

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHIỆP

KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC

PHƯƠNG PHÁP TẠO DÒNG

GVHD: TS. Trần Hoàng Dũng

Th.S. Trần Hồng Bảo Quyên

Nhóm 04 - ĐHSH5LT

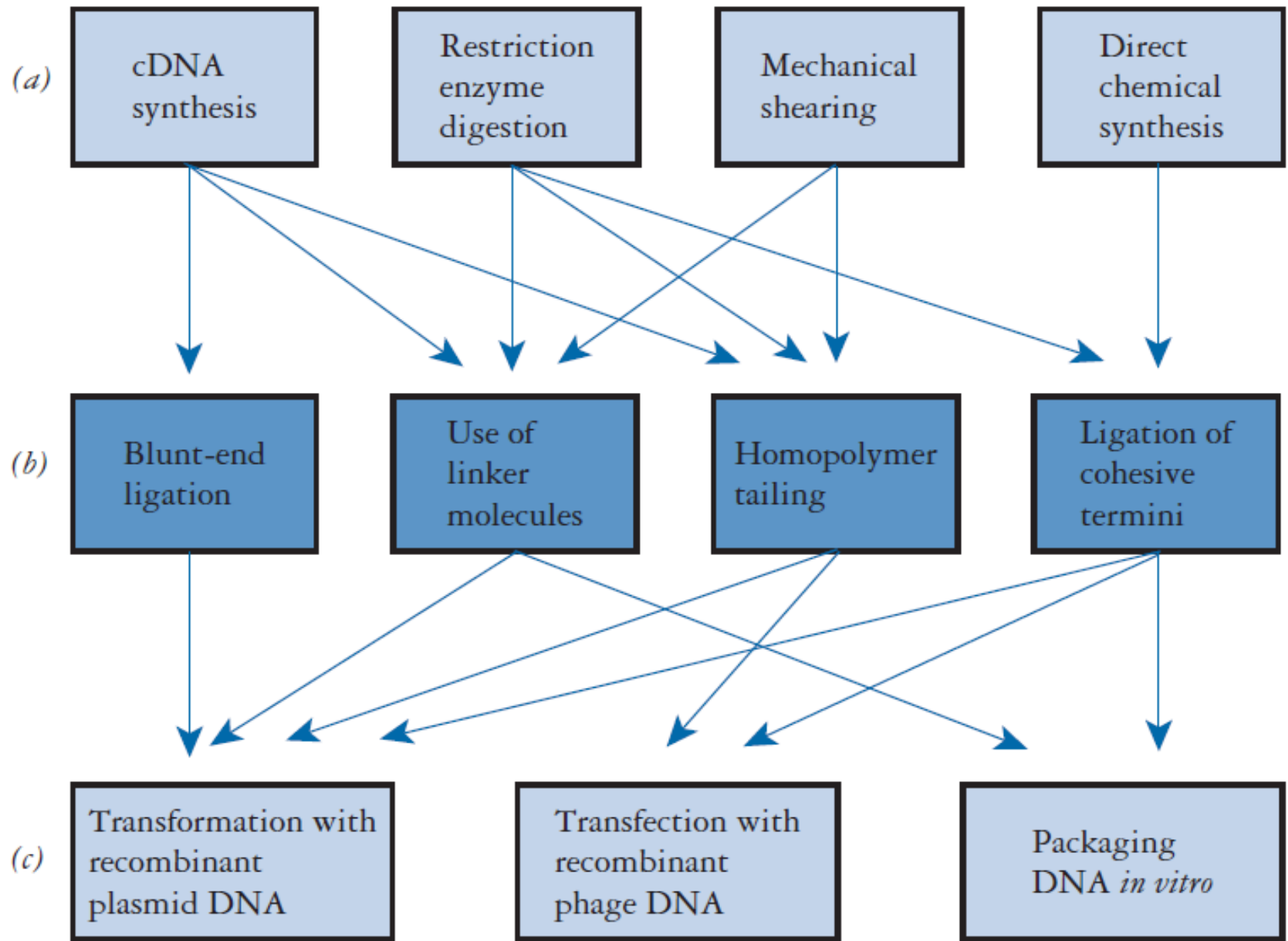
- Phạm Thị Diễm
- Tô Thị Mỹ Hạ
- Hoàng Thị Thanh Hạnh
- Phạm Thị Thúy Hằng
- Huỳnh Thị Phương
- Liên Thúy Kiều
- Nguyễn Thị Phương Thanh
- Trần Thị Thu Thanh
- Trần Nguyễn Hoàng Thơ
- Phạm Minh Tiệp
- Đặng Quang Trung
- Nguyễn Trương Phương Tứ

NỘI DUNG

- Các bước cơ bản trong phương pháp tạo dòng.
- Tạo dòng từ mRNA.
- Tạo dòng từ DNA.
- Phương pháp tạo dòng được cải tiến.

1. Các bước cơ bản trong phương pháp tạo dòng:

- Xử lý nguồn vật liệu tạo dòng DNA hay mRNA.
- Chọn và xử lý các vector.
- Tạo vector tái tổ hợp.
- Chuyển vector tái tổ hợp vào tế bào chủ.



2. Tạo dòng từ mRNA:

Ưu điểm:

- . mRNA là kết quả của quá trình phiên mã
- . mRNA chứa các trình tự mã hóa.

Ứng dụng:

- . Tạo thư viện cDNA.
- . Nghiên cứu sự biểu hiện gen
- . Sự điều hòa biểu hiện gen

Thư Viện cDNA

- Chỉ là tập hợp nhỏ một phần của hệ gen, gồm các gen được biểu hiện
- Các trình tự cADN phản ánh trình tự các sản phẩm mARN được hoàn thiện sau quá trình phiên mã
- Các protein được mã hóa bởi cADN có thể được tổng hợp trong một tế bào chủ mà ở đó không cần có phân tử mARN
- cADN có trật tự và cấu trúc đơn giản hơn ADN hệ gen.

Table 6.1. mRNA abundance classes

Source	Number of different mRNAs	Abundance (molecules/cell)
Mouse liver cytoplasmic poly(A) ⁺ RNA	9	12000
	700	300
	11500	15
Chick oviduct polysomal poly(A) ⁺ RNA	1	100000
	7	4000
	12500	5

2.1. Tổng hợp cDNA:

Tổng hợp cDNA có 2 cách:

Cách 1:

Quá trình tổng hợp có 3 giai đoạn:

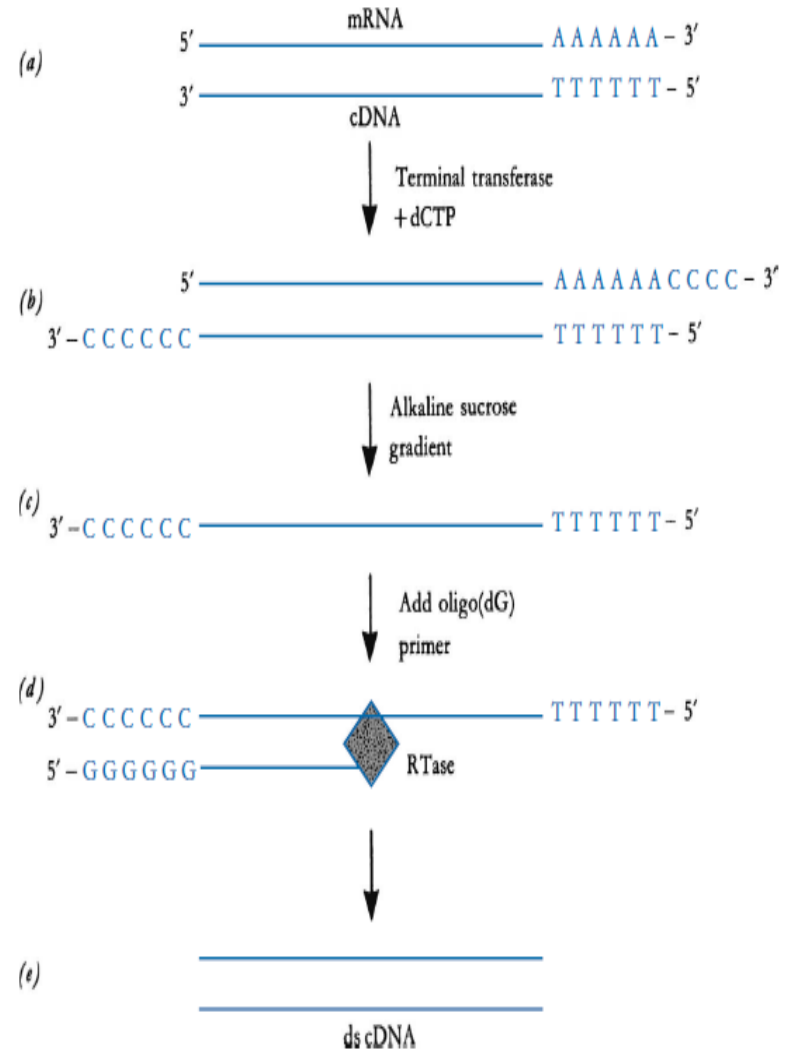
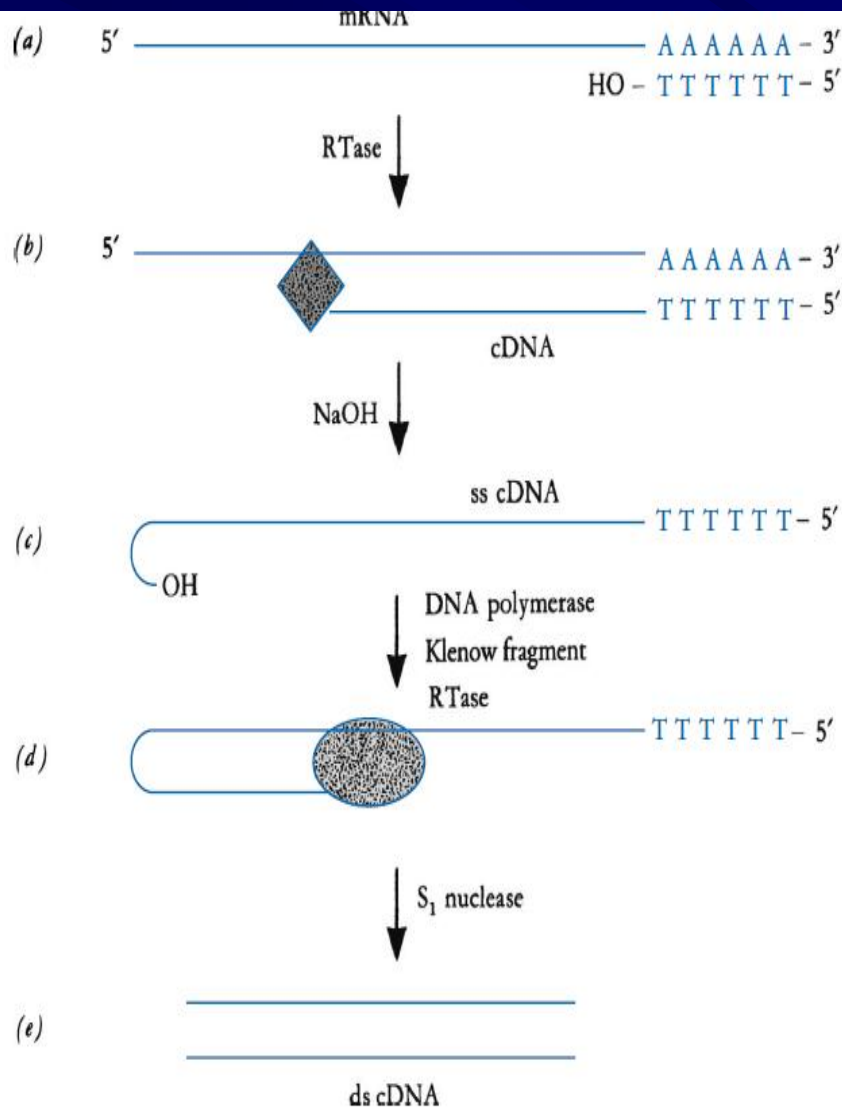
- + Bước 1: Tổng hợp sợi thứ nhất nhờ RTase
- + Bước 2: Tổng hợp sợi thứ hai nhờ AND polymerase
- + Bước 3: Cắt vùng kẹp tóc nhờ nuclease S1.

Thu ds cDNA

Cách 2:

- + Bước 1: Tổng hợp sợi thứ nhất nhờ RT, sau đó gắn đuôi oligo-C vào đầu 3' nhờ Terminal transferase, thu sợi thứ nhất nhờ Alkaline sucrose gradient
- + Bước 2: thu sợi thứ 2 nhờ RTase
- + Bước 3: Thu ds cDNA nhờ RE

Hai cách tổng hợp cDNA



2.2. Tạo dòng cDNA trong vector plasmid:

- Cắt plasmid ở những vị trí xác định nhờ RE
- Tạo cDNA đầu so le: mỗi liên kết (linker, adapter),
đuôi đồng trùng hợp.
- Nối đoạn chèn cDNA vào plasmid sẽ được tổ hợp
cDNA-plasmid.
- Biến nạp tổ hợp trên vào tế bào chủ (E.coli).
- Tạo thư viện cDNA hoàn chỉnh
- Khuếch đại thư viện cDNA

Gắn đầu bằng

- Cần ligase để gắn đoạn chèn vào vector
- Hiệu suất thấp
- Không có trình tự nhận biết cho enzym cắt giới hạn trên vector tổ hợp

Sử dụng linker

(a)

CCGAATTCGG
GGCTTAAGCC



DNA ligase

(b)

CCGAATTCGG [linker] CCGAATTCGG
GGCTTAAGCC [linker] GGCTTAAGCC



*Eco*RI

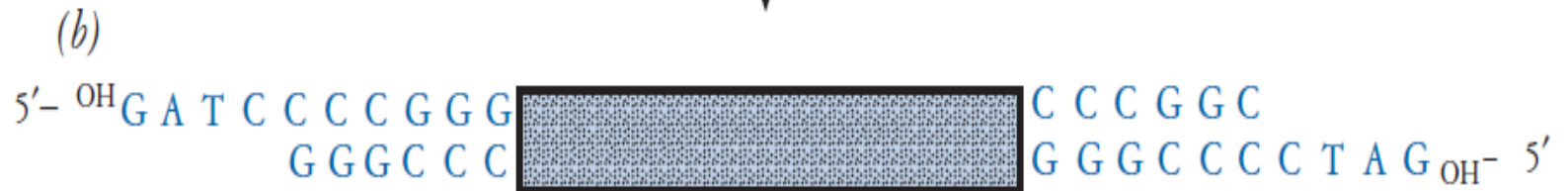
(c)

5' - AATTCGG [linker] CCG
GCC [linker] GGCTTAA - 5'

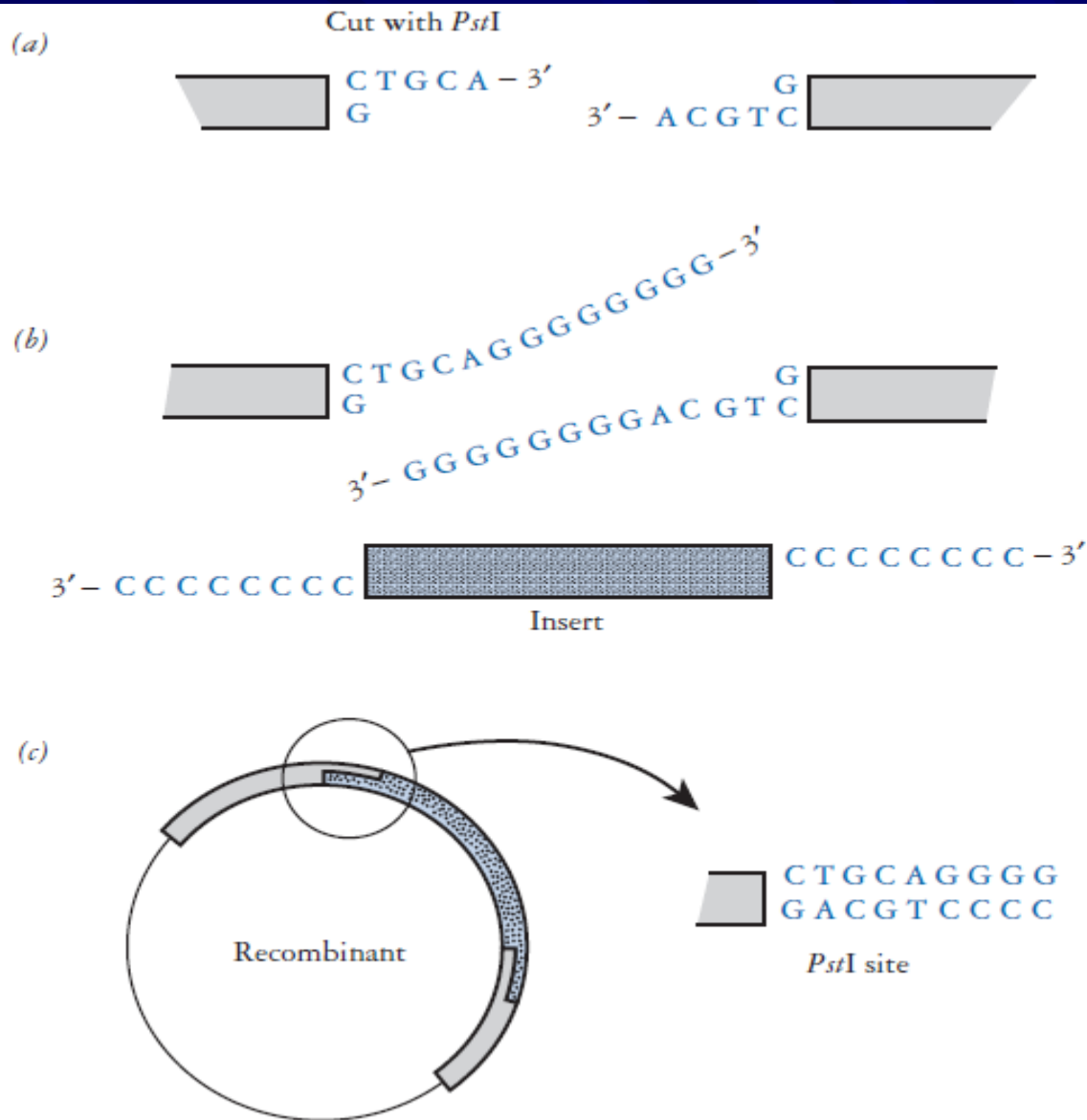
Sử dụng adaptors



↓
DNA ligase



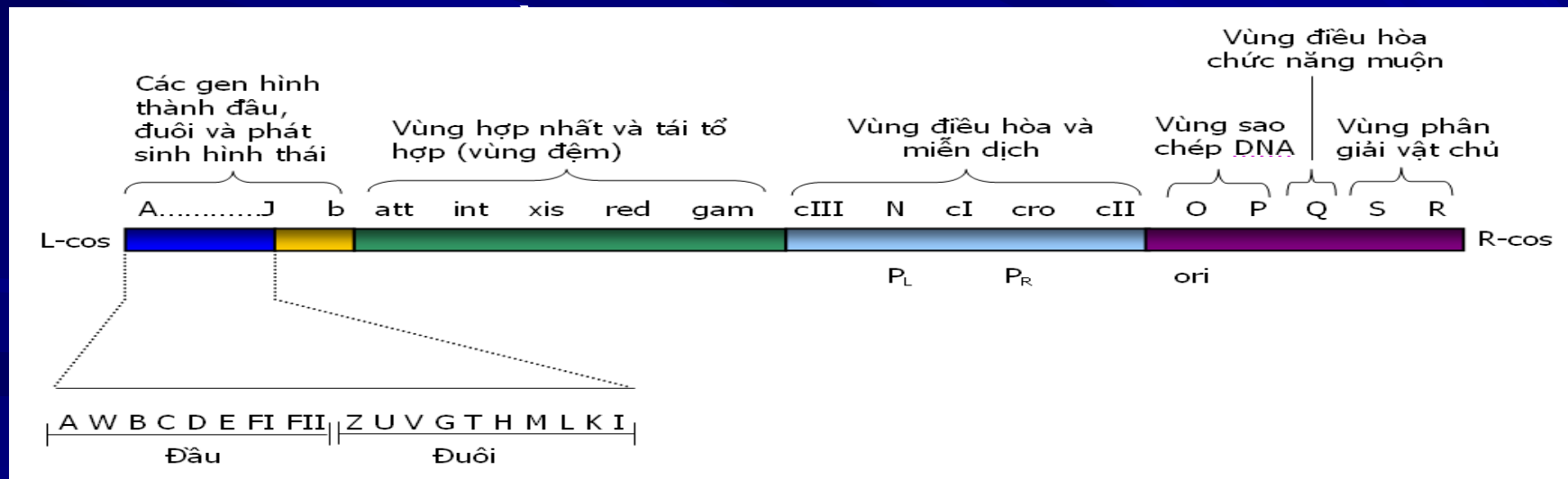
Sử dụng đuôi trùng hợp



2.3. Tạo dòng cDNA trong vector bacteriophage

Cấu trúc của bacteriophage

Bacteriophage λ là một virus mang DNA sợi đôi có kích thước khoảng 50 kb, DNA của nó ở dạng phân tử mạch thẳng có 2 đầu hỗ trợ sợi đơn dài



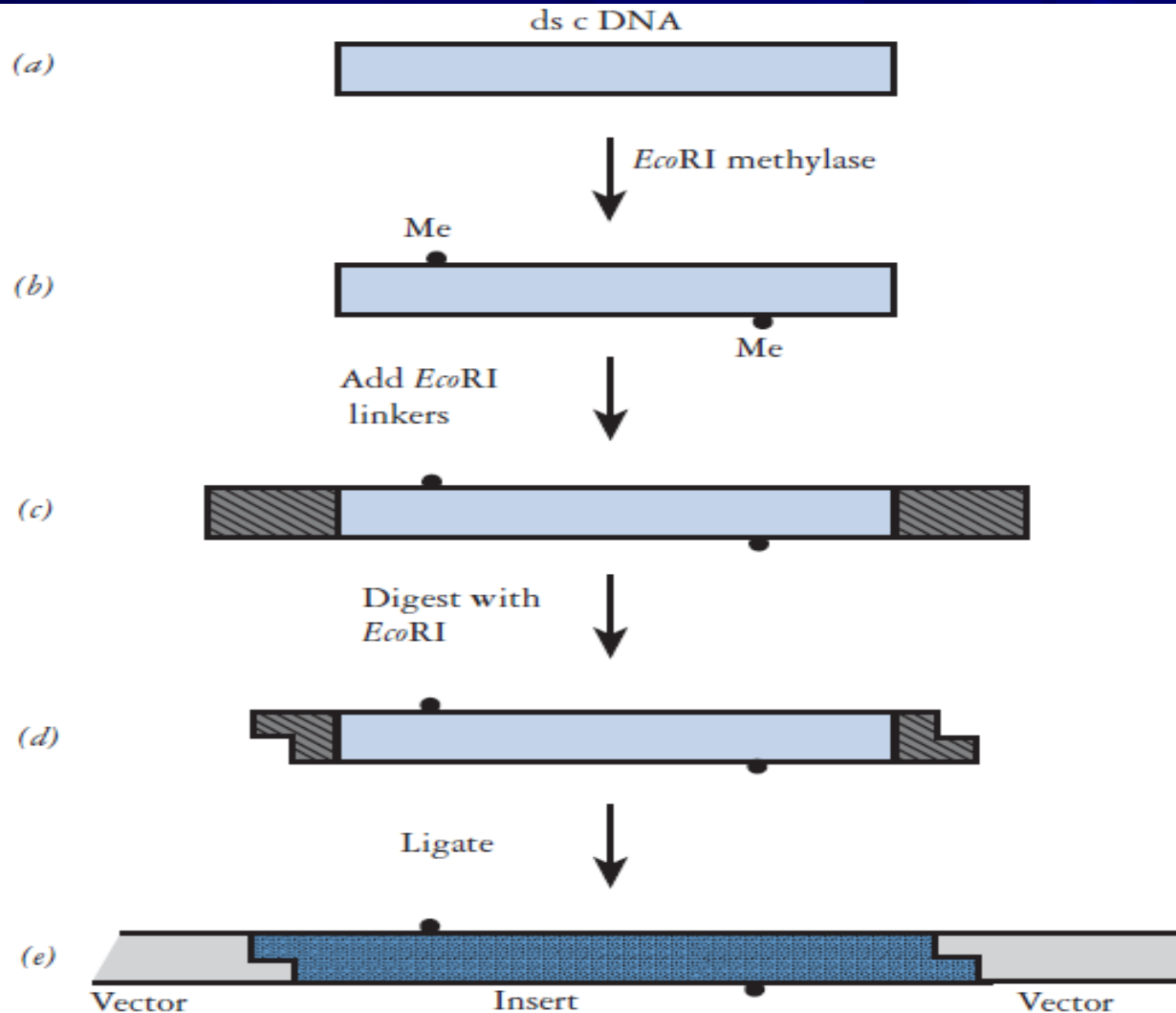
Vector Bacteriophage:

- Khi cần một số lượng lớn tái tổ hợp nhưng lượng mARN ít
- Mang được đoạn gen dài hơn plasmid
- Giai đoạn đóng gói *in vitro* sẽ tạo ra phage tái tổ hợp = > tăng hiệu quả của quá trình tạo dòng

Các vector bacteriophage trong tạo dòng cDNA

- . Vector phage:** Phần lớn xuất phát từ phage λ
Kích thước khoảng 48.5 kb, 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.
- . Các loại vector thường dùng:** vector λ gt10, Vector λ gt11

Tạo dòng cDNA trong vector phage nhờ linker



3. Tạo dòng từ DNA

DNA bộ gen của sinh vật có các đoạn intron và exon, chứa các trình tự lặp, vùng điều khiển...

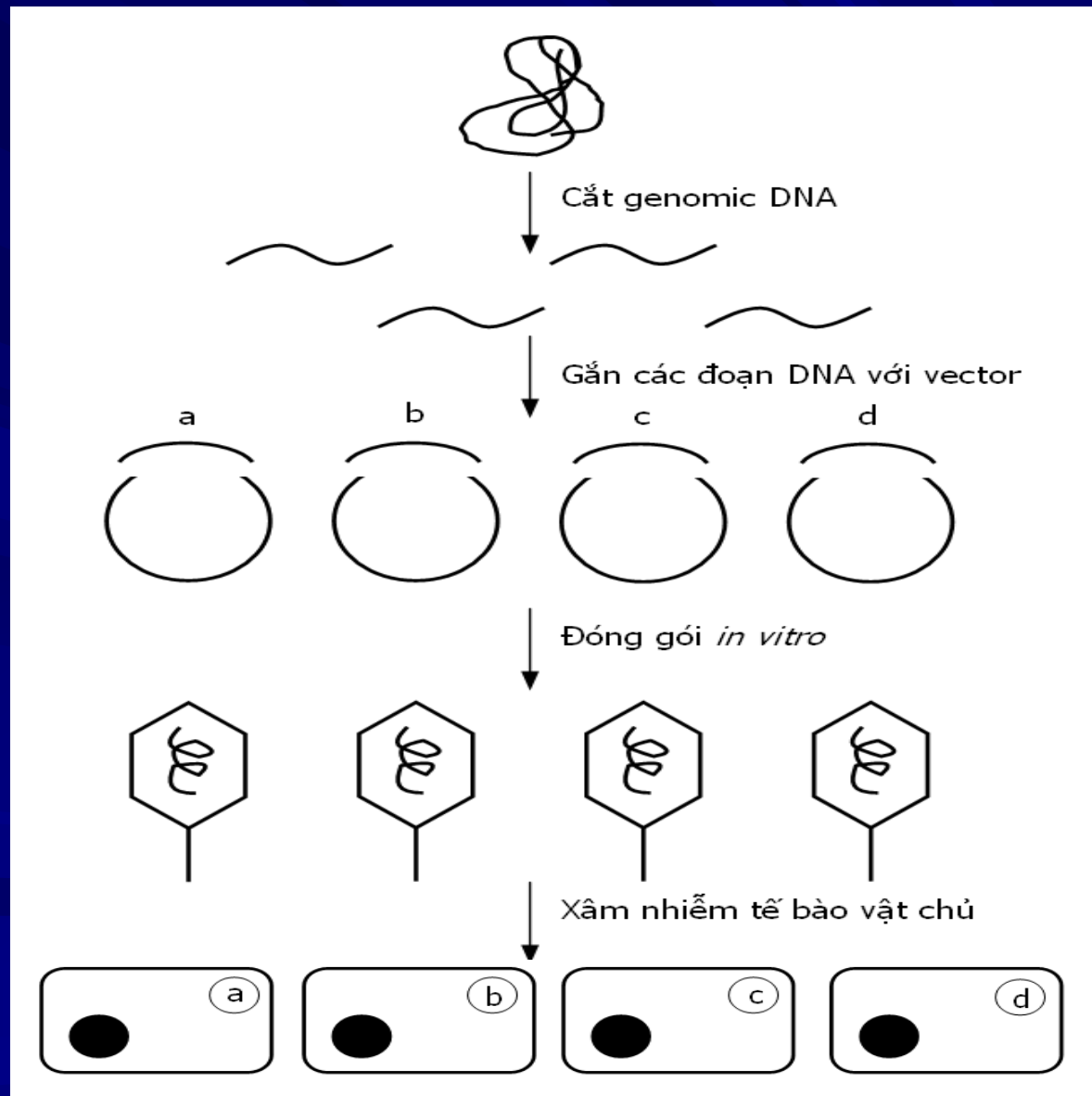
* Mục đích:

- . Tạo lập thư viện bộ gen.
- . Giải mã trình tự gen.
- . Tạo dòng các trình tự intron- exon.

3.1. Thư viện hệ gen

- Thư viện genomic DNA là một tập hợp các đoạn DNA cùng đại diện cho một genome nguyên vẹn (hoặc gần nguyên vẹn) của cá thể mà DNA được bắt nguồn từ đó.
- Thư viện genomic DNA được dùng chủ yếu hoặc để sàng lọc hoặc để xác định vị trí và thứ tự của các trình tự trong genome.

Các bước chính trong xây dựng thư viện genomic DNA



Sàng lọc một dòng từ ngân hàng DNA

- Để đảm bảo chọn được một dòng nghiên cứu từ ngân hàng, chúng ta cần tính toán số dòng (N) cần thiết lấy ra từ ngân hàng dùng vào việc sàng lọc
- Số N được tính theo công thức

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - a/b)$$

Trong đó:

N: Số dòng yêu cầu

P: Xác suất có mặt

a: Kích thước trung bình của các đoạn DNA

b: Kích thước của hệ gen

Ví Dụ :

Genome ruồi giấm có kích thước khoảng 10^5 kb được cắt ra thành các đoạn trung bình 40 kb. Hãy tính số dòng lấy từ ngân hàng để đảm bảo một đoạn AND bất kỳ sẽ có mặt trong ngân hàng với xác suất $P = 99\%$.

Số N được tính theo công thức sau

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - a/b) = \ln(1-0.99) / \ln [1 - (40/100000)] = 11.153$$

- Như vậy, để sàng lọc từ ngân hàng genome ruồi giấm, việc đầu tiên là chúng ta phải lấy từ ngân hàng ít nhất là 11.153 dòng.

3.2. Chuẩn bị các phân đoạn DNA cho việc tạo dòng:

- Trọng lượng phân tử DNA được tách dòng từ sinh vật:

Vector EMBL4: 17-23 kb

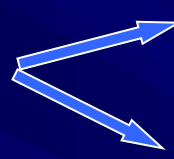
Vector BAC hay YAC: 300 Kb

→ **khác nhau tùy loại vector**

- Phương pháp tách các đoạn DNA

Hai phương pháp tách dòng:

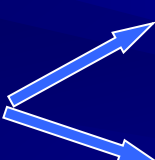
■ Cơ học



- Tạo ra các phân đoạn DNA ngẫu nhiên
- DNA không có đầu so le (cohesive termin)

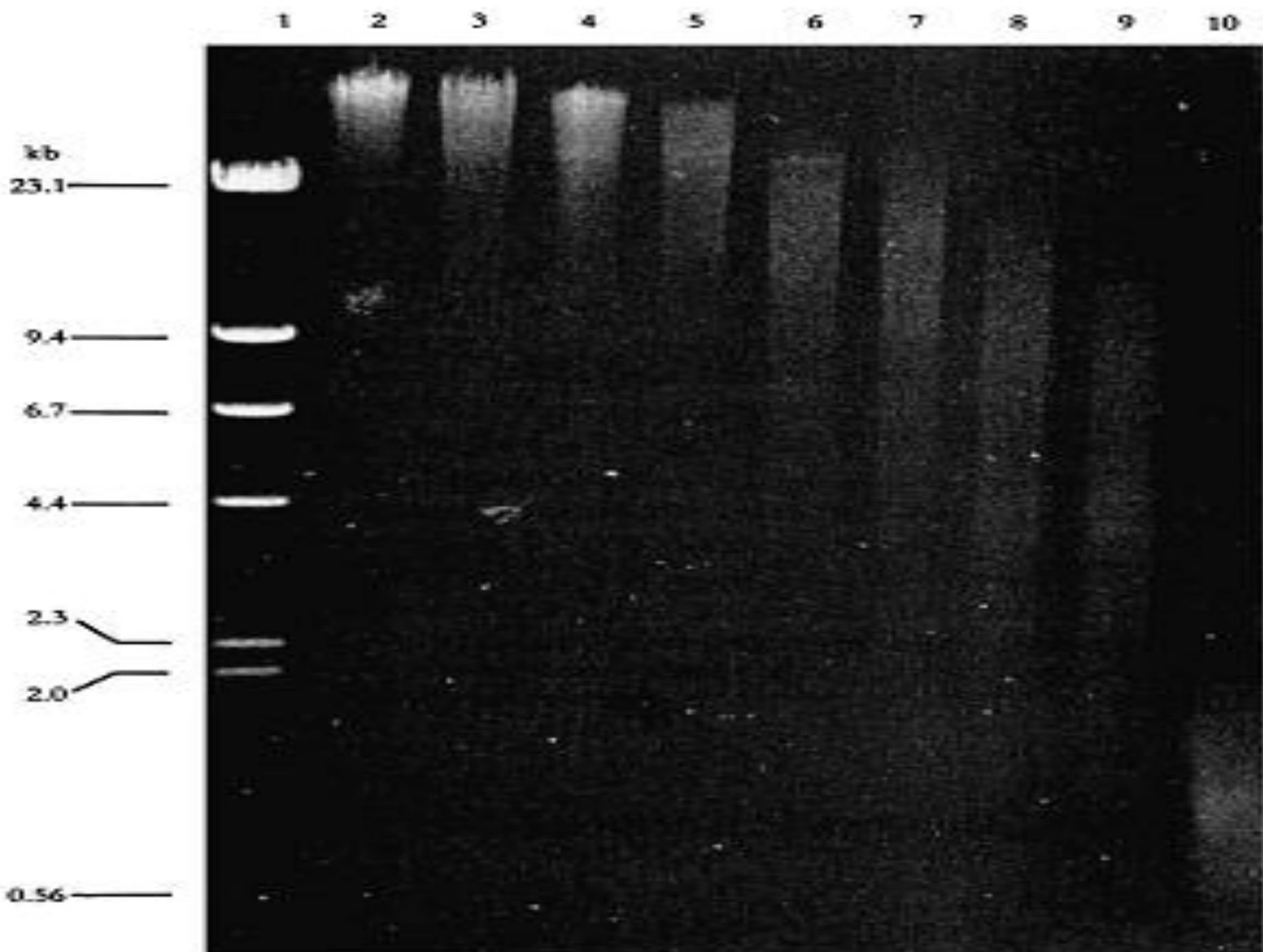
■ Enzym cắt giới hạn

✦ Hạn chế



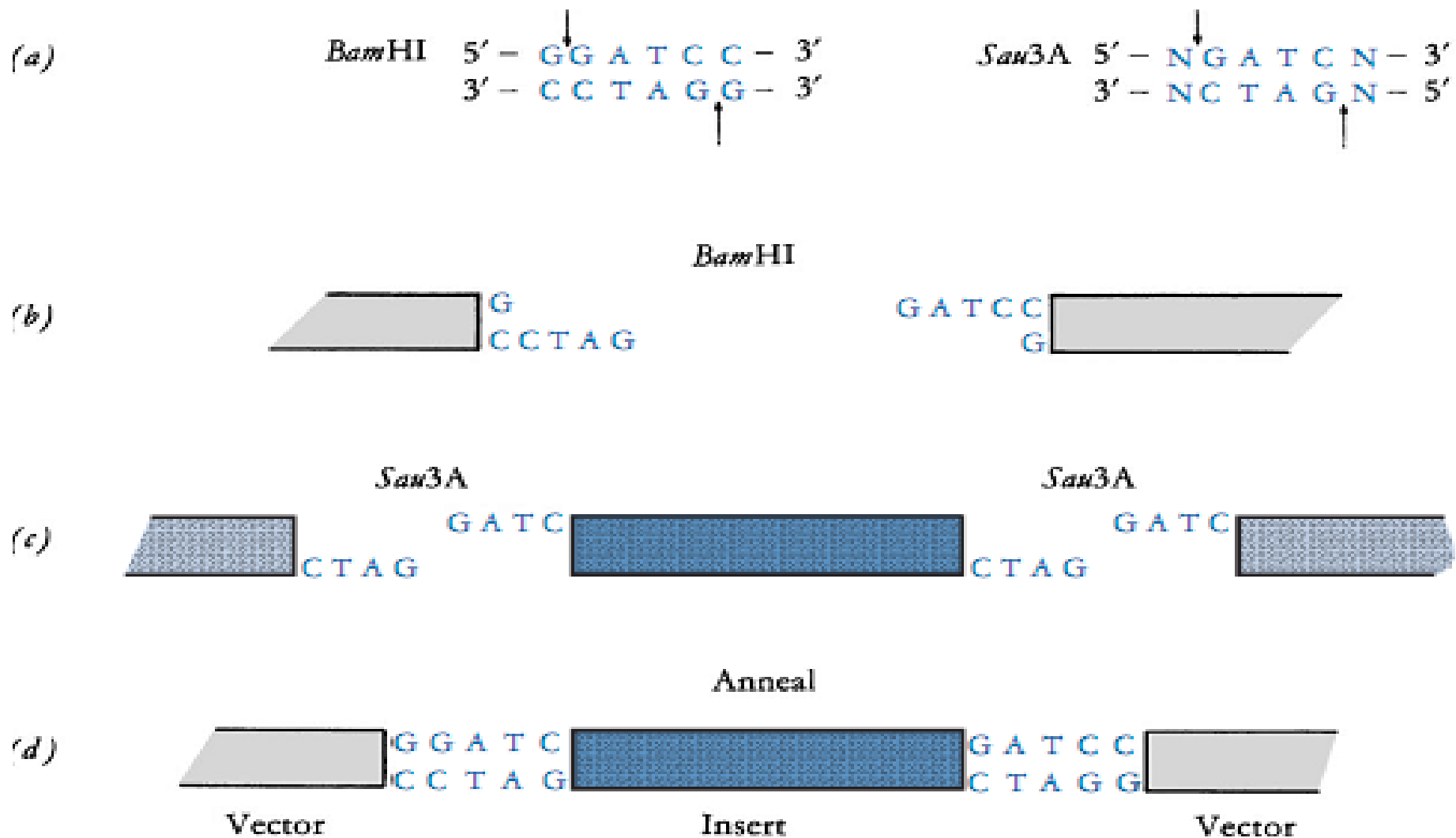
- EcoRI tạo ra các phân đoạn DNA quá ngắn
- Sự bắt cặp đoạn của những trình tự lặp lại

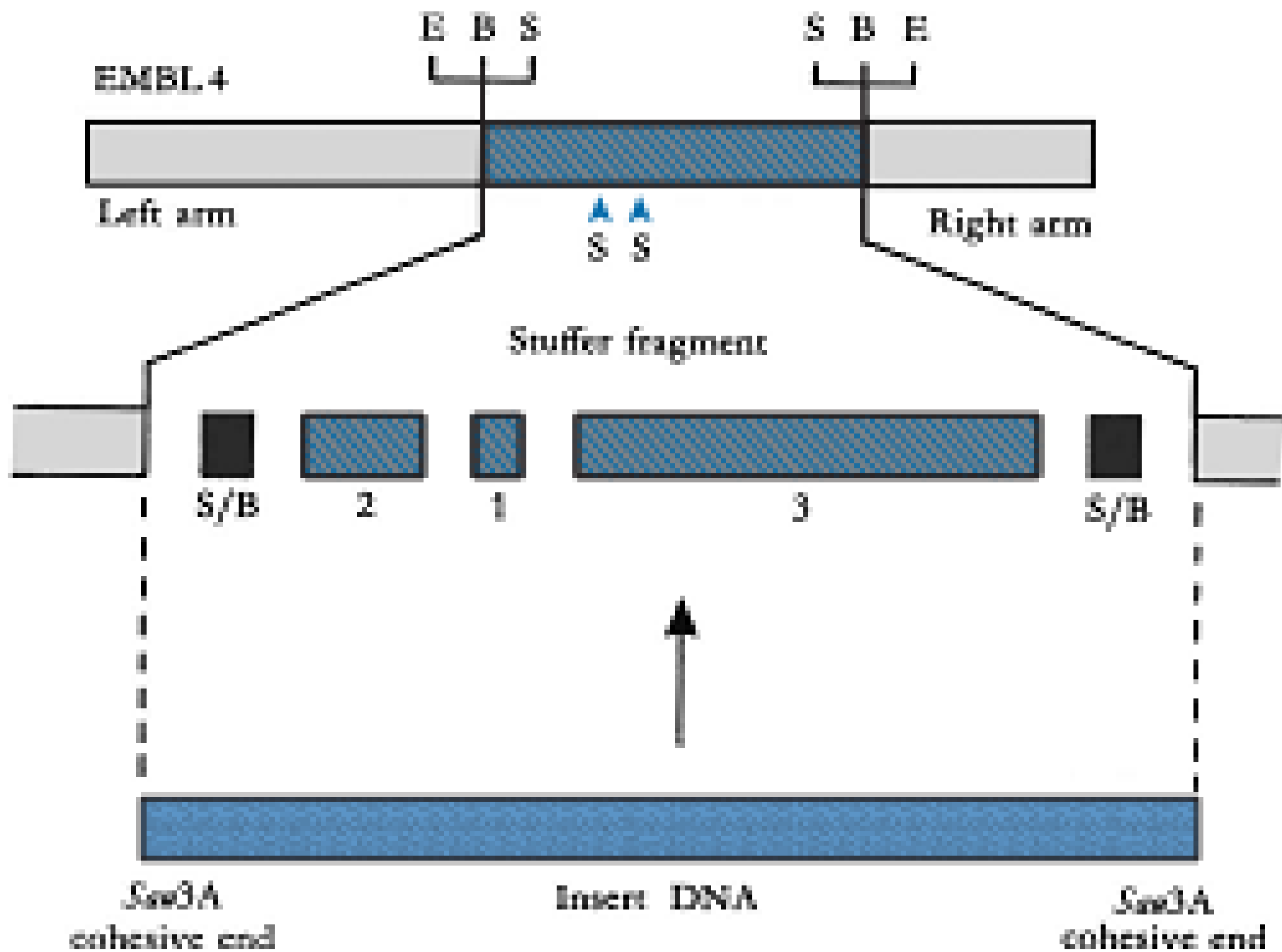
✦ Ưu điểm: DNA có kích cỡ mong muốn



3.3 Sự gắn, đóng gói và khuếch đại

Gắn DNA vào vector





DNA tái tổ hợp

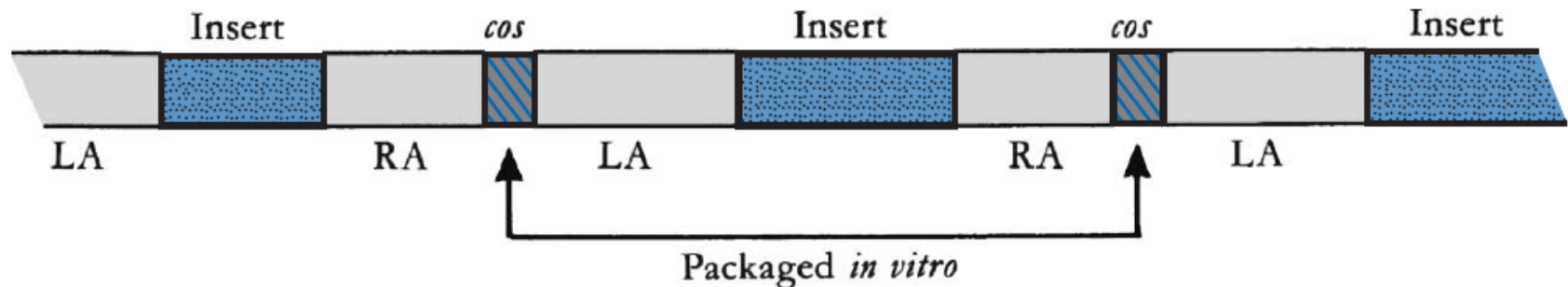
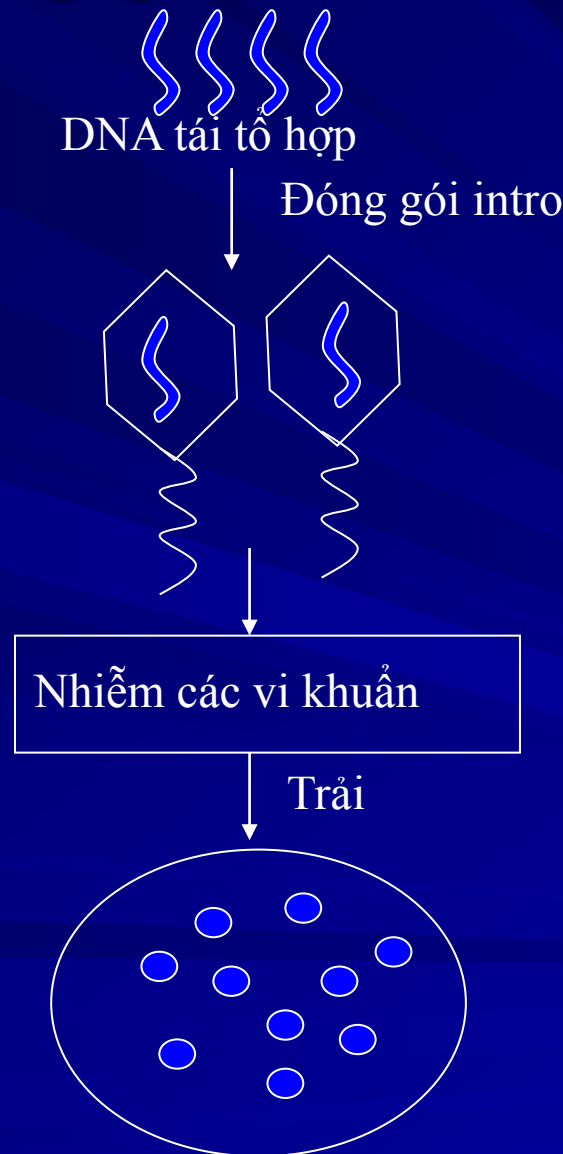


Fig. 6.11 Concatemeric recombinant DNA. On ligation of inserts into a vector such as EMBL4, a concatemer is formed. This consists of the left arm of the vector (LA), the insert DNA, and the right arm (RA). These components of the unit are repeated many times and are linked together at the *cos* sites by the cohesive ends on the vector arms. On packaging *in vitro*, the recombinant genomes are cut at the *cos* sites and packaged into phage heads.

“Đóng gói” và khuếch đại:



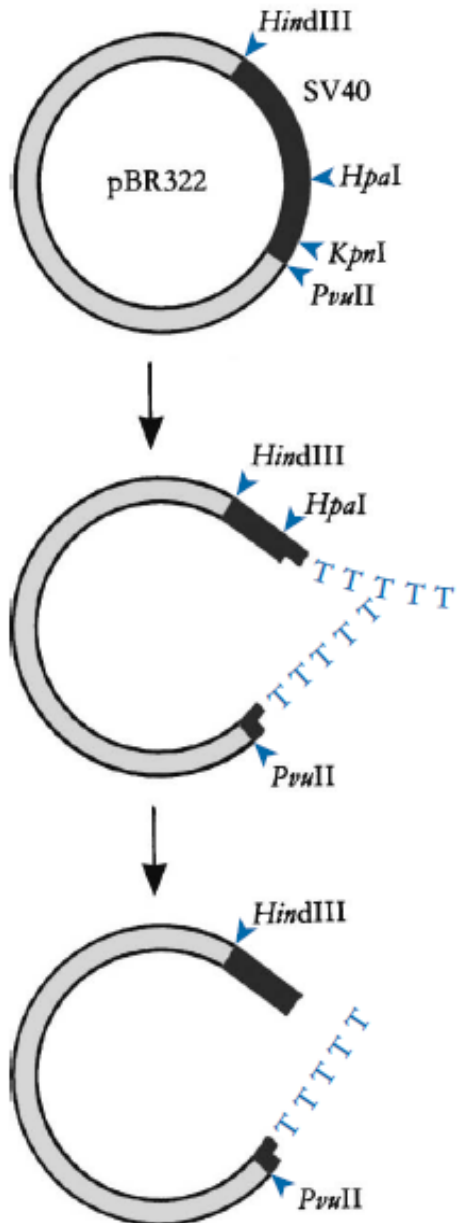
4. Phương pháp tạo dòng được cải tiến.

4.1 Tổng hợp và tạo dòng cDNA

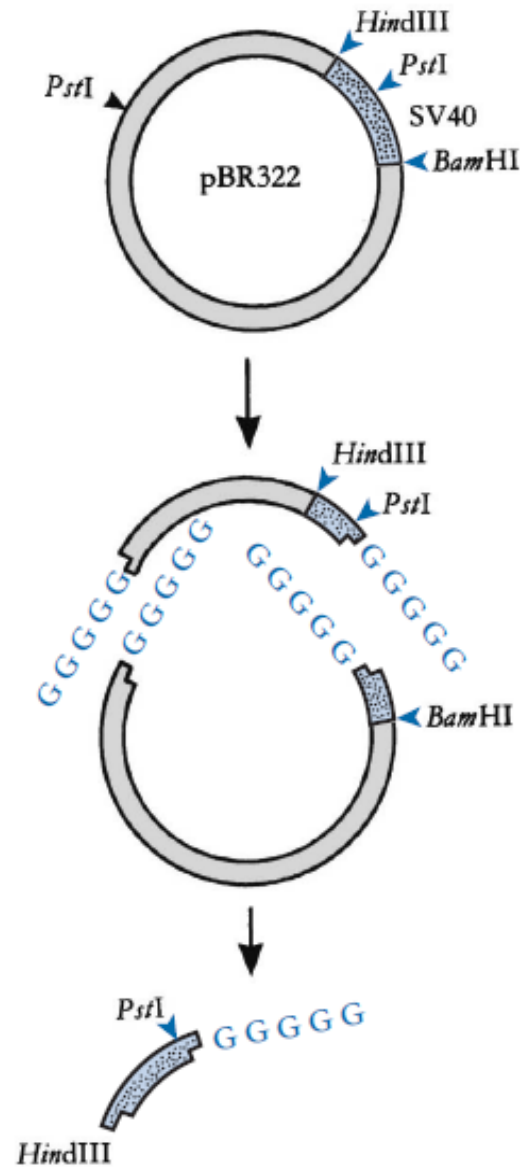
Năm 1982, Hiroto Okayama và Paul Berg đã đưa ra phương pháp tạo dòng cDNA.

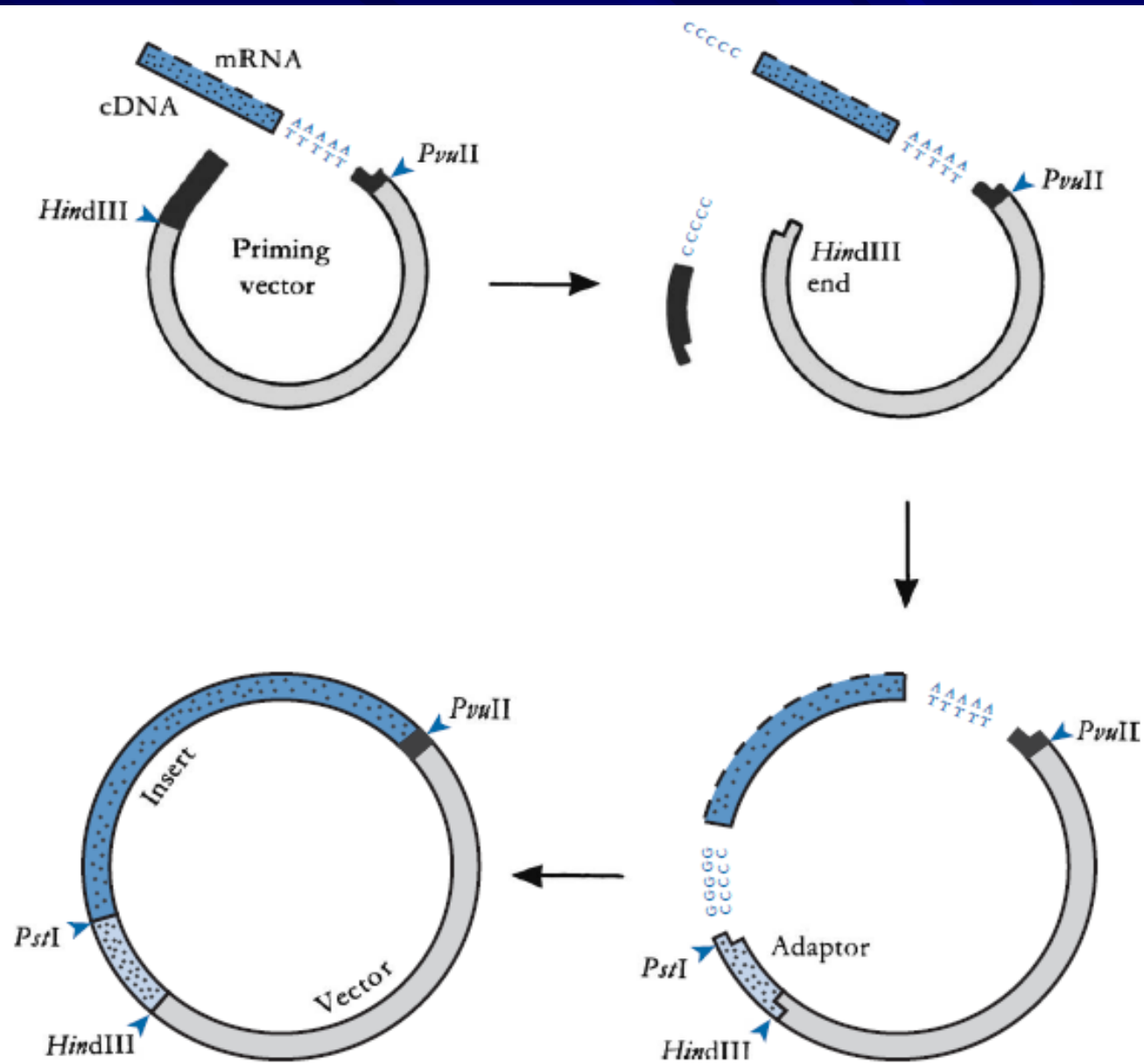
- . Vector plasmid được sử dụng như là phân tử môi.
- . mRNA được dùng để tổng hợp cDNA
- . Bộ adaptor và primer được dựa trên pBR322, với trình tự bổ sung từ virus SV40

Primer



Adaptor





4.2 Sự biểu hiện của những phân tử DNA được tạo dòng

- Promoter hay vùng (gene) khởi động là trình tự DNA thiết yếu cho phép một gen có thể tiến hành phiên mã tạo mRNA.
- Promoter có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế.
- Promoter là những nhân tố quan trọng trong việc quyết định mức độ biểu hiện của một gen nhất định.

Table 6.3. Some promoters that may be used in expression vectors.

Organism	Gene promoter	Induction by
<i>E. coli</i>	lac operon	IPTG
	trp operon	β -indolylacetic acid
	λP_L	λ cl protein
<i>A. nidulans</i>	Glucoamylase	Starch
<i>S. cerevisiae</i>	Acid phosphatase	Phosphate depletion
	Alcohol dehydrogenase	Glucose depletion
	Galactose utilisation	Galactose
	Metallothionein	Heavy metals
<i>T. reesei</i>	Cellobiohydrolase	Cellulose
Mouse	Metallothionein	Heavy metals
Human	Heat-shock protein	Temperature $>40^{\circ}\text{C}$

Sự biểu hiện gen ở prokaryote

- Ở vi khuẩn và phage, hoạt tính đóng mở gene thường được điều khiển qua phiên mã tổng hợp các mARN.
- Ở sinh vật prokaryote, vùng promoter chứa hai đoạn trình tự ngắn tại vị trí -10 và -35 phía trước gen theo chiều phiên mã.
 - + Trình tự tại -10 được gọi là hộp Pribnow và thường chứa 6 nucleotide TATAAT.
 - + Trình tự -35 thường chứa 6 nucleotide là TTGACA cho phép gene được phiên mã với tần số cao.

Sự biểu hiện gen ở eukaryote

- Tương tự vi khuẩn, các promoter của eukaryote cũng nằm phía trước điểm xuất phát trên mRNA.
- Hộp TATA định hướng cho mRNA bắt đầu phiên mã nằm ở phía trước điểm bắt đầu phiên mã khoảng 30 bp ở động vật có vú và 60 đến 120 bp ở nấm men.

- Mã kết thúc cũng quan trọng. Vùng có trình tự cách -25 có trình tự tương đồng 5'-ATAAAT-3' (TATA hoặc hộp Hogness) và một trình tự cách -75 có trình tự tương đồng 5'-GG(T/C)CAATCT-3' được biết như hộp CAAT.

4.3. Việc tạo dòng các đoạn DNA lớn trong vector BAC và YAC:

BAC

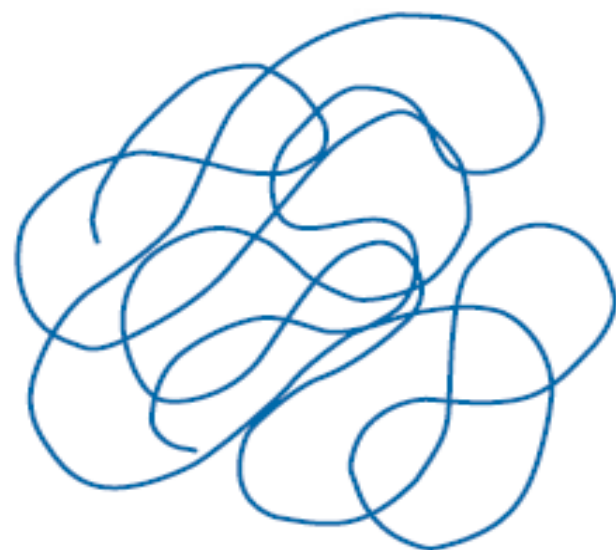
- Có nguồn gốc từ F-plasmid
- Có thể tái bản trong Ecoli với đoạn chèn có kích thước lớn đến 300kb.
- Các BAC thuận lợi cho việc xây dựng thư viện, lập bản đồ và phân tích gen.

Ưu điểm: Chúng có hiệu suất tạo dòng cao, các đoạn chèn DNA thao tác dễ dàng dễ tinh sạch và duy trì ổn định.

YAC

- Chúng có thể được cắt thành 2 đoạn hoặc 2 nhánh NST để nhận các đoạn cắt lớn có kích thước đến 2.000kb
- Thư viện YAC được lắp ráp và sử dụng cho việc lập bản đồ các vùng có kích thước của DNA người.

Nhược điểm: Hiệu suất tạo dòng thấp, xuất hiện các dòng khảm, sự không ổn định của đoạn chèn, thao tác tương đối khó so với hệ thống vi khuẩn



High molecular weight
genomic DNA

Partial digest



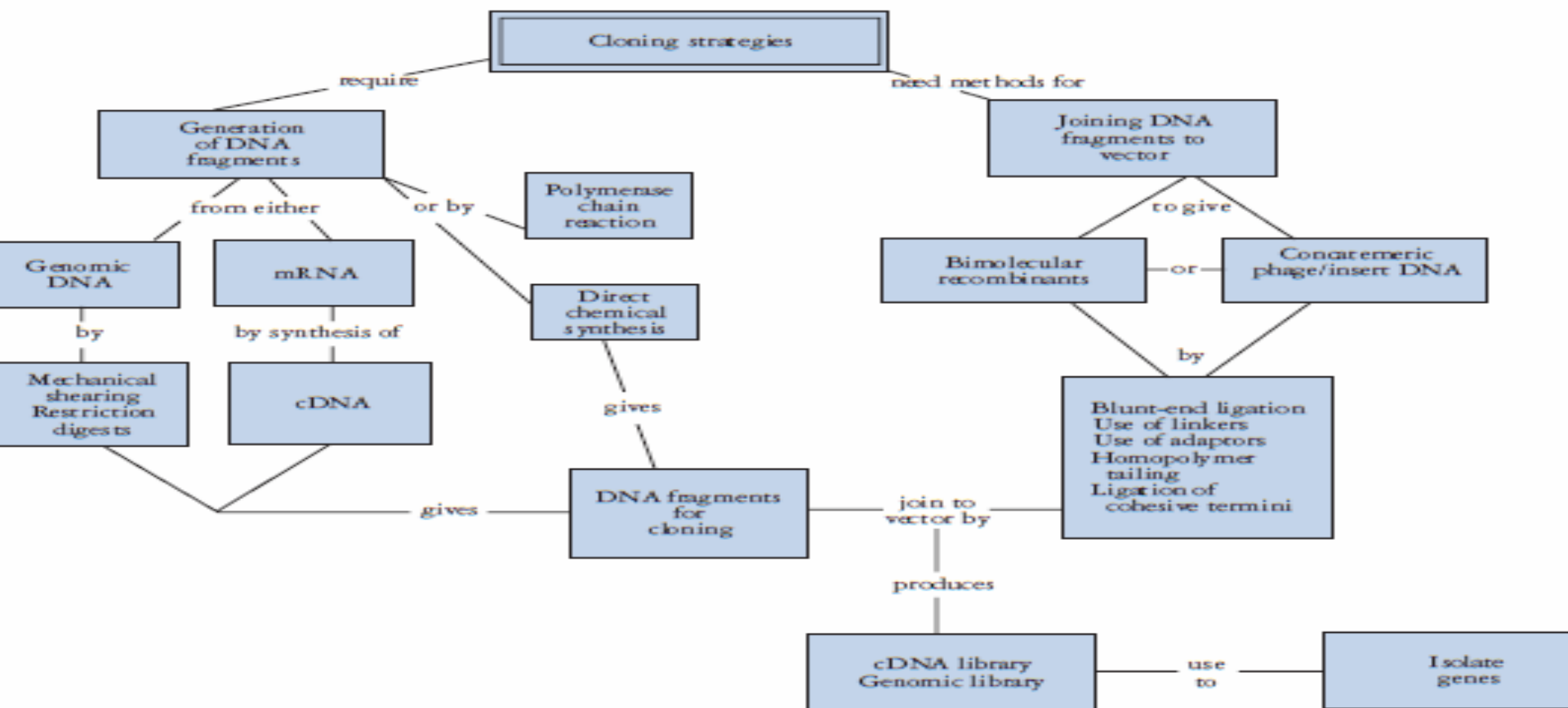
Up to 500 kb



TEL *trp*/ARS/CEN



YAC
ura TEL



Concept map 6