

LỜI MỞ ĐẦU

Tuy những thành quả nghiên cứu như thực phẩm biến đổi gen (GMF - genetically modified food) đã có trên bàn ăn cũng như bàn nghị sự của nhiều nước trên thế giới, và nhiều thành quả khác đã được vận dụng khá rộng rãi trong y học và nông nghiệp, sinh học phân tử vẫn còn là lĩnh vực khá mới mẻ đối với nhiều trường đại học nước ta. Để đáp ứng nhu cầu tiếp cận nghiên cứu, phát triển và ứng dụng lĩnh vực này cần có một tài liệu thực hành sinh học phân tử bằng tiếng Việt. Đó là lý do ra đời cuốn giáo trình này.

Là tài liệu hướng dẫn kỹ thuật, giáo trình này đương nhiên giới thiệu các bước kỹ thuật thường được thực hiện trong sinh học phân tử. Nhưng quan trọng hơn vẫn là thông qua các bước kỹ thuật cụ thể giúp người học nắm được những điểm cơ bản về nghiên cứu phát triển sinh học phân tử được các nhà nghiên cứu nhiều thế hệ sáng tạo và thực hiện trong quá khứ, và nhờ những kết quả nghiên cứu đó đã vẽ lại bức tranh toàn cảnh về thế giới như đã được khái quát hóa trong nhiều tài liệu sinh học. Mong muốn của người biên soạn là người học nắm được những điểm cốt yếu của kỹ thuật sinh học phân tử rồi trên cơ sở đó phát triển những kỹ thuật hay cải tiến những bước cho phù hợp với thực tiễn nghiên cứu.

Với những yêu cầu cao bao quát cả lịch sử phát triển lẫn cập nhật hóa kiến thức, việc biên soạn một giáo trình thực hành về lĩnh vực này gặp rất nhiều khó khăn. Tuy vậy, chúng tôi cố gắng đưa vào tài liệu này những vấn đề liên quan đến thực hành sinh học phân tử chọn lọc từ những thành quả mà nhiều nhà nghiên cứu đã mô tả trong nhiều bài báo chuyên ngành liên quan sinh học, một số thuyết trình hướng dẫn của một số hãng cung cấp thiết bị nghiên cứu sinh học cũng như từ kinh nghiệm cá nhân. Nhiều kỹ thuật và "thực đơn" cụ thể giới thiệu trong tài liệu này rất cũ nhằm giúp người học tránh những quan niệm đơn giản hóa con đường nghiên cứu khoa học. Những "thực đơn" mới liên quan được giới thiệu nhiều khi ở dưới dạng khái quát. Người học cần lưu ý rằng hầu như tất cả những "thực đơn" đã đưa ra đều là kết quả của kinh nghiệm nghiên cứu và suy luận khoa học của cá nhân trong quá trình "tối ưu hóa". Vì vậy, người làm thí nghiệm có thể cải tiến để có kết quả tốt hơn phù hợp điều kiện của mình. Khó khăn khác mà việc biên soạn gặp phải là yêu cầu dung lượng giáo trình trong 30 tiết hạn chế số lượng trang in cũng như các kỹ thuật được chọn lọc. Để bù lại, học viên cần tìm nhiều nội dung bổ trợ trong các giáo trình lý thuyết liên quan trong bộ sách này, như "Nhập môn sinh học phân

tử", "Công nghệ sinh học", "Công nghệ DNA tái tổ hợp", "Công nghệ chuyển gen động vật, thực vật" và "Công nghệ protein"...

Trong thực tế, hai nhóm phương pháp nghiên cứu khoa học được song song vận dụng là các phương pháp thực nghiệm (experimentalistic) và các phương pháp tự nhiên học (naturalistic) hay quan sát tự nhiên, bổ sung cho nhau, và chúng ta không nên coi nhẹ cách thức nào. Tuy vậy, để tiếp cận với các quá trình vi mô trong cơ thể sống thì việc quan sát tự nhiên, đo đạc các số liệu vĩ mô rồi từ đó khái quát thành lý luận về các quá trình vi mô không còn là con đường được đa số người lựa chọn. Nghiên cứu thực nghiệm đầy khó khăn về các quá trình sinh học vi mô đã trở thành cách thức chủ yếu để loài người nhận thức thế giới sinh học. Sinh học phân tử phát triển trên cơ sở kiến thức đa ngành. Có thể nói Sinh học phân tử là kết quả của sự phối hợp tư duy hóa học với phương tiện lý học và các hệ thống sinh học nhằm lập lại các quá trình sinh học tự nhiên để vận dụng trong sản xuất các sản phẩm con người mong muốn với hiệu suất cao hơn, cũng như phân loại các đối tượng sinh học và nhận biết chúng thông qua việc xác nhận phân tử đặc hiệu. Trong quá trình này cần chú ý rằng những hiện tượng ta quan sát được trong tự nhiên là kết quả tất nhiên của muôn vàn các chuyển hóa ngẫu nhiên. Do đó, những thực nghiệm nhằm lập lại những hiện tượng tự nhiên đã được hình thành qua hàng trăm triệu năm tiến hóa thường gặp không ít khó khăn. Vì vậy, các kỹ thuật được giới thiệu cũng không thể tránh khỏi sự buồn tẻ của các thử nghiệm, tuyển chọn kết quả thử nghiệm, sàng lọc sản phẩm, dùng sản phẩm này làm nguyên liệu cho các thử nghiệm tiếp theo... Khi nào cũng vậy, chọn được cái sản phẩm đúng trong số cực kỳ lớn các sản phẩm gần đúng và các sản phẩm sai và sau đó nhân cái sản phẩm đúng duy nhất là các bước được ưu tiên trong kỹ thuật sinh học phân tử.

Tuy kỳ vọng cao nhưng chúng tôi không tránh khỏi sai sót, rất mong được nhận sự góp ý xây dựng của các đồng nghiệp và người đọc.

Tác giả

Chương 1

NHỮNG THAO TÁC CƠ BẢN

I. Dụng cụ và hóa chất

1. Dụng cụ

Nhìn chung, các phòng thí nghiệm thực hiện các thí nghiệm sinh học phân tử và chuyển gen (di nạp gen) không có dụng cụ gì đặc biệt so với các phòng thí nghiệm sinh học khác. Tuy nhiên, so với các thí nghiệm sinh hóa vẫn thường được tiến hành trước đây thì các loại hóa chất thường dùng với lượng ít hơn, do DNA và RNA nếu lẫn với nuclease thì dễ dàng bị phân giải và các chất thường hấp phụ lên bề mặt thủy tinh nên thường phải sử dụng các ống chất dẻo nhỏ. Hơn nữa, sự tạp nhiễm DNA thường làm hỏng các thí nghiệm nên tốt hơn hết là sử dụng dụng cụ một lần trong chừng mực kinh tế còn cho phép. Dụng cụ thường dùng trong các phòng thí nghiệm sinh học phân tử có thể là:

1.1. Các loại ống (tubes) gồm các loại ống Eppendorf 1,5 ml, 0,5 ml (hãng Eppendorf, hãng BioRad...) dùng cho hầu hết các phản ứng như các phản ứng enzyme các loại như phản ứng enzyme hạn chế, chiết xuất nucleic acid (NA) bằng phenol, kết tủa nucleic acid bằng ethanol... và sau đó cũng với những ống này có thể quay li tâm trong những máy li tâm chuyên dụng. Các loại ống nghiệm dùng một lần như ống Falcon 2059, ống Corning 25216 P loại 4 ml thì không chịu được li tâm với vận tốc cao. Các loại ống nghiệm 12 ml có thể li tâm trong máy li tâm lạnh có ống lót (adaptor) đến 10.000 vòng/phút (v/ph) và cũng có thể sử dụng cho việc kết tủa bằng ethanol. Các loại ống nghiệm chất dẻo nắp vận có đáy nhọn có thể dùng để tập trung vi khuẩn nhưng không được quay li tâm ngoài phạm vi 3.000 v/ph. Các loại ống nghiệm polyethylene cỡ 50 ml được sử dụng rộng rãi trong việc đựng hóa chất, chiết xuất nucleic acid bằng phenol với lượng lớn. Một số ống nghiệm chất dẻo không thể sử dụng với chloroform, một số khác có thể hấp cao áp diệt trùng, đa số các loại ống nghiệm chất dẻo được bán ở dạng đã khử trùng (thường bằng tia gamma, trừ các ống Eppendorf).

1.2. Máy li tâm thường sử dụng là loại có gắn đầu rotor cho ống nghiệm Eppendorf với tốc độ 13.000 đến 15.000 v/ph, thường để tập trung các hợp chất thí nghiệm xuống đáy ống nghiệm như trong thí nghiệm kết tủa nucleic acid bằng ethanol, chloroform hoặc trong quá trình chiết xuất bằng

phenol...

1.3. Các loại pipet (ống hút) và pipetor (ống hút điện động) có các loại đầu (tip) cho micropipet tự động sử dụng một lần. Thường phân chia thành một số loại theo dung lượng, hình thức và thiết kế tùy hãng: 0,1 μ l ~ 5 μ l, 1 ~ 20 μ l, 20 ~ 200 μ l, 200 ~ 1.000 μ l... Dù dung lượng nhỏ cũng thường có sai số ít nhiều, vì vậy trong đa số các thí nghiệm đòi hỏi lượng chính xác cần tuân thủ nguyên tắc không đổi loại pipet một khi không thật cần thiết. Các đầu pipet (tip, còn gọi là "đầu côn") cần cho vào hộp giá (rack), đậy nắp và hấp cao áp tiệt trùng.

Trong phòng thí nghiệm còn dùng các loại pipet thủy tinh và pipet điện động. Trong các thí nghiệm DNA tái tổ hợp không được sử dụng miệng để hút mẫu, khi đó phải dùng pipetor điện động hoặc pipet bóng cao su để hút, tránh tạp nhiễm. Các loại pipet thủy tinh có thể rửa sạch, hấp cao áp tiệt trùng và dùng lại nhiều lần nhưng không được sử dụng để hút các loại dung dịch DNA, RNA, để tránh tạp nhiễm.

1.4. Bể ủ (incubator): do các phản ứng thực hiện ở 37 °C là rất phổ biến nên mỗi phòng thí nghiệm cần có một bể ủ có thể thiết định nhiệt độ. Trong bể ủ nên có một vài tấm nhựa xốp (hoặc gỗ bần [cock]) có khoan các lỗ làm giá dành cho các ống 1,5 ml, 0,5 ml... Cũng có loại bể ủ có thể chỉnh nhiệt độ từ 0 đến 30 °C. Các phản ứng như nick translation, ligation... thường vận dụng nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ phòng. Khi đó nếu không có gì trở ngại thì cũng có thể sử dụng máy luân nhiệt (thermocycler) được thiết định ở mức nhiệt độ cần thiết. Tương tự, có thể sử dụng khối ổn nhiệt (block heater hay heating block) rất tiện lợi đối với các ống Eppendorf 1,5 ml.

1.5. Dụng cụ nuôi cấy vi khuẩn: là cần thiết cho nhiều thí nghiệm khác nhau như cloning, chuẩn bị DNA, RNA nguyên liệu... Thường sử dụng các loại đĩa Petri (hộp lồng) có đường kính 10 cm, 15 cm, các bình tam giác hoặc bình cầu đáy bằng 500 ml dùng nuôi cấy 200 ~ 300 ml, cũng có khi cần bình đáy bằng 3 lít để nuôi cấy lượng vi khuẩn dưới 1 lít. Nếu cần nuôi cấy dưới 1,5 ml vi khuẩn cần dùng ống nghiệm thủy tinh 12 ml có nắp nhựa hoặc nhôm, hấp cao áp tiệt trùng mà dùng.

2. Hóa chất

2.1. Những điều chú ý chung

Nói chung các hóa chất dùng trong các kỹ thuật sinh học phân tử và DNA tái tổ hợp là hóa chất hạng đặc biệt.

Nước cũng phải là nước khử ion được chưng cất (nước tái chưng) hoặc đã qua lọc MiliQ (hãng MiliQ) thường gọi là "nước siêu sạch". Tuy nhiên, trong trường hợp cần chế dung dịch đệm cho điện di thì dùng nước khử ion cũng tốt.

Trong các thí nghiệm với nucleic acid, điều đáng sợ nhất là nuclease tạp nhiễm trong nước, trong hóa chất và nguyên liệu. Để loại bỏ enzyme này cần chú ý tuân thủ một số điểm sau:

- 1) Tất cả các dung dịch và nước cần phải được tiệt trùng bằng hấp cao áp hoặc lọc qua màng lọc vi khuẩn. Nếu cần cũng nên bảo quản đông lạnh sâu ở -20°C bởi vì vi khuẩn và nấm phát triển là nguyên nhân phát sinh nuclease.
- 2) Để đề phòng tạp nhiễm giữa các nguyên liệu và các dung dịch hóa chất nên sử dụng đầu pipet và ống nghiệm một lần rồi vứt bỏ. Do vấn đề kinh tế có khi không thể sử dụng đồ hoàn toàn mới nhưng do nguy hiểm có thể xuất phát từ tạp nhiễm một lượng rất nhỏ nên không được sử dụng lại các ống và đầu pipet cho những thí nghiệm tương tự.
- 3) Sử dụng pipet, đầu pipet tự động, chai lọ đựng hóa chất chỉ sau khi hấp cao áp hoặc nhiệt khô (nung) tiệt trùng.
- 4) Hóa chất ở dạng các dung dịch nếu bảo quản kéo dài hoặc lặp đi lặp lại việc giải đông thường biến tính. Vì vậy, nên chia thành lượng nhỏ sử dụng hết trong một hai ba lần và bảo quản ở -20 hoặc -70°C . Ví dụ, acetyl coenzyme A, dithiothreitol, formamide đã khử ion, nucleotide triphosphate...

2.2. Dung dịch gốc

Dung dịch đệm khác nhau trong đó có dung dịch đệm sử dụng cho điện di... nên chế thành dung dịch gốc có nồng độ cao để khi cần thì pha loãng hay hỗn hợp rất tiện lợi. Dưới đây là một số dung dịch nên pha sẵn ở dạng dung dịch gốc.

- 1) **Tris-HCl 2M (pH 7,5)**: 121,1 g/500 ml, hoặc **1M**: 121,1 g/1.000 ml. Trizma-base (của Sigma...) khi cần điều chỉnh pH cần phải thêm lượng lớn HCl, vì vậy khi đó nhiệt độ dung dịch tăng lên. Khi nhiệt độ tăng pH của dung dịch giảm, khi nhiệt độ giảm pH dung dịch tăng. Cho nên cần điều chỉnh pH đến gần mức cần thiết (pH 7,5), để nguội đến nhiệt độ phòng rồi điều chỉnh pH cho đúng. Sau đó cần hấp cao áp tiệt trùng.
- 2) **NaCl 5M**: 146,1 g/500 ml nước cất. Hấp cao áp tiệt trùng.
- 3) **EDTA 0,5M (pH 8,0)**: pha 93,05 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ vào trong khoảng

400 ml nước cất, vừa khuấy vừa thêm NaOH tinh thể để đạt đến pH 8,0 rồi thêm nước cho đủ 500 ml. Nếu pH không đạt đến gần 8,0 thì ở nhiệt độ phòng EDTA không tan. Hấp cao áp diệt trùng.

4) **SDS 10% hoặc SDS 20%**: hòa tan SDS trong nước cất ở 65 °C sau 1 giờ xử lý, lọc qua lọc vi khuẩn diệt trùng.

5) **SSC 20×** (standard saline citrate đậm 20 lần): NaCl 175,3 g, sodium citrate 88,2 g, pha nước cho đủ 1 lít, chỉnh bằng NaOH 0,1N hoặc HCl 0,1N đến pH 7,0. Hấp cao áp diệt trùng.

(SSC 1× là dung dịch NaCl 0,15M với sodium citrate 0,015M).

6) **MgCl₂ 1M**: hòa tan 20,3 g MgCl₂.6H₂O vào 100 ml nước. Lọc khử trùng.

7) **NaOH 10N**: 200 g/500 ml. Bảo quản trong lọ chất dẻo.

8) **DTT (dithiothreitol) 1M**: 3,09 g/20 ml hoặc **DTT 0,5M**: 3,09 g/40 ml. Lọc khử trùng. Chia nhỏ ra ống 0,5 ~ 1 ml bảo quản ở -20 °C.

9) **Nucleotide triphosphate**: chế thành dung dịch bảo tồn 10 ~ 100 mM, pha nước để thành dung dịch có lượng nhiều hơn lượng cần dùng chút ít. Dung dịch này có tính acid nên cần thêm bột Tris-base cho đến pH trung tính bằng cách kiểm tra giấy đo pH. Lấy một phần kiểm tra OD ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại để điều chỉnh nồng độ chính xác. Các nucleotide có bước sóng hấp thụ cực đại như bảng sau:

Base	Bước sóng (nm)	Hệ số hấp thụ quang (của mỗi) mol ε (M ⁻¹ cm ⁻¹) × 10 ⁻³
A	259	15,4
T	253	13,7
G	271	9,1
C	160	7,4
U	162	10,0

Bảo quản ở -20 °C.

10) **TBE 20×**: Tris 121,1 g, Na₃EDTA.3H₂O 8,2 g, boric acid 60 g, pha nước cho đủ 1 lít, pH sẽ khoảng 8,2. Không cần điều chỉnh pH. Lượng trên tương ứng với: 1 M Tris, 20 mM Na₃EDTA và 0,97 M boric acid. Dung dịch này dùng cho điện di gel polyacrylamide.

11) **Howly 20×**: Tris 96,9 g, trisodium acetate 54,4 g, Na₃EDTA.3H₂O 3,7 g. Điều chỉnh pH bằng acetic acid. Hấp cao áp diệt trùng. (Tương đương: 0,8 M Tris-acetate (pH 7,8), 0,4 M sodium acetate, 20 mM EDTA).

12) **Sodium acetate 3M (pH 5,2)**: trisodium acetate 81,62 g, pha vào 200 ml nước. Dung dịch sẽ có độ pH 5,2.

TaiLieu.vn

II. Điện di

Phương pháp điện di trong gel (keo) thường được sử dụng để phân li (phân đoạn) DNA, RNA, oligonucleotide, protein... sau đó có thể dùng để giám biệt (đồng định) và tinh chế các chất đó. Việc phân li các chất dựa trên độ lớn cũng như hình thái của các chất. Thông thường sử dụng gel agarose và gel polyacrylamide nhưng gel agarose cho phép phân li nucleic acid lớn hơn 1 kb, còn gel polyacrylamide thường dùng để phân li các đoạn nucleic acid nhỏ hơn 1 kb. Nguyên lý của việc điện di DNA là khi ở trong điện trường, do tích điện âm nên các phân tử DNA dịch chuyển về phía anode và với tốc độ dịch chuyển của chúng khác nhau phụ thuộc vào khối lượng phân tử. Các đoạn DNA càng lớn thì dịch chuyển càng chậm. Kết quả là từ một điểm chung (lỗ hay "giếng" tải mẫu) các đoạn DNA khác nhau dịch chuyển về một hướng tạo thành một làn (lane), và trên làn đó có các đoạn DNA khác nhau phân bố ở các vị trí (các băng - band) khác nhau tương ứng với độ lớn của chúng. Trong khi đó, các phân tử protein do tích điện bề mặt khác nhau nếu điện di trong gel không gây biến tính thì dịch chuyển theo các hướng khác nhau với tốc độ khác nhau phụ thuộc cả khối lượng phân tử lẫn điện tích bề mặt, nhưng nếu điện di trong gel sau khi xử lý bằng SDS thì do bề mặt protein trở nên tích điện âm đồng nhất nên chúng dịch chuyển về anode với tốc độ khác nhau *hầu như chỉ* phụ thuộc khối lượng phân tử.

1. Điện di agarose

1.1. Chế tác gel agarose

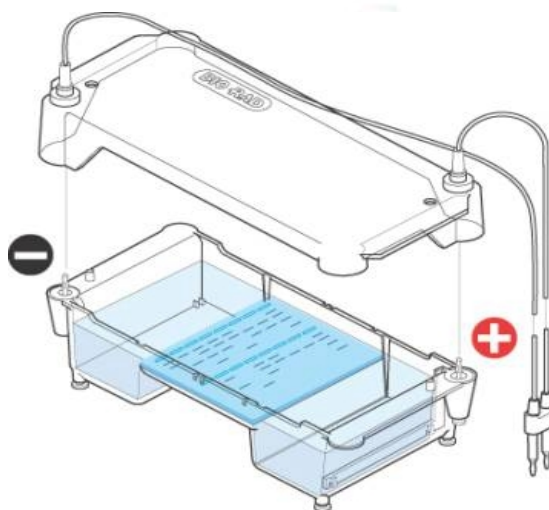
Dưới đây giới thiệu phương pháp chế gel agarose điện di DNA.

1) Cho đủ lượng agarose (Seakem Agarose, Nusieve Agarose...) cần pha vào dung dịch TAE 1× trong một bình tam giác theo bảng dưới đây để có độ phân li nucleic acid thích hợp. Để có dung dịch TAE 1× cần cho thêm 19 lần nước khử ion vào dung dịch gốc TAE 20×.

Nồng độ agarose (%)	Độ lớn DNA phân li (kb)
0,3	60 - 5
0,6	20 - 1
0,7	10 - 0,8
0,9	7 - 0,5
1,2	6 - 0,4
1,5	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

2) Gia nhiệt bằng cách hấp 5 phút trong nồi hấp cao áp ở 115 °C hoặc bằng vi sóng. Chú ý khi dùng lò vi sóng cần quan sát để tránh trào gel ra ngoài, nên chờ đến khi gel sôi thì cắt điện, lấy ra (coi chừng bỏng) lắc đều rồi cho vào làm sôi lần nữa. Lặp lại ba lần cho agarose tan hoàn toàn.

3) Cho vào chậu bảo ôn ~50 °C cho đến khi dịch gel đạt đến khoảng 50 - 60 °C (tay chạm vào được) thì cho vào gel một lượng dung dịch ethidium bromide để có hàm lượng cuối cùng của chất màu này là 50 µg/ml. (Nếu không cho ethidium bromide vào gel lỏng trước khi rót gel vào khuôn thì ngâm bản gel vào dung dịch này sau khi đã điện di).



Hình 1: Cấu tạo của một bể điện di nằm ngang.

Bản gel agarose đã được bổ sung ethidium bromide, sau khi điện di có thể quan sát được các băng DNA nếu đặt chậu trên nguồn UV (chất liệu chế đáy bể thấu qua đối với UV).

Chú ý: Ethidium bromide là chất độc gây ung thư, vì vậy cần tránh tiếp xúc trực tiếp vào cơ thể và phải có nơi đựng chất thải riêng sau khi sử dụng, không được thải ra ngoài môi trường khi chưa được xử lý thích hợp.

4) Rót gel vào khuôn đã được chặn hai đầu bằng băng dán hoặc bằng kẹp, đã cài sẵn lược (comb) và đặt trên mặt phẳng (xác định bằng thủy bình kê, tức ligô).

5) Chờ cho đến khi gel rắn hoàn toàn thì cẩn thận tháo lược ra khỏi gel.

1.2. Điện di agarose

1) Tháo bản gel ra khỏi kẹp hoặc băng chắn, đặt khuôn gel trong chậu điện di ngang, rót dung dịch đệm vào cho ngập gel, chú ý đầu có lỗ lược nằm ở phía cathode.

2) Pha nucleic acid cần điện di với *dung dịch màu tải mẫu (điện di) 6×* hoặc bằng hợp chất màu tương tự. Dịch màu có tỷ trọng cao này giúp nucleic acid không bị xáo động bởi dòng đối lưu của dung dịch nên khi tải vào lỗ răng lược thì nằm gọn trong đó và có màu rõ ràng.

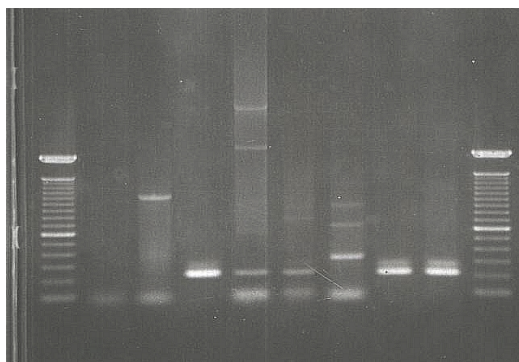
Dung dịch màu tải mẫu 6× (dịch nạp mẫu) chứa 30% glycerol, 0,25% bromophenol blue (BPB) và 0,25% xylencyanol (XC).

3) Bằng micropipet hút mẫu DNA nhỏ vào lỗ răng lược.

4) Bật điện một chiều để thực hiện điện di. Cường độ dòng điện khoảng 50 - 150 V tùy loại thiết bị điện di. Thời gian điện di thay đổi phụ thuộc vào độ lớn của DNA, nồng độ agarose của gel và cường độ dòng điện.

Chú ý lượng DNA có thể điện di trong mỗi lỗ răng lược nhiều ít tùy kích thước răng lược, nếu quá nhiều sẽ xuất hiện hiện tượng "tailing" (kéo đuôi) khó phân li.

1.3. Kiểm tra băng DNA



Hình 2: Kết quả điện di một số đoạn DNA trong gel agarose.

Hai lần hai bên là dấu khối lượng phân tử (DNA molecular marker), mỗi băng (vết sáng) của mỗi lần này cách nhau 100 base pair (bp), băng nhỏ nhất (dưới cùng) "nặng" 100 bp, băng nặng nhất 2.000 bp (giữa 1.000 bp và 2.000 bp không có các băng trung gian). Để ước định khối lượng phân tử lần DNA nào đó thì có thể đặt một thước thẳng lên nó và đóng ngang xem nó tương ứng với băng nào trong lần dấu khối lượng phân tử, trường hợp không trùng khớp thì có thể ước lượng.

1) Nếu điện di DNA trong gel có pha sản phẩm bromide thì cần tia tử

ngoại cũng có thể phát hiện được các băng DNA trong quá trình điện di cũng như sau khi điện di. Kiểu dạng (pattern) các băng phụ thuộc vào thành phần DNA có trong mẫu cần điện di.

2) Nếu không cho trước ethidium bromide thì sau khi điện di cần ngâm gel 30 - 60 phút trong dung dịch thuốc nhuộm này ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

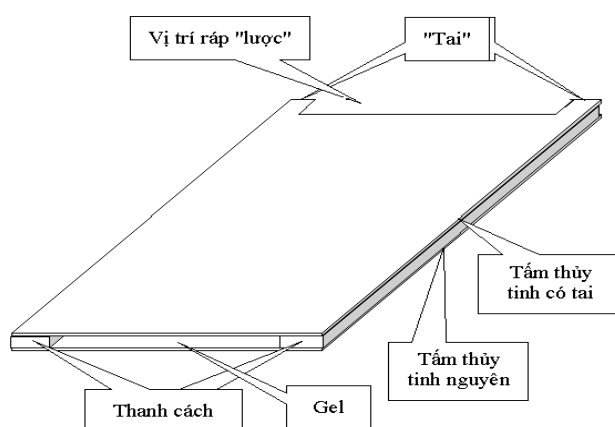
3) Nếu cần chụp ảnh lưu tư liệu thì có thể dùng máy ảnh pollaroid với ống kính có phin lọc ánh sáng thích hợp với film pollaroid 667, hoặc dùng thiết bị phân tích gel số hóa (gel documentation system).

Chú ý: Đèn tử ngoại (UV) có hai loại bức xạ với bước sóng 254 nm (UV sóng ngắn) và 366 nm (UV sóng dài). UV sóng ngắn giúp quan sát rõ DNA nhưng làm tổn hại cấu trúc chất này, cho nên nếu cần thu hồi DNA từ gel thì không nên áp dụng.

2. Điện di polyacrylamide

2.1. Chế gel polyacrylamide

Gel polyacrylamide thường đặt đứng, để chế gel cần sử dụng các tấm thủy tinh có kết cấu chuyên dụng để làm khuôn.



Hình 3: Sơ đồ một mẫu khuôn bản gel polyacrylamide đơn giản.

Trước khi đổ dịch tạo gel cần dán các mép bằng băng keo dán và kẹp chặt (hoặc kẹp trong giá chuyên dụng) cho kín các mép hai bên và đáy.

Về nguyên tắc để phân li DNA (cũng như các chất khác như protein) thường cần bản gel polyacrylamide gồm hai thành phần: gel phân tách (separating gel) có nồng độ tương đối cao và lớp gel tập trung có nồng độ thấp. Gel tập trung (stacking gel) có tác dụng làm nguyên liệu tập trung

tạo nên một băng mẫu vật gọn, mảnh (các thành phần của mẫu nằm sát nhau nên có cùng điểm xuất phát), trước khi chúng đi vào lớp gel phân tách. Tuy nhiên, nhiều khi do lượng mẫu cần điện di rất nhỏ, không cần lớp gel tập trung này. Dưới đây cách chế bản gel chỉ gồm gel polyacrylamide phân tách thường dùng trong điện di DNA.

Khuôn gel thường làm từ hai tấm thủy tinh khác nhau: một tấm hình chữ nhật, tấm khác có kích thước hoàn toàn tương tự nhưng được cắt bớt một phần ở một cạnh trừ hai góc, hai phần chừa lại này làm thành hai "tai" ("rabbit ear"). Phần cắt bớt của tấm kính là nơi ráp "lược" tạo các lỗ tải mẫu và sau đó, trong quá trình điện di, là nơi dung dịch đệm điện di kết nối với gel duy trì dòng điện giữa hai đầu (đầu có tai và đầu đáy) của bản gel.

Để chế gel polyacrylamide phân tách DNA cần thực hiện các bước sau:

1) Rửa sạch các tấm thủy tinh kỹ bằng nước sạch, để khô rồi lau lại bằng ethanol. Ráp các tấm thủy tinh theo hướng dẫn của hãng sản xuất sao cho tạo được khoảng hở giữa hai tấm thủy tinh được bịt kín ba phía để không làm chảy nguyên liệu tạo gel khi rót vào. Trước tiên đặt tấm thủy tinh nguyên, đặt các thanh cách dọc theo mép tấm thủy tinh đó, rồi đặt tấm thủy tinh có "tai" lên trên sao cho các cạnh của hai tấm thủy tinh trùng khít nhau. Trong một số trường hợp, tùy thiết kế, có thể cần dán các mép bên và khe hở đáy bản gel bằng băng keo rồi dùng kẹp để kẹp các tấm thủy tinh (kẹp trước để các tấm thủy tinh ổn định, dán từng cạnh rồi thay kẹp). Tuy nhiên, cũng có thiết kế gài vào khuôn ngoài không cần kẹp.

2) Chế gel theo nồng độ thích hợp cho việc phân tách DNA như trình bày trong bảng sau (pha 100 ml):

Nồng độ gel PA (%) (và DNA có thể phân li)	Dung dịch 30% acrylamide (29+1)* (ml)	Dung dịch 10% ammonium persulfate (ml)	Dung dịch đệm TBE 20× (ml)
4 (100 - 1.000 bp)	13,3	0,5	5
6 (80 - 500 bp)	20	0,5	5
8 (60 - 400 bp)	26,7	0,5	5
12 (40 - 200 bp)	40	0,5	5
16 (10 - 100 bp)	53,3	0,5	5

* Acrylamide 29 g, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide 1 g, thêm nước cất cho đủ 100 ml, bảo quản ở 4 °C được mấy tháng.

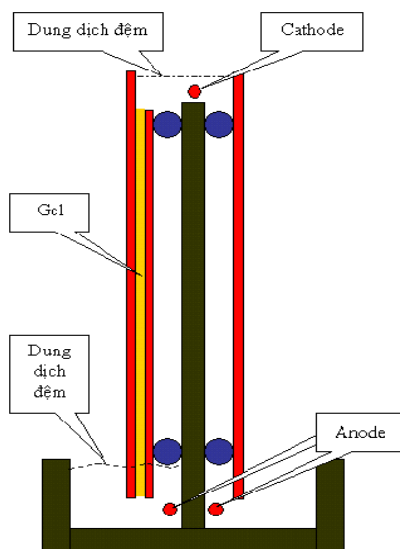
3) Bổ sung vào dung dịch này 15 µl TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine) lắc nhẹ cho đều rồi rót vào giữa khuôn thủy tinh sao cho

không hình thành bọt khí trong gel. Thông thường, nên rót gel từ một mép trong khuôn. Trong quá trình này, nếu bản gel không được cố định trước (như gel dùng cho việc giải trình DNA) thì cần nâng dần miệng bản khuôn gel từ thế nằm ngang lên cao dần để gel không bị chảy ra ngoài còn bọt khí (nếu có) cũng từ từ thoát lên trên mà ra khỏi gel. Bọt khí thường gây biến dạng các băng sản phẩm nhưng điều quan trọng là ôxy làm giảm khả năng polymer hóa của acrylamide. Khi gel lỏng đã đầy khuôn bản gel, cầm lược vào đầu khuôn gel (khoảng giữa hai tai) rồi kẹp chặt (*chú ý chỉ* nên kẹp lược với bản thủy tinh nguyên, không kẹp cả hai tấm thủy tinh để không tạo khe hở giữa gel và hai tấm thủy tinh sau khi bỏ kẹp khỏi khuôn bản gel, do có sự đàn hồi các tấm thủy tinh bị ép vào nhau thẳng trở lại sau khi bỏ kẹp).

Trong trường hợp cần bổ sung lớp gel tập trung ở trên thì khuôn bản gel phải cố định theo đúng phương thẳng đứng (kiểm tra bằng thủy bình kẻ), sau khi rót đủ lượng gel phân tách (chừa lại một khoảng ở trên) cần bổ sung lớp nước cất ở phía trên mà không cần cài lược. Chờ đến khi gel phân tách hóa rắn thì rót bỏ lớp nước này, thay bằng gel tập trung (gel nồng độ thấp) rồi ráp lược lên trên để tạo các lỗ giếng tải mẫu điện di. Thông thường gel cứng trong vòng 30 phút. Tuy nhiên, thời gian hóa rắn của gel tăng khi nhiệt độ hạ cũng như khi nồng độ TEMED và ammonium persulfate tăng.

2.2. Điện di gel polyacrylamide

- 1) Sau khi gel cứng lấy lược ra khỏi khuôn bản gel, tháo khuôn bản gel khỏi khuôn ngoài hoặc kẹp cũng như vật chắn khác sao cho gel có hai đầu (trên và dưới) thông với bên ngoài. Gắn khuôn bản gel vào chậu điện di.
- 2) Gắn điện cực vào chậu điện di sao cho cực âm (cathode) ở trên còn cực dương (anode) ở dưới. *(Các cặp dây dẫn và ổ cắm trên máy có màu tương phản, thường là đỏ và đen; trong khi thực hiện không làm giao chéo).*
- 3) Điện di tiên khởi bằng điện áp 20 V trong 30 - 60 phút.
- 4) Trộn 0,1 - 1 μg DNA với dung dịch màu tải mẫu điện di 6 $\times$, cho vào mỗi lỗ răng lược khoảng 20 μl (với lỗ 0,5 cm).
- 5) Điện di với 100 - 200 V điện một chiều trong khoảng 1 - 3 giờ, có thể quan sát thấy vị trí của dịch màu trong gel để quyết định dừng điện di.



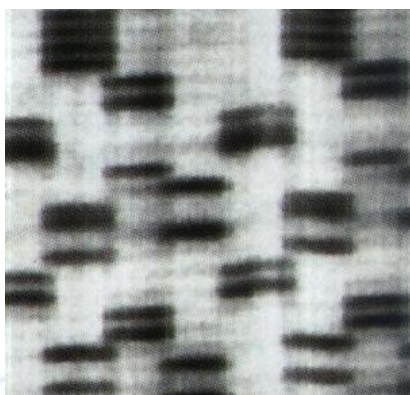
Hình 4: Sơ đồ ráp bản gel vào bể điện di đứng với trường hợp chạy một bản gel.

Bên trái đã ráp gel điện di, bên phải không điện di nhưng cần ráp một tấm thủy tinh để giữ nước cho bể dung dịch đệm ở cathode. Nếu điện di hai gel thì ráp đối xứng.

Bảng dưới chỉ mối quan hệ giữa độ lớn của DNA với dịch màu BPB và XC khi dịch chuyển trong gel agarose. Trong quá trình điện di vết cần theo dõi bằng màu lam dịch chuyển, dừng nguồn điện khi băng này cách mép dưới của bản gel khoảng 0,5 - 1 cm.

Nồng độ gel agarose (%)	BPB (màu lam)	XC (màu lục)
3,5	~100 bp	~460 bp
5,0	65	260
8,0	45	160
12,0	20	70
20	12	45

6) Sau khi điện di tháo gel khỏi khuôn, nhỏ lên bề mặt gel dung dịch ethidium bromide 5 $\mu\text{g/ml}$, để 15 - 30 phút cho ngấm, rửa gel rồi soi UV để quan sát các băng DNA.



Hình 5: Kết quả điện di trong gel polyacrylamide DNA để giải trình.
Các làn có các băng tách biệt là kết quả của quá trình dịch chuyển từ một điểm (giếng tải mẫu) với vận tốc khác nhau phụ thuộc độ lớn của các DNA.

3. Thu hồi đoạn DNA từ gel điện di

Nếu có nhu cầu sử dụng các phân đoạn DNA đã được phân li và tinh chế nhờ điện di cho các thí nghiệm tiếp theo thì thao tác để thu hồi DNA từ gel là cần thiết. Có một số phương pháp thu hồi DNA được trình bày và chúng có những ưu điểm và nhược điểm nhất định như thời gian thao tác, độ phức tạp và tỷ lệ thu hồi, cũng như khả năng lẫn các polymer hòa tan hoặc các chất hỗn tạp có trong gel agarose và gel polyacrylamide làm cản trở đến các phản ứng sẽ thực hiện trong thí nghiệm sau đó.

Phương pháp dùng giấy DEAE cần thời gian ngắn và lượng chất hỗn tạp tương đối ít nhưng từ gel polyacrylamide tỷ lệ thu hồi các đoạn DNA dài hoặc DNA một sợi thường thấp. Phương pháp thu hồi nhờ điện di có thể thực hiện để thu hồi DNA từ gel agarose cũng như polyacrylamide nhưng lượng thu hồi được dưới dạng dung dịch với lượng tương đối lớn cần phải cô đặc, cho nên chất hỗn tạp lẫn nhiều. Hơn nữa, từ gel agarose việc thu hồi thường khó khăn. Phương pháp hồi thu từ agarose tan chảy nhiệt độ thấp có thể thu hồi DNA trong thời gian ngắn thao tác cũng đơn giản, tỷ lệ thu hồi cao không phụ thuộc vào độ lớn của các đoạn DNA nhưng hỗn tạp nhiều.

3.1. Phương pháp sử dụng giấy DEAE (DE 81)

1) Trong khi điện di DNA trong gel agarose (có ethidium bromide trong gel hoặc pha trong dịch đệm điện di), quan sát các băng DNA dưới UV khi thấy băng đó đã phân li hoàn toàn thì dùng dao cắt thành rãnh ở trước và sau băng DNA rồi chèn giấy Whatman DE 81 vào đó.

2) Tiếp tục điện di cho đến khi băng DNA bám hết vào giấy DE 81 thì cắt điện.

3) Lấy giấy DE 81 ra khỏi gel, cho vào ống Eppendorf 0,5 ml đã được chọc thủng ở đáy (hoặc ống bơm tiêm 1 ml) rồi lắp vào trong một ống li tâm lớn hơn (như ống Eppendorf 1,5 ml đối với ống 0,5 ml, hoặc ống li tâm 10 ml đối với bơm tiêm 1 ml) rồi cho vào đó một lượng *dung dịch đệm TAE có 50 mM NaCl*, quay li tâm và lặp lại 3 lần như vậy để rửa sạch.

Dung dịch đệm TAE có 50 mM NaCl chứa Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 50mM (không hòa tan DNA).

4) Thêm 100 μ l TE chứa NaCl 1M, quay li tâm nhẹ rồi để yên cho ngấm đều vào giấy DE khoảng 5 phút, sau đó li tâm lại làm cho dung dịch đệm thoát xuống hết. Lặp lại ba lần để cho DNA thoát hết khỏi giấy DE theo dung dịch đệm.

5) Chiết xuất bằng phenol và bằng chloroform mỗi thứ một lần để loại bỏ tạp chất rồi kết tủa bằng ethanol ba lần mỗi lần đều kết tủa ở nhiệt độ -70°C rồi quay li tâm thu hồi.

3.2. Phương pháp thu hồi bằng điện di

1) Xác nhận các băng DNA (bằng UV với gel đã nhuộm ethidium bromide) rồi cắt băng DNA đích đã hoàn toàn phân li khỏi gel. Cho mẫu gel đó vào túi thẩm tích đã buộc kỹ một đầu, để cho dung dịch đệm ngấm đều rồi kẹp đầu còn lại.

2) Đặt túi thẩm tích vào chậu điện di nằm ngang sao cho hướng điện di vuông góc với túi thẩm tích.

3) Cứ để vậy mà điện di với điện áp 100 - 200 V, soi dưới UV xác nhận băng DNA đã thoát hết ra khỏi gel. Để tăng độ thu hồi cần điện di ngược chiều vài phút (cho DNA đã bám vào túi thoát ngược trở lại dung dịch) rồi mở túi hút hết dịch ra (nhưng cần tránh hút gel) cho vào ống nghiệm, chiết xuất bằng phenol và chloroform rồi kết tủa bằng ethanol để thu hồi DNA.

3.3. Phương pháp chiết xuất DNA từ gel nghiền (từ gel polyacrylamide)

- 1) Xác nhận (bằng UV) vị trí DNA đã phân li cần thu hồi, cắt thu lấy gel.
- 2) Cho mẫu gel vào ống 1 ml, nghiền nát, hoặc cho vào ống Eppendorf rồi dùng đũa thủy tinh nghiền nát.
- 3) Cho gel nát vào ống nghiệm rồi cho vào đó *dung dịch đệm dung xuất* (thường là lượng ngập không quá 2 lần lượng gel, nhiều hay ít tùy nồng độ của DNA trong gel), ủ mấy giờ cho đến qua đêm ở 37 °C (nếu cần, khi lượng nhỏ DNA khó tạo kết tủa thì thêm RNA nấm men đến nồng độ 10 µg/ml).

Dung dịch đệm dung xuất chứa ammonium acetate ở nồng độ 500mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 1mM và SDS 1%.

- 4) Li tâm nhẹ rồi thu lấy nước mặt, dùng cột DEAE cellulose để tinh chế, cô đặc (xem phần sau). Chiết xuất bằng phenol-chloroform rồi chloroform và sau đó kết tủa bằng ethanol để thu hồi DNA.

3.4. Thu hồi từ gel agarose tan chảy nhiệt độ thấp

Gel agarose tan chảy nhiệt độ thấp có nhiệt tan chảy 60 °C và gel hóa ở 30 °C do một số hãng (như BioRad, Takara...) sản xuất và phát mại.

- 1) Chế gel nêu trên bằng cách pha vào dung dịch đệm, làm tan chảy ở khoảng 70 °C, pha ethidium bromide ở khoảng 37 °C rồi đổ bản gel, hạ nhiệt cho gel trở nên cứng.
- 2) Điện di với điện áp thấp để tránh tăng nhiệt độ làm tan chảy gel.
- 3) Soi UV với sự trợ giúp của ethidium bromide, cắt băng DNA đích đã phân li.
- 4) Thêm vào 5 lần TE, ủ ở 65 °C cho gel tan chảy.
- 5) Thêm một lượng tương đương phenol-chloroform, trộn đều rồi quay li tâm thu lấy nước mặt rồi chiết xuất bằng chloroform lần nữa.
- 6) Kết tủa bằng ethanol để thu hồi DNA.

Chú ý: một số hãng đã sản xuất và phát mại kit thu hồi DNA bằng cách nghiền và làm tan gel agarose thông thường. Chẳng hạn "**QIAquick Gel Extraction Kit**" của hãng QIAGEN Co. dùng máy li tâm cỡ nhỏ cao tốc, có thể chiết xuất và làm sạch các đoạn DNA dài từ 70 bp đến 10 kb từ gel (thông thường cũng như nóng chảy thấp) điện di trong dung dịch đệm TAE hoặc TBE. Bộ kit này gồm dung dịch QG (màu vàng), dung dịch PE,

dung dịch đệm EB, ethanol, các cột hấp phụ (QIAquick spin column) và ống chứa 2 ml. Các bước thu hồi DNA như sau.

- 1) Cắt băng DNA khỏi gel bằng một lưỡi dao sắc (trong khi soi dưới đèn UV năng lượng thấp). Bỏ phần gel dư thừa đến mức tối đa.
- 2) Cân lát gel trong ống Eppendorf 1,5 ml (không màu). Thêm vào đó 3 lần thể tích đệm QG (lọ màu vàng của kit).
- 3) Ủ ở 50 °C khoảng 10 phút cho đến khi gel tan hoàn toàn. Thỉnh thoảng trộn xoáy cho gel tan dễ dàng hơn.
- 4) Sau khi gel tan hoàn toàn, kiểm tra màu của dung dịch, màu vàng như màu dung dịch QG nguyên gốc là được. Nếu màu hỗn hợp da cam hoặc tím thì thêm 10 μ l (cho trường hợp 100 mg gel) sodium acetate pH 5,0, màu sẽ chuyển lại sang màu vàng.
- 5) Thêm 1 thể tích isopropanol bằng lượng gel ban đầu vào và trộn đều hỗn hợp giúp tăng khả năng thu hồi DNA nhỏ hơn 500 bp hoặc lớn hơn 4 kb.
- 6) Đặt một QIAquick spin column (cột) vào một ống thu hồi (đều có sẵn).
- 7) Rót hỗn hợp vào cột và quay li tâm 1 phút cho DNA hấp phụ vào cột. *Chú ý* thể tích tối đa của ống chứa là 800 μ l, nếu dịch thừa thì tải lên cột lần nữa rồi lại li tâm thêm 1 phút.
- 8) Bỏ dịch qua cột rồi đặt cột lại vào ống chứa.
- 9) Thêm ethanol (96 - 100%) vào dung dịch PE có sẵn trước khi dùng. Cho 0,75 ml PE này vào cột, để 2 - 5 phút, quay li tâm 1 phút để rửa.
- 10) Bỏ nước thoát qua, lắp cột lại vào ống chứa và li tâm thêm 1 phút ở 10.000 $\times g$ để loại bỏ hoàn toàn ethanol.
- 11) Đặt cột vào một ống li tâm 1,5 ml sạch.
- 12) Để trích li DNA, thêm 50 μ l dung dịch đệm EB (Tris.HCl, 10mM) hoặc nước cất vào giữa cột, hoặc nếu cần tăng nồng độ DNA thì cho 30 μ l dịch dung xuất (elution solution) để yên 1 phút, rồi quay li tâm 1 phút ở tốc độ tối đa (thường 10.000 $\times g$ hay 13.000 v/ph).

Chú ý: dung dịch DNA trong nước cần ở pH 7,0 - 8,0, và dễ bị phân hủy hơn trong dung dịch đệm nên cần bảo quản ở -20 °C. Dùng TE để dung xuất cũng được nhưng EDTA (trong thành phần của TE) có thể gây trở ngại cho các phản ứng enzyme.

Cũng có thể sử dụng Prep-A-Gene DNA Purification System (hãng

BioRad) với những hạt hấp phụ Prep-A-Gene matrix tinh chế DNA từ băng agarose gel thông thường.

TaiLieu.vn