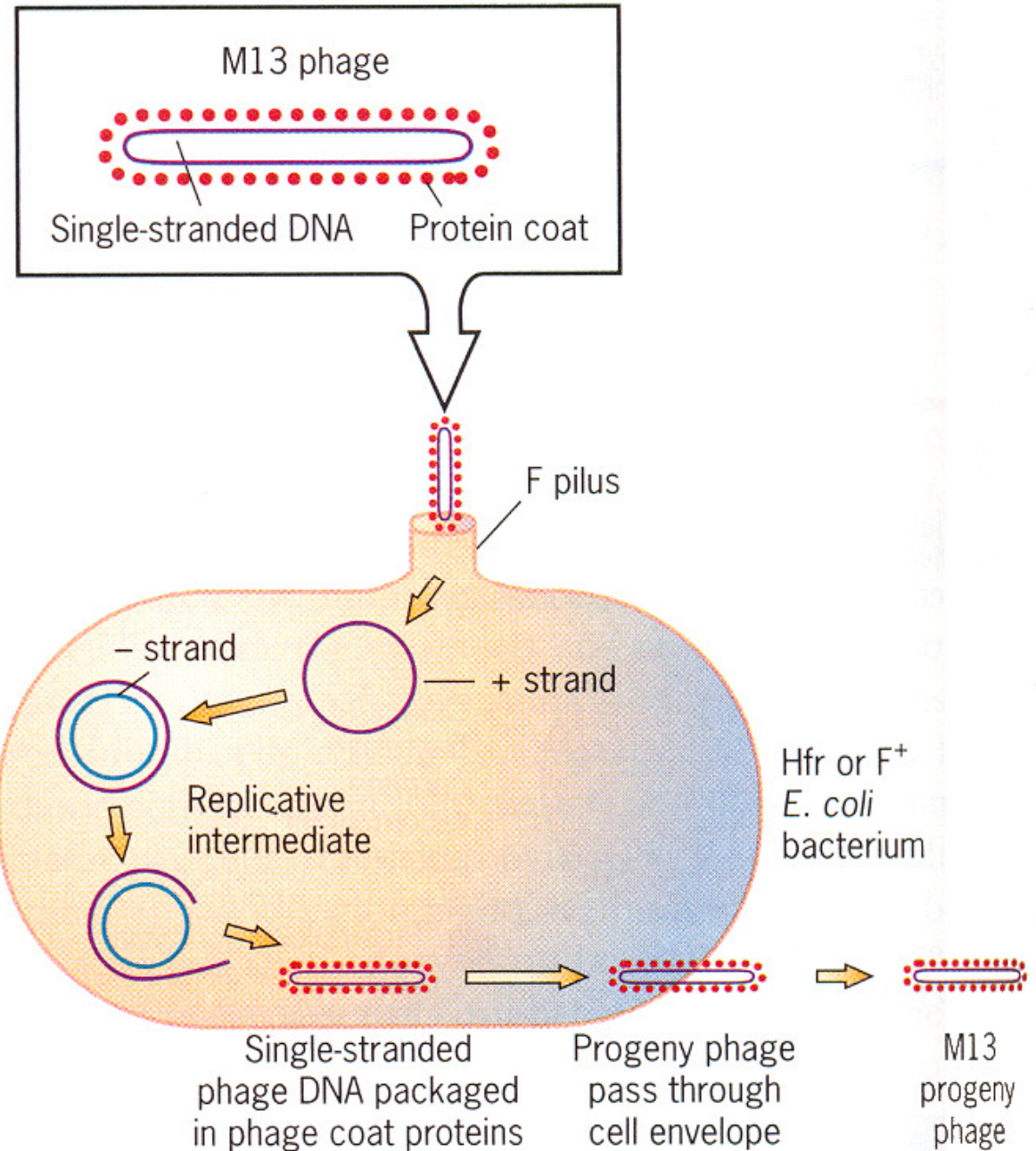


(b) Replication of pUC118 and pUC119 as single-stranded phage DNAs in the presence of helper phage.



PLASMID pM13

- **Bản chất là phân tử ADN mạch đơn.**
- **Không làm phân giải tế bào chủ khi giải phóng khỏi tế bào nên tách dòng thuận tiện**





VÉCTƠ PLASMID

ƯU ĐIỂM

- Cấu trúc đơn giản, kích thước nhỏ.
- Dễ tinh sạch, dễ phân tích đoạn tái tổ hợp.
- Có thể nhân lên với số lượng lớn, tốc độ nhanh.

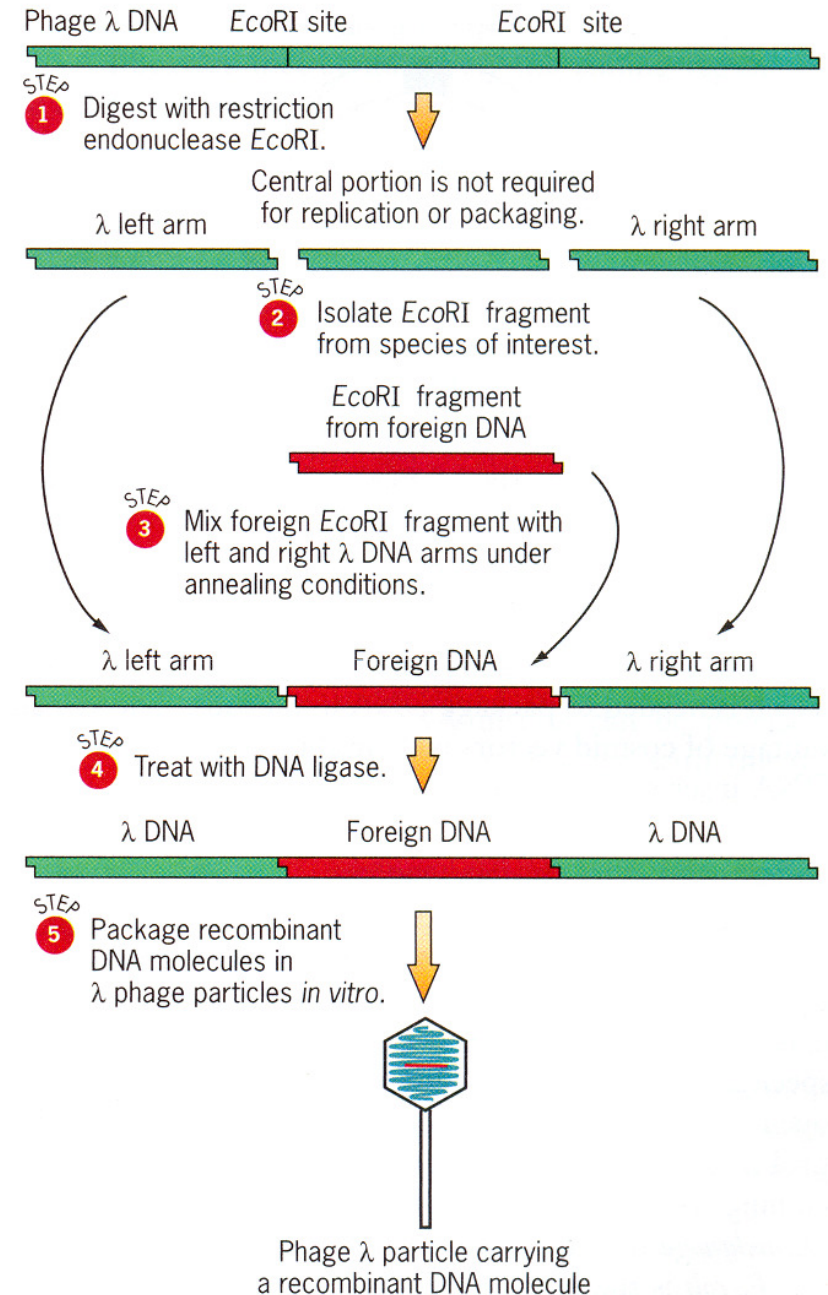
NHUỢC ĐIỂM

- Đôi khi, hiệu suất biến nạp vào tế bào chủ thấp.
- Không hiệu quả khi biến nạp ở eukaryote.
- Không tách dòng được các phân đoạn ADN kích thước lớn (> 10 kb).



VÉCTƠ PHAGE

- Phần lớn xuất phát từ phage λ .
- Kích thước khoảng 48,5 kb.
- Có thể mang các đoạn ADN cài đến ~20 kb. (virus có thể đóng gói ADN đến 40-50 kb)
- Khả năng xâm nhập tế bào chủ nhanh. Có thể tách dòng ở cả prokaryote và eukaryote.





VÉCTOR PHAGE

ƯU ĐIỂM

- **Khả năng xâm nhập tế bào chủ nhanh. Có thể tách dòng ở cả prokaryote và eukaryote**
- **Có thể mang các đoạn cài đến ~ 20 kb.**
- **Dễ bảo quản do các hạt virut bền ở t° lạnh (vd. 4°C).**

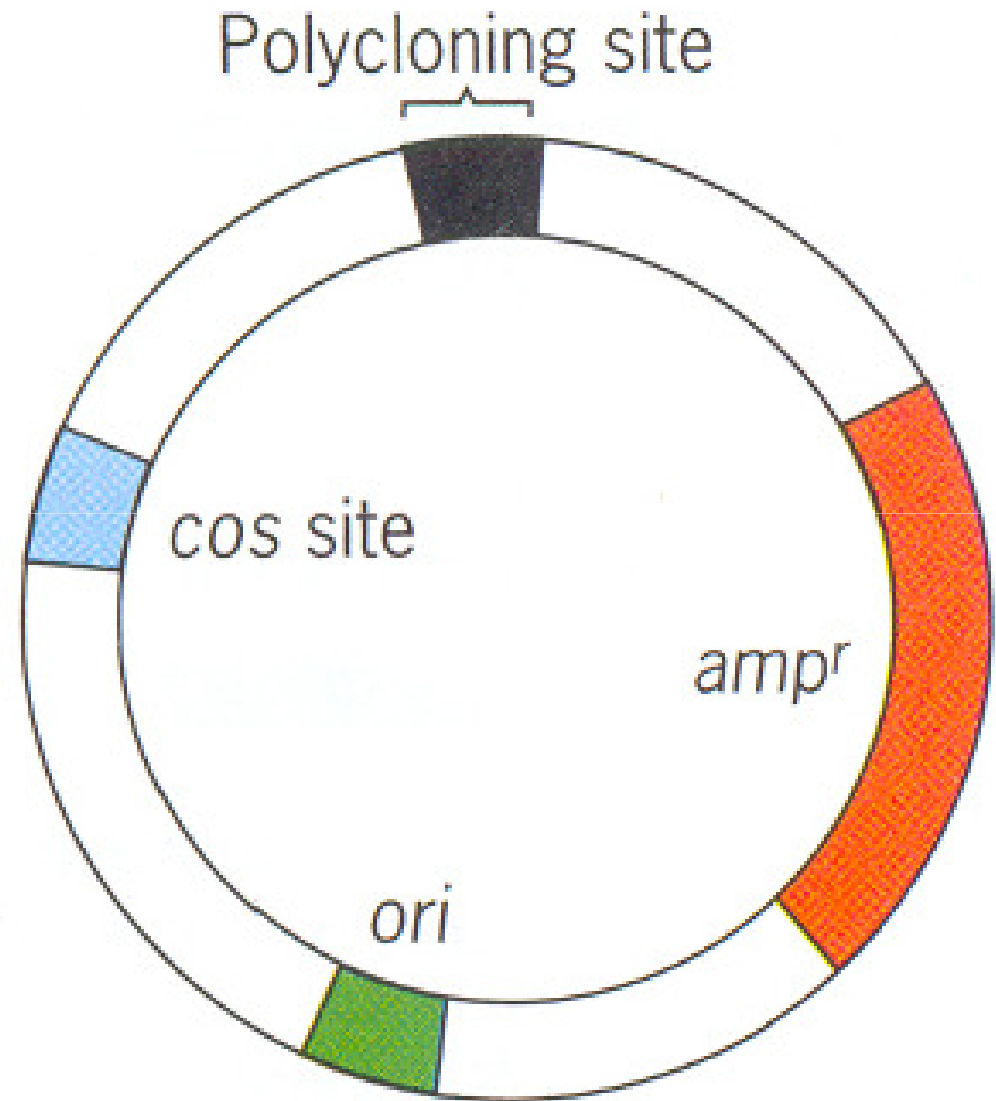
NHUỢC ĐIỂM

- **Kích thước lớn hơn plasmid, nên phân tích phức tạp hơn.**
- **Số bản sao phage hình thành trong mỗi tế bào thấp hơn số bản sao của plasmid.**



VÉCTOR COSMID

- Là véc tơ lai của plasmid và phage λ , mang các ưu điểm của hai véc tơ này: (1) khả năng tự tái bản số lượng lớn của plasmid, (2) có khả năng đóng gói in-vitro như phage
- Có khả năng mang các đoạn ADN cài có kích thước đến 35 – 45 kb.

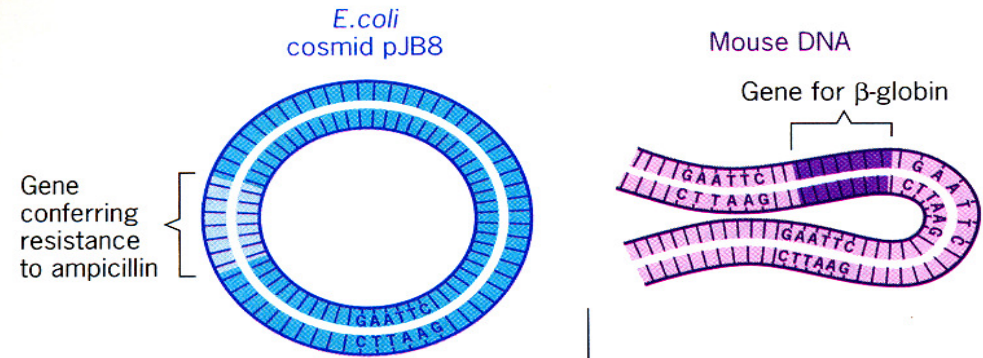




VÉCTÓR COSMID

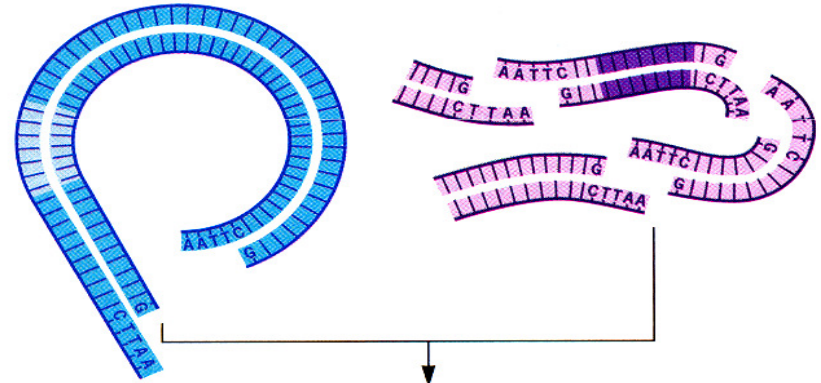
STEP

1 Isolate *E. coli* cosmid pJB8 DNA and mouse genomic DNA.



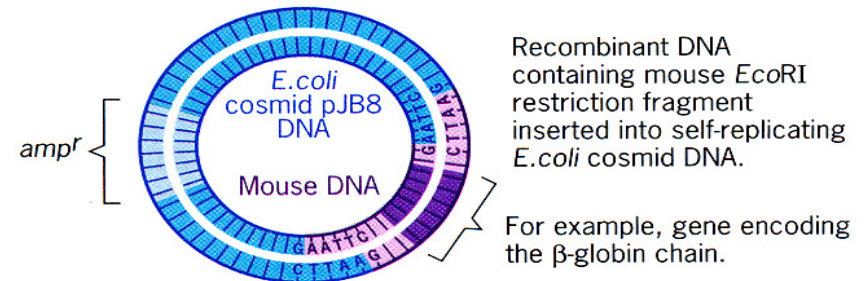
STEP

2 Cleave cosmid and mouse DNAs with restriction endonuclease *EcoRI*.



STEP

3 Mix cosmid and mouse DNAs under annealing conditions and treat with DNA ligase.



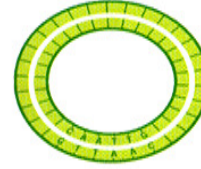


VÉCTÓR COSMID

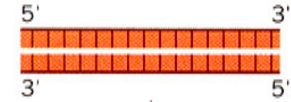
STEP

1 Isolate cosmid vector DNA and foreign DNA fragment of interest.

Cosmid cloning vector

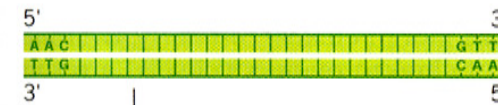


Foreign DNA to be cloned



STEP

2 Cleave cosmid DNA with restriction endonuclease *Hpa*I.



STEP

3 Treat both DNAs with lambda exonuclease



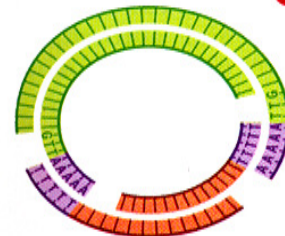
STEP

4 Incubate cosmid DNA with terminal transferase plus ATP and the foreign DNA with terminal transferase plus TTP.



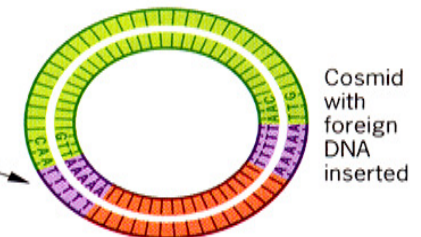
STEP

5 Mix the DNAs under annealing conditions.



STEP
6-8

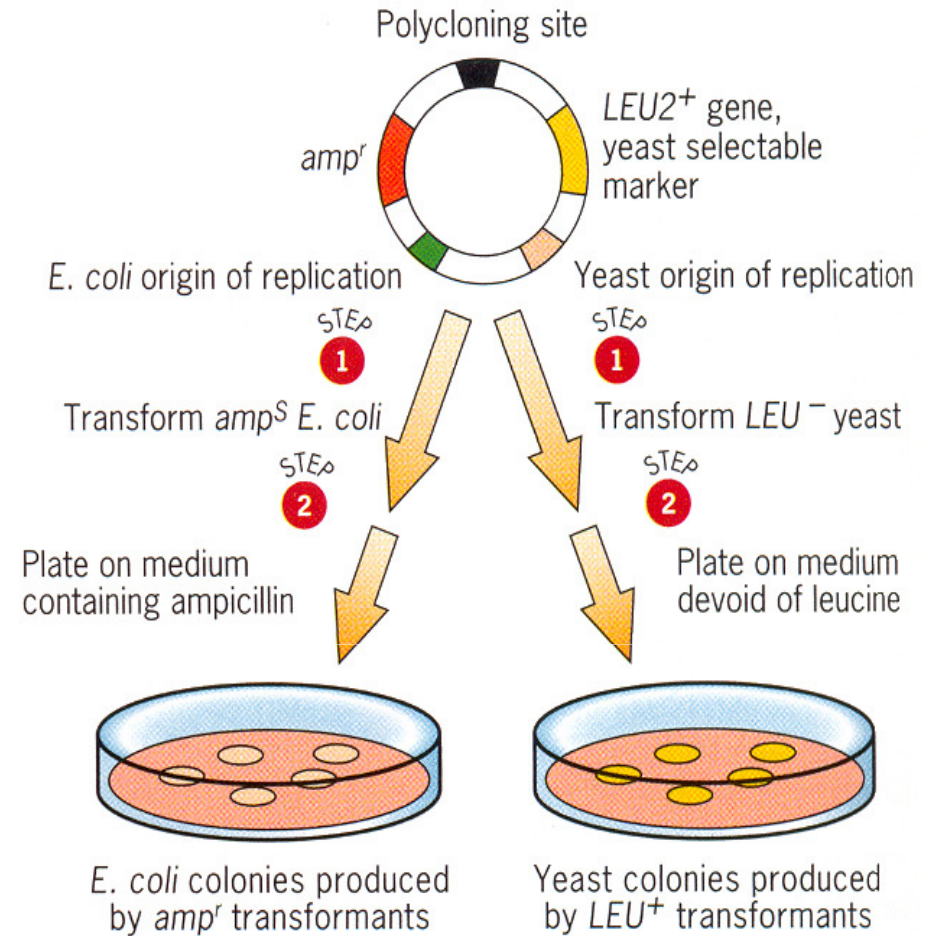
Treat the DNA sequentially with exonuclease III to cut back overhangs, DNA polymerase I to fill in gaps, and DNA ligase to seal nicks.





VÉCTƠ CON THOI

- Các véc tơ plasmid, phage và cosmid cần các trình tự khởi đầu sao chép khác nhau tùy theo từng loại tế bào chủ (trừ *E. coli*)
- Các véc tơ con thoi có thể sao chép trong cả *E. coli* cũng như những tế bào khác, chẳng hạn ở eukaryote
- Các véc tơ con thoi đặc biệt có hiệu quả khi nghiên cứu đặc tính các gen đồng thời ở prokaryote (vd. *E. coli*) và eukaryote (vd. *Saccharomyces cerevisiae*)





NHIỄM SẮC THỂ NHÂN TẠO NẤM MEN (YAC)

- Để có thể tách dòng các phân đoạn gen kích thước lớn ở sinh vật nhân chuẩn có kích thước > 35-45 kb (vd. gen dystrophin ở người có kích thước đến 2000kb), các nhà nghiên cứu đã phát triển được vectơ **nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men** có thể mang các đoạn cài ADN dài từ 200 đến 500 kb. Vectơ này được tạo ra từ nhiễm sắc thể nhỏ của nấm men được cải tiến di truyền.

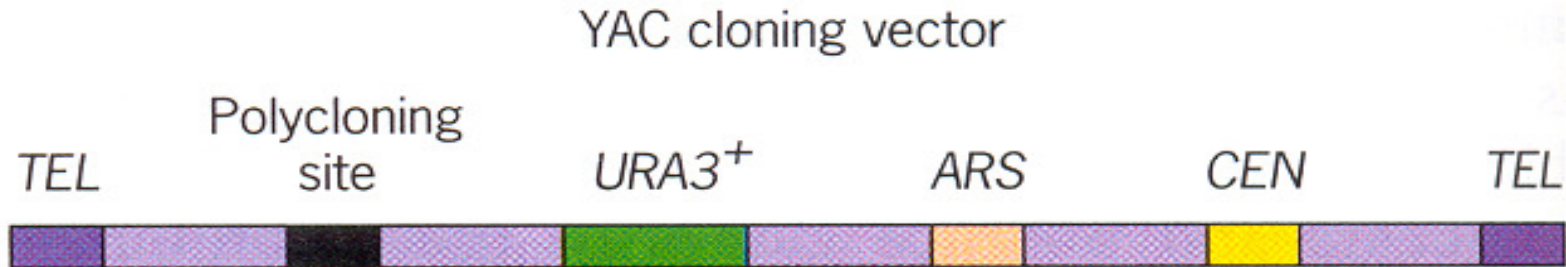


Figure 20.8 Structure of a YAC cloning vector. The components are: (1) *ARS*, autonomously replicating sequence (a yeast origin of replication), (2) *CEN*, a yeast centromere, (3) *TEL*, a yeast telomere, (4) $URA3^+$, a wild-type gene required for the biosynthesis of uracil, and (5) the polycloning site.

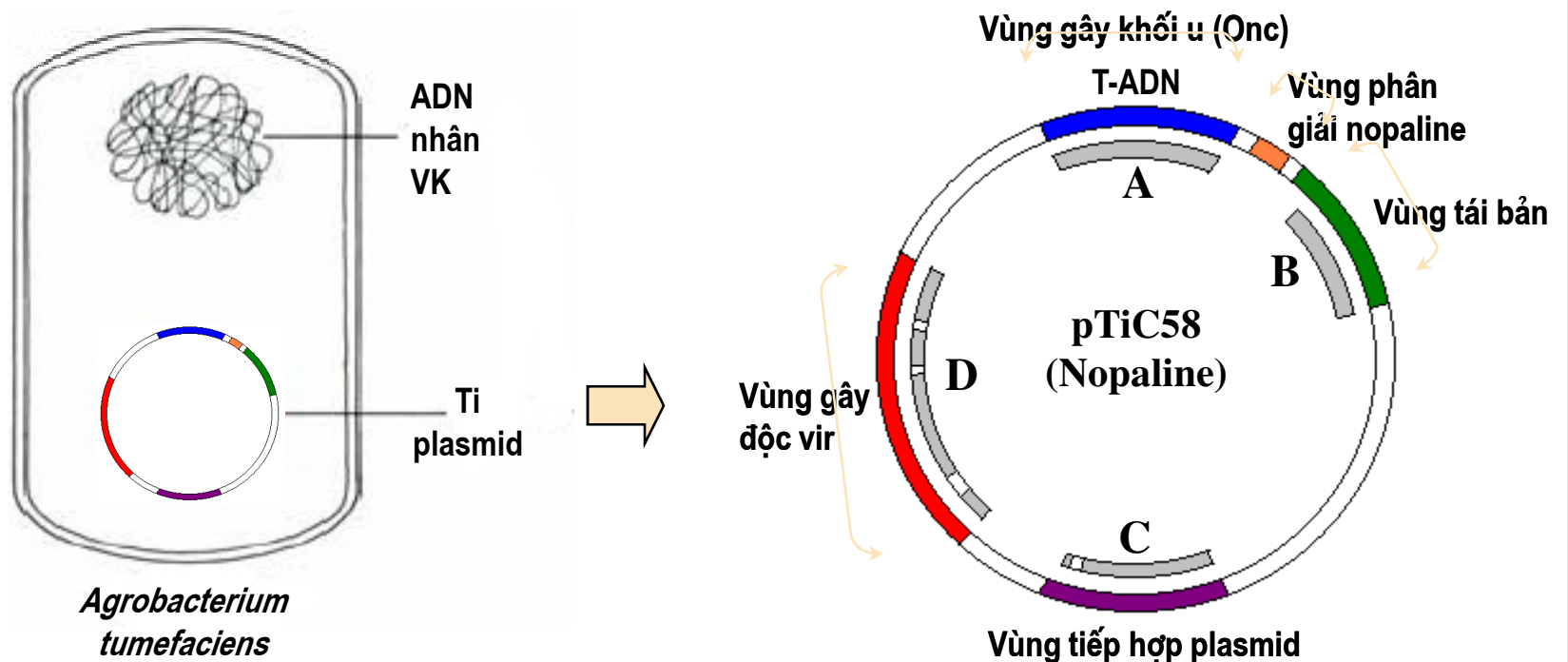


NHIỄM SẮC THỂ NHÂN TẠO VI KHUẨN (BAC)

- Về cơ bản giống với **nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men** nhưng được tạo ra từ nhân tố giới tính F. Giống với YAC, BAC có thể mang các đoạn cài lớn, nhưng ngoài ra có khả năng sao chép trong *E. coli* giống như các vectơ plasmid, λ , cosmid.



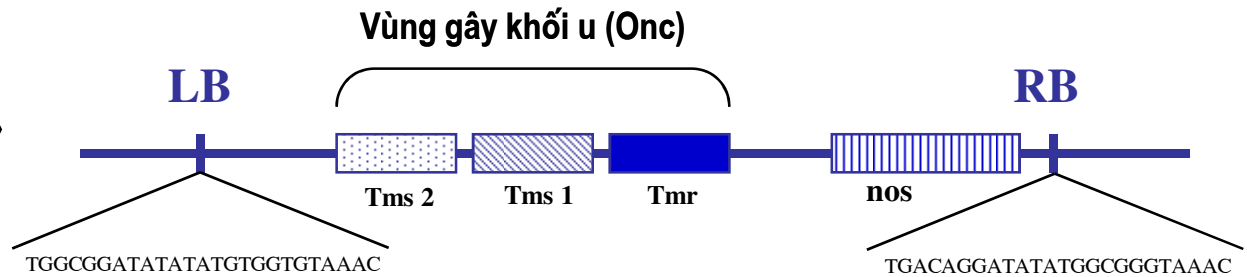
VÉCTƠ TÁCH DÒNG TI PLASMID



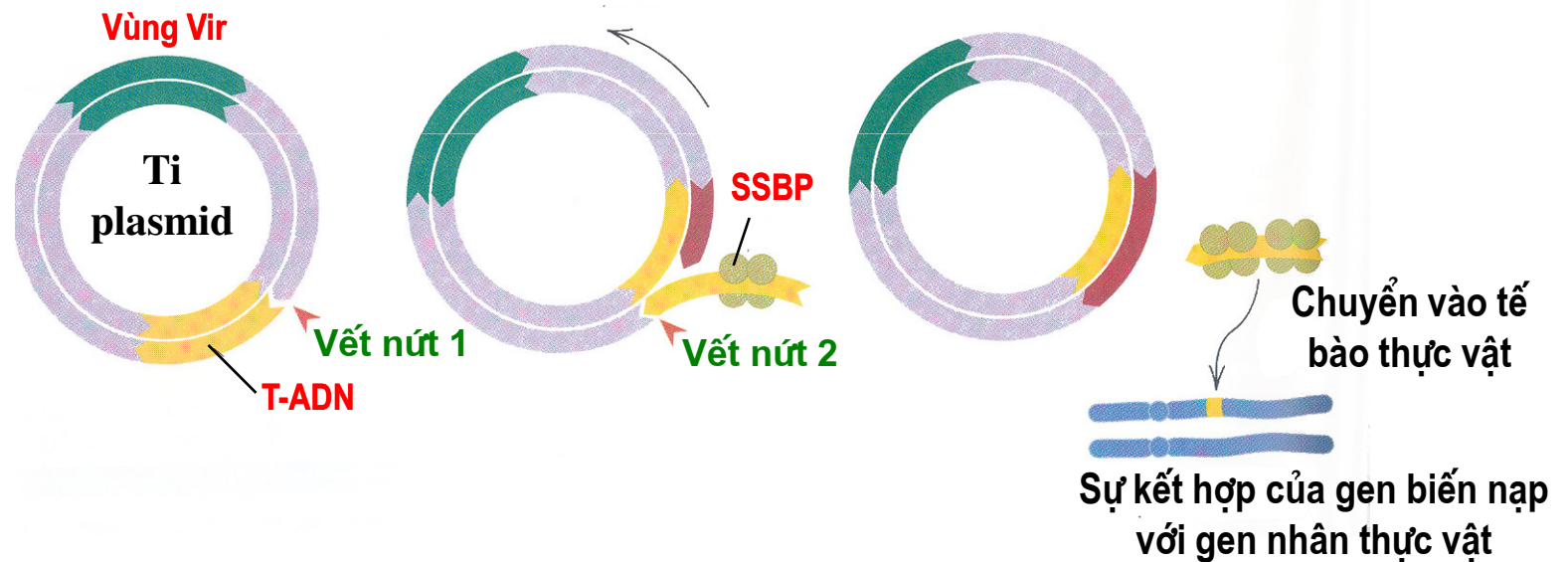


VÉCTƠ TÁCH DÒNG TI PLASMID

Cấu trúc
T-ADN



Quá trình chuyển T-ADN vào tế bào thực vật



- Ngoài ra, còn có các vectơ phagemid, các vectơ virus tách dòng và biểu hiện gen ở động vật, thực vật, ...



NỘI DUNG

- 🌐 KHÁI NIỆM CHUNG
- 🌐 ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?
- 🌐 TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC
- 🌐 TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP
- 🌐 **CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP**
- 🌐 NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN
- 🌐 SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN



CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP

Có thể chia các enzym trong **công nghệ ADN tái tổ hợp** thành 5 nhóm cơ bản

- 1. Các enzym làm đứt gãy liên kết phosphodiester.** Ví dụ: các enzym endonuclease (enzym giới hạn, DNase I, Mungbean nuclease, RNase H, RNase T1, RNase U2, ...), các exonuclease (exonuclease III, exonuclease VII, ...), các enzym vừa có chức năng endonuclease và exonuclease (nuclease Bal 31, *N. crassa* nuclease, nuclease S1, ...).
- 2. Các enzym nối khung phân tử ADN (nối các đoạn ADN).** Ví dụ: *E. coli* ligase, T4 DNA ligase, T4 RNA ligase, ...
- 3. Các enzym bổ sung hoặc loại nhóm phosphate ở đầu tận cùng của axit nucleic.** Ví dụ: T4 polynucleotide kinase, alkaline phosphatase, tobacco acid pyrophosphatase, ...



CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP

5 nhóm enzym cơ bản trong công nghệ ADN tái tổ hợp

- 4. Các enzym tổng hợp các mối liên kết phosphodiester mới trong phân tử axit nucleic. Ví dụ: các enzym ADN polymerase (T4 DNA polymerase, T7 DNA polymerase, Taq DNA polymerase, ...), RNA polymerase, Reverse transcriptase, Poly(A) polymerase, Terminal deoxynucleotidyl transferase, polynucleotide phosphorylase, ...**
- 5. Các enzym tham gia bảo vệ, đóng gói, xoắn và giãn xoắn phân tử ADN. Ví dụ: DNA methylase, các protein liên kết ADN (RecA, SSB, DnaB ...), topoisomerase I & II, ...**



ENZYM GIỚI HẠN (RESTRICTION ENDONUCLEASE)

➤ Các enzym giới hạn có hai đặc tính:

1. Không cắt các liên kết phosphodiester ở đầu tận cùng, thay vào đó là cắt bên trong phân tử ADN.
2. Chỉ cắt khi nhận ra các trình tự đặc thù, thường gồm 4 – 8 nucleotit.

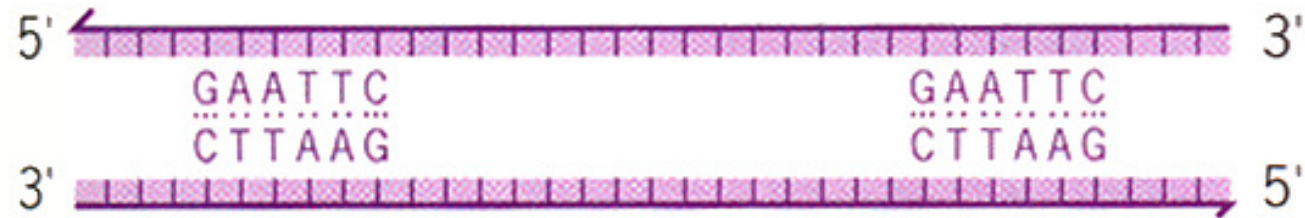
➤ Có 3 nhóm chính:

Nhóm	Hoạt động	Cofactor	Cơ chất
I	Enzym đa chức năng nucleaza / methylaza, đa tiểu phân, ≈ 400.000 dalton	ATP Mg^{2+} SAM	Cắt ngẫu nhiên trên phân tử ADN sợi kép cách trình tự giới hạn $\approx 4000 - 7000$ bp
II	Endonucleaza / methylaza	Mg^{2+}	Cắt phân tử ADN sợi kép thành 2 phần ở vị trí giới hạn
III	Enzym đa chức năng nucleaza / methylaza, đa tiểu phân, ≈ 250.000 dalton	ATP ^a Mg^{2+} ^b SAM	Có trình tự nhận biết đặc hiệu gồm 5 hoặc 6 bp, nhưng cắt cách trình tự này $\approx 10 - 27$ bp về phía đầu 3'



ENZYM GIỚI HẠN (RESTRICTION ENDONUCLEASE)

- Enzym giới hạn loại II được sử dụng chủ yếu vì nó cắt tại vị trí giới hạn. Thường cắt ở trình tự đọc theo chiều xuôi – ngược như nhau. Ví dụ: *Eco* RI.



*Eco*RI



- Phải chọn enzym giới hạn cắt ở hai đầu gen nhưng không cắt bên trong gen.



ENZYM GIỚI HẠN (RESTRICTION ENDONUCLEASE)

- Một số enzym giới hạn cắt trên mạch đơn.

Tên enzym	Trình tự nhận biết
Dde I	C TNAG
Hae III	GG CC
Hga I	GACGC (N) ₅
Hha I	GCG C
Hinf I	G ANTC
Hin PI	G CGC
Mnl I	CCTC (N) ₇
Rsa I	GT AC
Taq I	T CGA



CÁC ENZYM LÀM ĐỨT GÃY LIÊN KẾT PHOSPHODIESTE

ENDONUCLEASE

- **DNase I.** Tách từ tuyến tụy bò, phân hủy mỗi liên kết phosphodieste bên trong **phân tử ADN mạch đơn** tạo thành các đoạn oligonucleotit có đầu 5'-P và 3'-OH tự do.
Ứng dụng: tạo ra các phân đoạn ADN hoặc véc tơ đầu tù, ...
- **Mungbean nuclease.** Tách từ cây đậu đỗ, phân hủy mỗi liên kết phosphodieste bên trong **cả phân tử ADN và ARN**. Với ADN mạch đơn, có xu hướng cắt sau A và T, tạo thành các đoạn oligonucleotit có đầu 5'-P và 3'-OH tự do.
Ứng dụng: “cắt gọt” các plasmid, gắn phân tử ADN vào đúng khung đọc, theo đúng chiều mong muốn, ...



CÁC ENZYM LÀM ĐỨT GÃY LIÊN KẾT PHOSPHODIESTE

ENDONUCLEASE

- **RNaseH.** Phân hủy ARN khi có cấu trúc lai ADN/ARN tạo thành các đoạn oligonucleotit có đầu 5'-P. Có cả ở virus, vi khuẩn đến động vật có vú. ở vi khuẩn và eukaryote, có hoạt tính endonuclease, còn ở virus có hoạt tính exonuclease từ cả hai đầu 3' và 5'.

Ứng dụng: (1) cắt một trình tự đặc hiệu bằng cách tạo ra đoạn lai ARN/ADN, (2) loại đi đầu poly(A) của phân tử mARN trong điện di để làm giảm hiện tượng nhiễu khi phân tích ARN, (3) loại bỏ phân tử mARN khi tổng hợp cADN.



CÁC ENZYM LÀM ĐỨT GÃY LIÊN KẾT PHOSPHODIESTE

EXONUCLEASE

- **Exonuclease VII (Exo VII)**. Tách từ *E. coli*. Chỉ cắt **phân tử ADN khi ở trạng thái mạch đơn** từ cả hai đầu 3' và 5'. Không cắt thành từng nucleotit riêng biệt, mà thành từng đoạn 2 – 100 nucleotit.

Ứng dụng: Cắt bỏ đầu thừa trên phân tử ADN sợi kép. Phối hợp với nuclease S1 để xác định kích thước và lập bản đồ các trình tự intron.

EXONUCLEASE và ENDONUCLEASE

- **Nuclease S1**. Tách từ *Aspergillus oryzae*. Cắt cả ARN và ADN **khi ở trạng thái mạch đơn**. Cắt cả bên trong (endo) lẫn bên ngoài (exo). Không cắt ở trạng thái kép ADN/ARN
- Ứng dụng:** (1) Cắt bỏ cấu trúc kẹp tóc khi tổng hợp cADN (2) Tạo các phân tử lai ADN/ARN không đầu thừa để xác định chiều dài và trình tự mã hóa, (3) xác định intron, ...





CÁC ENZYM NỐI KHUNG ADN VÀ ARN

- ***E. coli* DNA ligase.** Xúc tác hình thành liên kết phosphodiester giữa hai phân đoạn ADN nằm kề, một có 5'-P, một có 3'-OH. Cần có trình tự đối diện ở vị trí “nick translation”.
Ứng dụng: Nối các đoạn polynucleotit tổng hợp gián đoạn.
- **T4 DNA ligase.** Mã hóa bởi hệ gen phage T4. Nối các đoạn ADN sợi kép với nhau, không nối được giữa các đoạn ADN mạch đơn và giữa ADN và ARN. Hoạt tính nối mạnh hơn *E. coli* DNA ligase, vì không cần trình tự đối diện ở vị trí “nick”.
Ứng dụng: Nối các đoạn ADN sợi kép đầu dính hoặc tù.
- **T4 ARN ligase.** Có khả năng nối giữa ADN-ADN, ADN-ARN và ARN-ARN. Có thể gắn mạch đơn hoặc sợi kép.
Ứng dụng: Dùng để nối dài các phân tử ADN hoặc ARN.
Gắn các trình tự nucleotit đánh dấu (v.d. GFP, ...)



CÁC ENZYM TỔNG HỢP LIÊN KẾT PHOSPHODIESTE

- **Reverse transcriptase.** Enzym này thực chất có ba hoạt tính: (1) Tổng hợp ADN sử dụng mạch ARN làm khuôn, (2) Tổng hợp ADN sử dụng mạch ADN làm khuôn, và (3) RNase H.
Ứng dụng: Tổng hợp và xây dựng thư viện cADN, đánh dấu đầu 3' của một phân tử ADN, giải mã trình tự mã hóa ...
- **Poly(A) polymerase.** Bổ sung các tiểu phần AMP vào đầu 3' của **phân tử ARN**.
Ứng dụng: (1) Đánh dấu đầu 3' của phân tử mARN, (2) Lắp ghép đầu poly(A) vào các phân tử mARN thiếu đầu này để sử dụng môi poly(T) tổng hợp cADN nhờ enzym reverse transcriptase.



CÁC ENZYM TỔNG HỢP LIÊN KẾT PHOSPHODIESTE

- **Terminal deoxyribonucleotidyl transferase.** Được tách đầu tiên từ tuyến ức của bê (Chang & Bollum, 1971). Xúc tác phản ứng gắn các dNTP vào phía đầu 3' của ADN mà không cần mạch khuôn. Gọi tắt là **Terminal transferase.**

Ứng dụng: (1) Đánh dấu đầu 3' của các phân tử ADN. (2) Tạo các đầu gắn mong muốn cho vectơ và các phân tử ADN ngoại lai bằng sử dụng các nucleotit bổ trợ (rất hữu hiệu trong việc tổng hợp và xây dựng thư viện cADN).



CÁC ENZYM BẢO VỆ PHẦN TỬ ADN

- **DNA methylase.** Các enzym thuộc nhóm này giống với enzym giới hạn ở chỗ xúc tác phản ứng methyl hóa tại một vị trí nhất định trong một trình tự đặc trưng. ví dụ *M. dam* methylaza → GATC, *M. EcoRI* → GAATTC, *M. HaeIII* → GGCC, *M. PstI* → CTGCAG, *M. TaqI* → TCGA, ...

Ứng dụng: (1) Bảo vệ các trình tự giới hạn bên trong trình tự mã hóa, (2) Thay đổi tính đặc hiệu của một số enzym giới hạn.

Ví dụ: Bình thường enzym giới hạn *ScrFI* cắt các trình tự CCNGG; sau khi xử lý *M. HpaII*, *ScrFI* chỉ nhận ra và cắt các trình tự CCAGG và CCTGG.

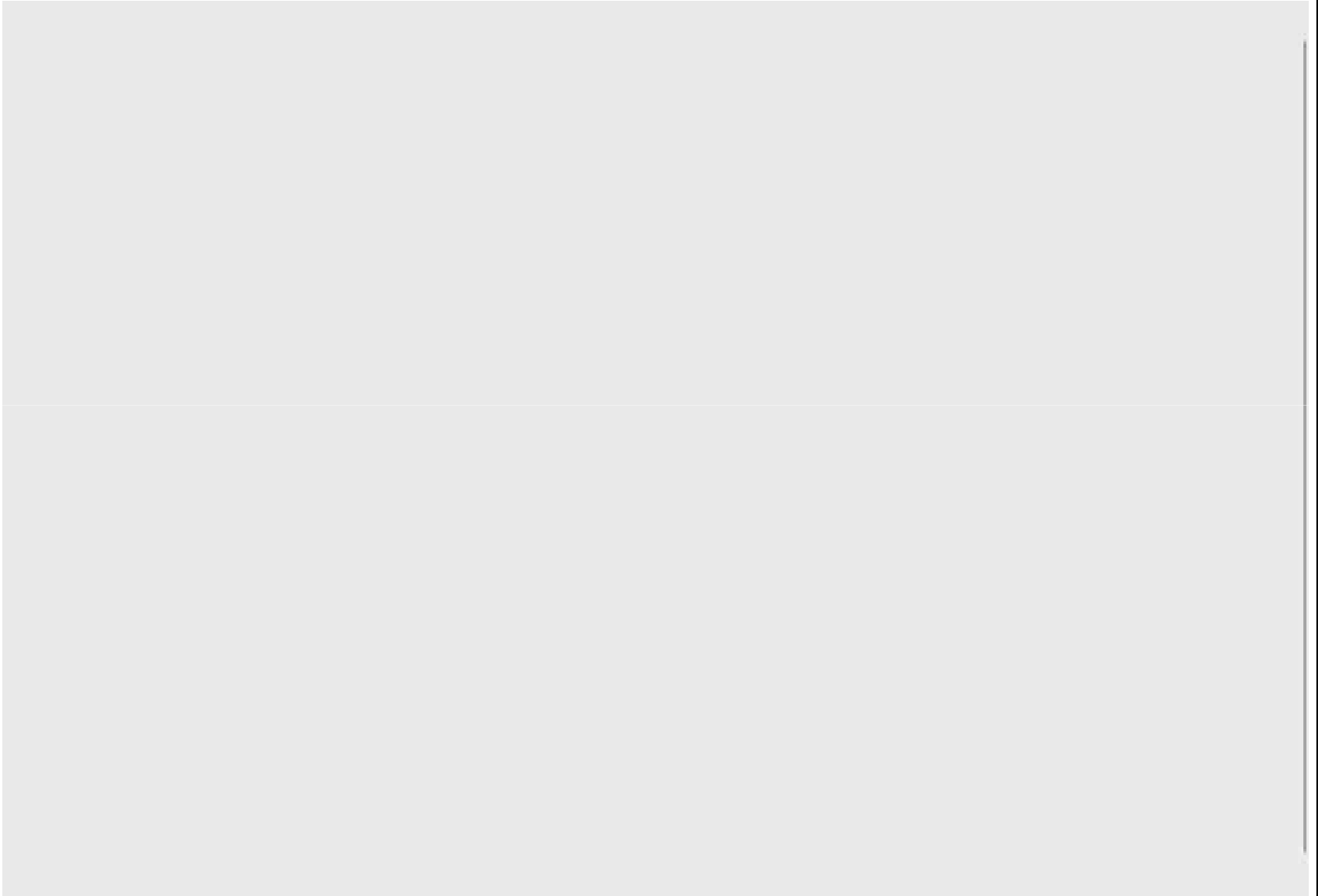


NỘI DUNG

- 🌐 **KHÁI NIỆM CHUNG**
- 🌐 **ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?**
- 🌐 **TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC**
- 🌐 **TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP**
- 🌐 **CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP**
- 🌐 ****NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN****
- 🌐 **SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN**



ADN ĐƯỢC NHẬN DÒNG NHƯ THỂ NÀO?





TÁCH DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG HỆ GEN

- **Nhân dòng gen** là quá trình phân lập một gen → véc tơ tách dòng → tế bào chủ để nhân lên thành nhiều bản sao.

Nhân dòng gen đã biết trình tự

1. **Phân lập gen:** Tách ADN tổng số → nhân gen (PCR) bằng sử dụng môi đặc hiệu → kiểm tra sản phẩm điện di trên gel agarose/polyacrylamide → cắt bằng enzym giới hạn thích hợp ở hai đầu (thường dùng chung với véc tơ).
2. **Chọn véc tơ tách dòng:** tùy kích thước đoạn gen và tế bào chủ mà có thể chọn các véc tơ plasmid, phage, cosmid, YAC...
3. **Tạo véc tơ tái tổ hợp và nhân dòng:** sử dụng DNA/RNA ligase (vd. T4 DNA ligase) gắn véc tơ với gen phân lập. Chuyển vào tế bào chủ để nhân lên.
4. **Chọn lọc các dòng tế bào mang véc tơ tái tổ hợp:** bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, hoặc sử dụng các gen chỉ thị / gen đánh dấu.



TÁCH DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG HỆ GEN

Nhân dòng gen chưa biết trình tự

- 1. Tách chiết mARN: Tách chiết ARN tổng số → tách mARN nhờ sử dụng cột oligo(dT) cellulose.**
- 2. Tạo các phân tử cADN, nhờ sử dụng enzym phiên mã ngược và kỹ thuật RT-PCR, tạo ra số lượng lớn các cADN.**
- 3. Các trình tự cADN được tách dòng vào các vectơ như trong trường hợp tách dòng gen đã biết trình tự để xây dựng thư viện (ngân hàng) cADN.**
- 4. Chọn lọc các dòng vectơ tái tổ hợp mang trình tự cADN được quan tâm nghiên cứu**



TÁCH DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG HỆ GEN

Có hai loại ngân hàng gen: **1) Ngân hàng hệ gen** và **2) Thư viện cADN**.

Ngân hàng ADN hệ gen

1. Có mặt đầy đủ tất cả các trình tự ADN hệ gen của tế bào.
2. Các đoạn ADN có trình tự nucleotit giống hệ gen của tế bào trong tự nhiên, gồm cả các trình tự điều hòa và các trình tự không mã hóa (các trình tự ADN đệm, trình tự liên gen và các intron)
3. Ở sinh vật nhân chuẩn, phần lớn là các trình tự ADN không mã hóa cho protein, gồm nhiều trình tự lặp lại, các trình tự liên gen, các trình tự điều hòa.
4. Số lượng các dòng tế bào mang các đoạn cài nhiều.

Thư viện cADN

1. Chỉ là tập hợp nhỏ một phần của hệ gen, gồm các gen được biểu hiện.
2. Các trình tự cADN phản ánh trình tự các sản phẩm mRNA được hoàn thiện sau quá trình phiên mã, không phải là trình tự thực sự và đầy đủ của gen tương ứng trên phân tử ADN hệ gen (không có các trình tự điều khiển, như promoter, operator, enhancer, v.v...).
3. Các protein được mã hóa bởi cADN có thể được tổng hợp (dịch mã) trong một tế bào chủ mà ở đó không cần có bộ máy hoàn thiện phân tử mRNA (bởi các intron đã được cắt bỏ).
4. Số lượng các dòng tế bào mang các đoạn cài nhiều.



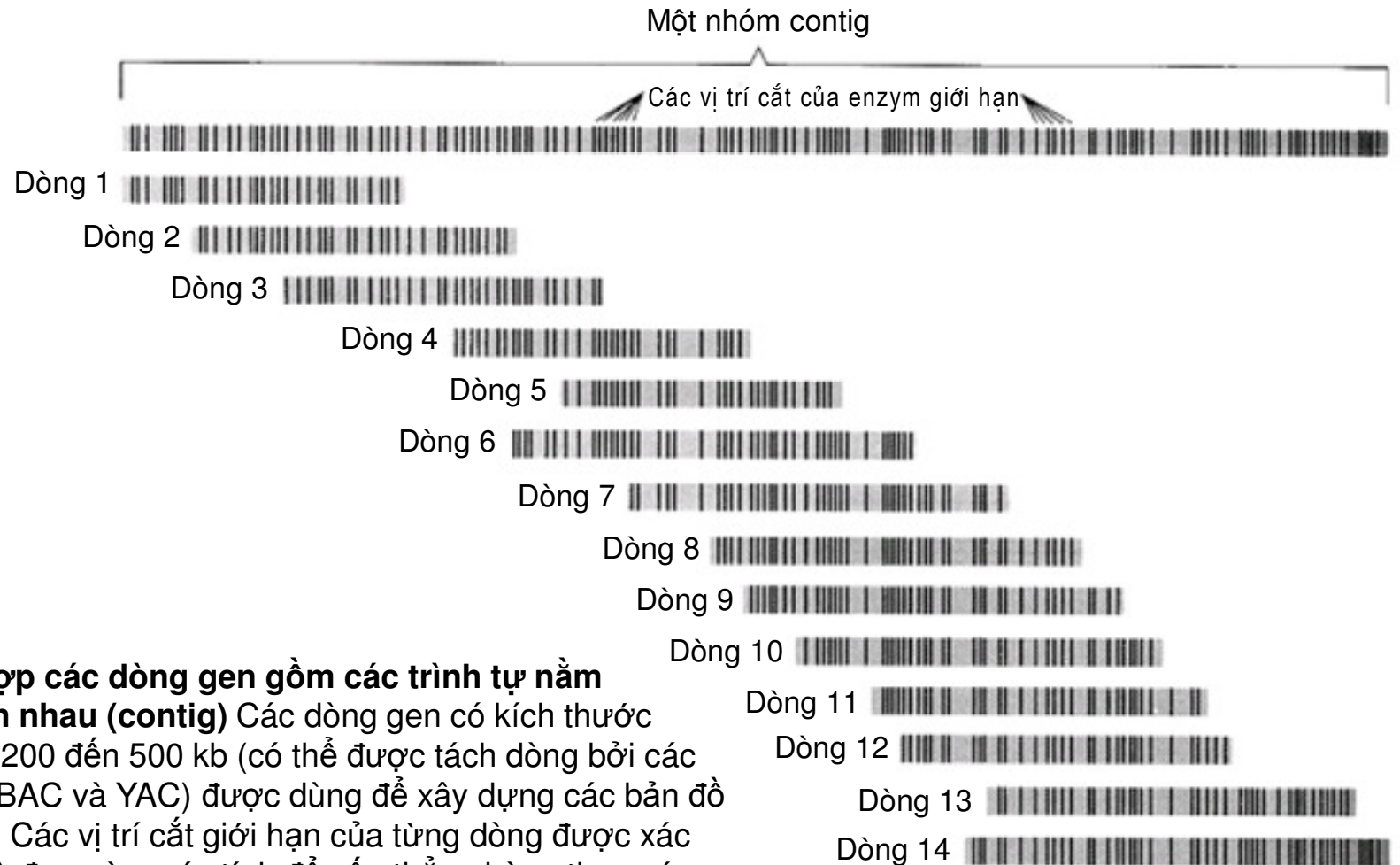


NỘI DUNG

- 🌐 KHÁI NIỆM CHUNG
- 🌐 ADN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC THỰC HIỆN NHƯ THẾ NÀO?
- 🌐 TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC AXIT NUCLEIC
- 🌐 TẠO VÉCTƠ TÁI TỔ HỢP
- 🌐 CÁC LOẠI ENZYM SỬ DỤNG TRONG ADN TÁI TỔ HỢP
- 🌐 NHẬN DÒNG GEN VÀ XÂY DỰNG NGÂN HÀNG GEN
- 🌐 SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN



SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN



Tập hợp các dòng gen gồm các trình tự nằm gộp lên nhau (contig) Các dòng gen có kích thước lớn từ 200 đến 500 kb (có thể được tách dòng bởi các vectơ BAC và YAC) được dùng để xây dựng các bản đồ contig. Các vị trí cắt giới hạn của từng dòng được xác định và đưa vào máy tính để xếp thẳng hàng theo các locut giữa các đoạn NST nằm gộp lên nhau. Khi bản đồ vật lý của hệ gen hoàn chỉnh, mỗi NST được biểu diễn bằng một bản đồ contig duy nhất.



SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN

- Có một số phương pháp để tìm dòng gen mong muốn trong ngân hàng hệ gen: (1) Thông qua sự biểu hiện sản phẩm của gen được tách dòng (vd: các enzym, protein có hoạt tính, ...), (2) Lai axit nucleic để tìm dòng tế bào mang trình tự mong muốn, (3) nhận biết sản phẩm gen nhờ phản ứng miễn dịch.
- **Phương pháp xác định dòng gen thông qua sự biểu hiện của gen** có thể áp dụng khi sản phẩm của gen ở trạng thái biểu hiện chức năng. Vd: các gen mã hóa enzym chuyển hóa hoặc tổng hợp một hợp chất dinh dưỡng nào đó có thể xác định được nhờ nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc.



SÀNG LỌC CÁC DÒNG GEN TRONG NGÂN HÀNG GEN

- Tuy vậy, **phương pháp lai axit nucleic** là phương pháp phổ biến nhất. Để phát hiện các trình tự ADN, người ta sử dụng các mẫu dò ADN và phương pháp thẩm tách Southern, FISH, ... Để phát hiện các trình tự mARN, người ta sử dụng mẫu dò và phương pháp thẩm tách Northern.

