

TS. PHẠM HỒNG SƠN

*Giáo trình*

**KỸ THUẬT CƠ BẢN**

**TRONG**

**SINH HỌC PHÂN TỬ**

Nhà xuất bản **Đại học Huế**  
**2006**

**TS. PHẠM HỒNG SƠN**

*Giáo trình*

**KỸ THUẬT CƠ BẢN  
TRONG SINH HỌC PHÂN TỬ**

**Nhà xuất bản Đại học Huế  
Năm 2006**

## 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 lặp 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 lặp 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 vặn 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 tiệt 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  $\mu$ l ~ 5  $\mu$ l, 1 ~ 20  $\mu$ l, 20 ~ 200  $\mu$ l, 200 ~ 1.000  $\mu$ 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), đặt 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $-70^{\circ}\text{C}$ . 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) **MgCl<sub>2</sub> 1M**: hòa tan 20,3 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 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 <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>
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, Na<sub>3</sub>EDTA.3H<sub>2</sub>O 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 Na<sub>3</sub>EDTA 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, Na<sub>3</sub>EDTA.3H<sub>2</sub>O 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.

## 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

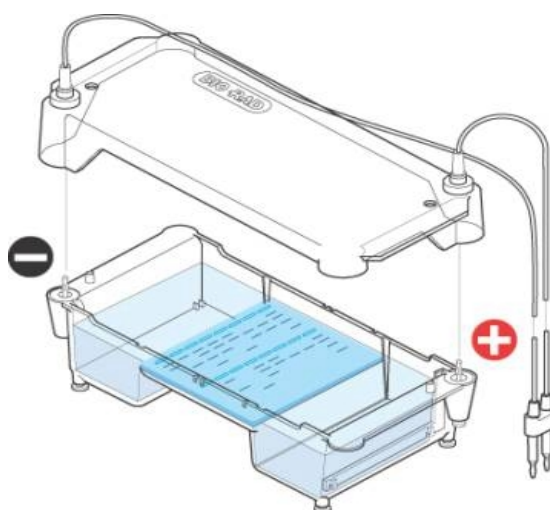
Dưới đây giới thiệu phương pháp chế gel agarose điện di DNA.

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.

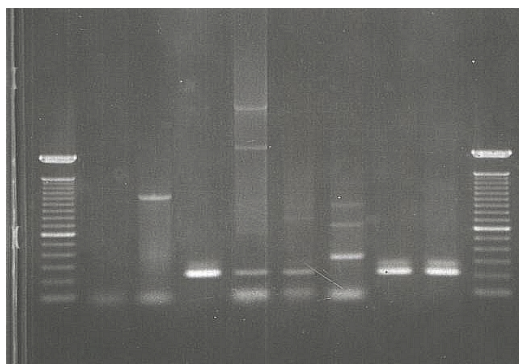
**Dung dịch màu tải mẫu 6×** (dịch nạp mẫu) chứa 30% glycerol, 0,25% bromophenol blue (BPB) và 0,25% xylencyanol (XC).

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 (vệt 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  $\mu\text{g/ml}$ .

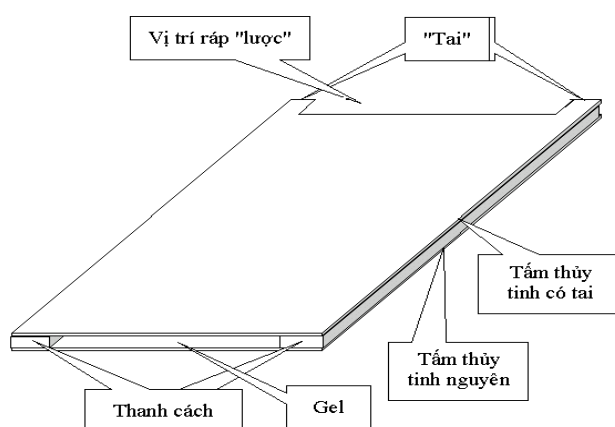
3) Nếu cần chụp ảnh lưu tư liệu thì có thể dùng máy ảnh pollaroid với ống kính có phin lọc ánh sáng thích hợp với film pollaroid 667, hoặc dùng thiết bị phân tích gel số hóa (gel documentation system).

*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

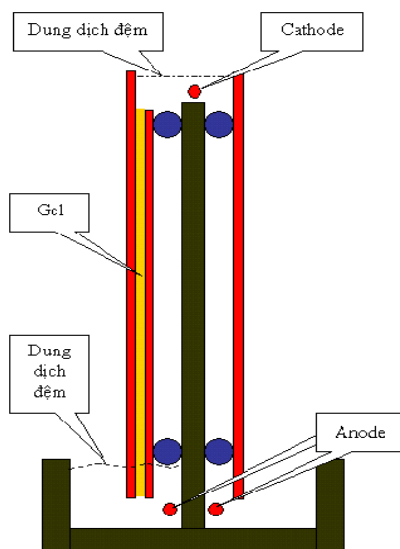
không hình thành bọt khí trong gel. Thông thường, nên rót gel từ một mép trong khuôn. Trong quá trình này, nếu bản gel không được cố định trước (như gel dùng cho việc giải trình DNA) thì cần nâng dần miệng bản khuôn gel từ thế nằm ngang lên cao dần để gel không bị chảy ra ngoài còn bọt khí (nếu có) cũng 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 chấn 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 tiền khởi bằng điện áp 20 V trong 30 - 60 phút.
- 4) Trộn 0,1 - 1  $\mu\text{g}$  DNA với dung dịch màu tải mẫu điện di 6 $\times$ , cho vào mỗi lỗ răng lược khoảng 20  $\mu\text{l}$  (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.





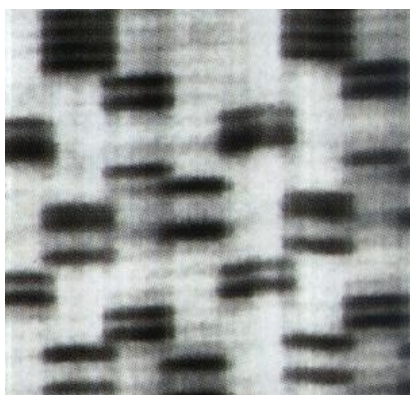
**Hình 4: Sơ đồ ráp bản gel vào bể điện di đứng với trường hợp chạy một bản gel.**

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  $\mu$ 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  $-70^{\circ}\text{C}$  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, MgCl<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l dung dịch đệm EB (Tris.HCl, 10mM) hoặc nước cất vào giữa cột, hoặc nếu cần tăng nồng độ DNA thì cho 30  $\mu$ 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.

### III. Chiết xuất bằng phenol

Trong các phương pháp chiết xuất và tinh chế DNA thì phương pháp chiết xuất bằng phenol và chloroform là những phương pháp cơ bản. Nguyên lý của việc sử dụng phenol trong chiết xuất DNA như sau. Tuy ở nhiệt độ thường phenol ở dạng tinh thể rắn (tan chảy ở 80 °C) nhưng khi lẫn với khoảng 20% nước (v/v) thì phenol ở dạng nhũ tương gồm các phân tử phenol ở giữa với các phân tử nước vây quanh. Khi pha hỗn hợp này vào dịch tế bào, các phân tử phenol có tính kỵ thủy nên có khuynh hướng liên kết vào vùng kỵ thủy của protein ở bên trong cấu trúc của các phân tử này, kết cục làm protein trương phồng lên và lộ xuất nhóm bên kỵ thủy (của gốc amino acid) ra ngoài. Các nhóm kỵ thủy này của protein khi đó kết hợp với nhau tạo thành búi kết tủa gồm nhiều phân tử protein khác nhau. Trong khi đó DNA vẫn tiếp tục là chất tan trong nước và có thể hút sang ống chứa khác.

Thao tác loại bỏ protein, lipid và các chất khác tan trong dung dịch DNA là chiết xuất bằng phenol rồi bằng phenol-chloroform sau đó bằng chloroform hoặc chloroform-isoamyl alcohol (24:1). Sử dụng cả hai loại dung môi hữu cơ thường cho hiệu quả cao nhưng cũng có thể dùng chỉ một loại. Tuy nhiên, nhiều khi cần phải loại bỏ hoàn toàn phenol khỏi dung dịch, khi đó cần phải lặp lại việc chiết xuất bằng chloroform hoặc ether. Phenol có ưu điểm có thể tan trong nước (ở mức độ nhất định) nên không cần khuấy trộn nhiều cũng có thể làm biến tính protein tan trong nước, trong khi đó sử dụng chloroform hay chloroform-isoamyl alcohol thì phải trộn đảo kỹ vì các chất này không tan trong nước. Pha thêm chloroform vào phenol làm tính kỵ thủy của phenol tăng nên làm tăng hiệu quả biến tính protein.

#### 1. Chế phenol

1) Đun nóng (cách thủy) phenol tinh thể đông cứng (loại đặc biệt) ở 68 - 80°C để làm tan chảy. Thêm oxine (8-hydroxyquinoline) ở 0,05 - 0,1% (có tác dụng phòng ngừa ôxy hóa phenol).

2) Thêm lượng khoảng 1/2 ~ 1/3 dung dịch Tris 1M (pH 8,0), trộn đều rồi để yên, loại bỏ lớp nước mặt rồi lặp lại thao tác một lần nữa. Tris có tác dụng làm phenol bão hòa trở nên trung tính. Khi đó, dưới lớp dung dịch đậm là lớp phenol, mỗi lần cần sử dụng phenol thì cho pipet (bịt đầu trên) xuống lớp phenol và hút lượng phenol cần dùng.

3) Bảo quản ở 4 °C, có thể để đến mấy tháng.

## **2. Chiết xuất phenol và chloroform**

1) Thêm vào dung dịch DNA một lượng tương đương phenol hoặc phenol-chloroform.

2) Trộn đều để tạo dạng huyền dịch. Nếu cần chiết xuất DNA phân tử lượng lớn cần tránh trộn mạnh, cần thêm thời gian chiết xuất.

3) Li tâm ở nhiệt độ phòng khoảng 3 phút ở 2.000 v/ph (1.600 ×g) hoặc ít phút với ống Eppendorf ở tốc độ cao.

4) Hút lấy lớp nước (lớp trên nếu nồng độ muối NaCl của dung dịch thấp hơn 1,5M) chuyển sang lọ mới.

5) Nếu cần thì chiết xuất lặp lại với phenol-chloroform và chloroform.

*Chú ý:* Với DNA phân tử lượng thấp nên dùng phương pháp chiết xuất phenol-chloroform và chloroform với NaCl lớn hơn 0,1M vì DNA nhỏ có thể hòa tan trong phenol.



## IV. Cô đặc và thẩm tích nucleic acid

Thông thường trong các trường hợp cô đặc, loại bỏ muối và đổi dịch đệm của nucleic acid (DNA, RNA) người ta vận dụng phương pháp kết tủa bằng ethanol. Tuy nhiên, tùy trường hợp có khi không thể sử dụng được phương pháp này người ta có thể vận dụng phương pháp khác. Khi sử dụng phương pháp kết tủa ethanol nếu thu được sản phẩm chứa nhiều tạp chất (như khi dung xuất DNA từ gel polyacrylamide) người ta phải dùng phương pháp hấp phụ bằng cột nhựa/chất nhồi hấp phụ (thường gọi là "cột cao su hấp phụ" hay "cột chất nhồi hấp phụ", "absorbent resin column") trao đổi ion âm để vừa cô đặc vừa làm sạch DNA.

### 1. Cô đặc

#### 1.1. Kết tủa bằng ethanol

1) Cho 2 đến 2,5 lần ethanol vào dịch DNA có chứa sodium acetate và NaCl nồng độ 0,2M trở lên, trộn đều rồi cho vào buồng lạnh  $-20$  hoặc  $-70$  °C để kết tủa. Có thể thay NaCl bằng sodium phosphate với lượng rất nhỏ cũng có tác dụng gây kết tủa DNA. Tuy nhiên, nếu dùng sodium phosphate thì sau đó cần thẩm tích để loại bỏ muối này.

2) Duy trì nhiệt độ thấp: khoảng 10 - 15 phút ở  $-70$  °C, hoặc khoảng 1 - 12 giờ ở  $-20$  °C.

3) Quay li tâm 15 phút ở 4 °C với tốc độ 15.000 v/ph để tập trung kết tủa. Trước khi li tâm có thể thấy kết tủa trắng trong ống nghiệm, khi đó chỉ cần quay li tâm nhẹ 3.000 v/ph ở 4 °C trong vòng 10 phút cũng đủ để tập trung tủa. Thậm chí có thể dùng móc thủy tinh móc riêng phần tủa DNA dưới dạng sợi trắng khỏi dịch ethanol nếu hàm lượng DNA đủ lớn.

4) Bỏ nước mặt, để loại bỏ muối khỏi tủa cần thêm (khoảng hai lần thể tích mẫu) ethanol 70% vào ống, lại li tâm rót bỏ ethanol. Nếu nhiều DNA thì có thể nhúng móc mang DNA vào lọ chứa ethanol 70% một ít phút, lượng muối trong DNA sẽ giảm.

5) Sấy khô hoặc hong khô ống chứa DNA rồi thêm dung dịch đệm TE hoặc nước cất để có dung dịch DNA với nồng độ thích hợp.

*Chú ý:* Có thể thay thế ethanol bằng isopropanol với lượng nhỏ hơn (lượng tương đương với dịch DNA) khi cần kết tủa DNA trong dịch khá lớn với ống không thể thêm 2,5 lần thể tích ethanol. Tuy nhiên, sau đó nên kết tủa lại với ethanol vì khó làm khô isopropanol, ít hòa tan muối và chỉ

dùng isopropanol khi thật cần thiết (do mùi khó chịu...).

### 1.2. Cô đặc bằng butanol

- 1) Thêm vào dịch DNA một lượng tương đương hoặc hơn chút ít *n*-butanol, trộn đều rồi li tâm nhẹ.
- 2) Hút bỏ butanol rồi thêm vào lượng butanol khác và lặp lại thao tác trên.
- 3) Hút bỏ butanol rồi thêm vào một lượng tương đương ethyl ether so với lượng dịch còn lại.
- 4) Quay li tâm rồi hút bỏ ether (ether sẽ chiết xuất butanol khỏi dịch).
- 5) Loại bỏ vết ether còn lại bằng cách bơm không khí (tốt hơn là khí nitơ) qua ống hút Pasteur vào trong ống nghiệm để làm khô mẫu. Cũng có thể dùng buồng áp suất thấp (buồng chân không) để làm bay hơi ether.
- 6) Hòa tan DNA vào TE hoặc nước cất.

### 1.3. Phương pháp sử dụng cột (DEAE-cellulose column)

- 1) Cột DEAE-cellulose có thể được chế từ ống pippet loại 1 ml hoặc ống hút Pasteur. Trước tiên lấy một ống sạch, nhét vào chỗ thắt của ống một lượng nhỏ bông đã loại dầu mỡ, hấp cao áp tiệt trùng.
- 2) Cho lên lớp bông khoảng 0,2 ml Sephadex 50 đã tiệt trùng, rồi cho lên đó khoảng 0,1 ml DE 52 cũng đã tiệt trùng (hai chất liệu được hòa riêng trong nước rồi hấp cao áp).
- 3) Cho mẫu dịch DNA chảy qua ống để hấp phụ DNA, dịch qua lần đầu được rót cho đi qua cột lần nữa.
- 4) Rửa cột bằng dung dịch đệm với một lượng gấp mấy lần thể tích cột, chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, NaCl 50mM và EDTA 1mM.
- 5) Dung xuất bằng dung dịch đệm nêu trên nhưng với nồng độ NaCl cao hơn, chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, NaCl 1,0M và EDTA 1mM. Kết tủa bằng ethanol.

## 2. Thẩm tích

- 1) Ngâm ống thẩm tích (túi thẩm tích, có thể mua được từ một số hãng) trong nước chứa EDTA khoảng 50mM rồi đun sôi trong 10 phút.
- 2) Thay nước cất mấy lần, khuấy để rửa sạch.
- 3) Để nước cất vậy mà hấp cao áp tiệt trùng 10 phút, rồi bảo quản ở 4 °C. Tuyệt đối không để màng (ống) thẩm tích bị khô nước.

4) Thực hiện thẩm tích. Cho mẫu dịch nguyên liệu vào ống thẩm tích, kẹp chặt hoặc buộc chặt hai đầu, cho vào bình (chậu) chứa khoảng 500 - 1.000 lần thể tích dung dịch đệm. Ngoại dịch này có thể cần phải thay trong trường hợp thẩm tích phenol trong DNA trong khi cần kéo dài thời gian thẩm tích đến 48 giờ. Nếu thẩm tích cesium chloride (CsCl) khỏi DNA plasmid thì chỉ cần khoảng 4 giờ.

## V. Phương pháp định lượng nucleic acid (DNA và RNA)

Trong các thí nghiệm DNA tái tổ hợp thường cần phải biết liều lượng DNA hoặc RNA tham gia phản ứng. Định lượng DNA và RNA có thể dựa vào nguyên lý hóa học và vật lý. Tuy nhiên trong các thí nghiệm công nghệ DNA thì có thể sử dụng nucleic acid đã được tinh chế vừa phải, nghiêm ngặt định lượng là không hoàn toàn cần thiết (sai mấy % không thành vấn đề) và yêu cầu phương pháp trắc định càng đơn giản và càng nhanh càng tốt. Dưới đây trình bày ba phương pháp định lượng nucleic acid thường áp dụng với mục đích nêu trên.

### 1. Phương pháp quang học

Đây là phương pháp lợi dụng tính hấp phụ tử ngoại của nucleic acid và là phương pháp định lượng nhanh DNA và RNA. Nucleic acid chứa các loại base (A, T, G, C, U) có độ hấp phụ cực đại bức xạ có bước sóng gần 260 nm. Các base khác nhau có bước sóng bức xạ hấp thụ cực đại cũng như hệ số hấp thụ quang khác nhau, thậm chí cùng loại base nhưng với pH khác nhau cũng có hệ số hấp thụ khác nhau. Tuy nhiên, bình quân phân tử DNA hai sợi có hệ số hấp thụ  $A_{260} = \sim 20$  có nồng độ 1 mg/ml còn dung dịch có  $A_{260} = 1$  có nồng độ 50  $\mu\text{g/ml}$ , với RNA cũng như DNA một sợi thì  $A_{260} = \sim 33$  có nồng độ 1 mg/ml còn dung dịch có  $A_{260} = 1$  có nồng độ 40  $\mu\text{g/ml}$ . Máy trắc định DNA/RNA có thể được kết nối máy in để ghi lại kết quả đo.

Với phương pháp này có thể định lượng chính xác DNA tinh chế, nhưng do các đường và protein cũng hấp thụ UV nên với DNA chiết xuất từ động vật cũng như từ vi khuẩn có thể xác định sai nồng độ. Ngoài ra, các hợp chất dùng tinh chế DNA (như phenol, mercaptoethanol, EDTA...) cũng hấp thụ UV nên cần chú ý khi định lượng DNA bằng phương pháp này. Đặc biệt phenol có độ hấp thụ UV cao và cũng tan trong nước nên sau khi chiết xuất DNA bằng phenol và kết tủa bằng ethanol rồi hòa tan trong nước thì khả năng phenol hấp thụ UV là rất cao. Vì vậy, *chú ý* xử lý chloroform sau xử lý phenol.

### 2. Phương pháp định lượng bằng điện di

Trong nhiều trường hợp trắc định DNA bằng UV vẫn để lại nỗi lo cho nhà nghiên cứu, khi đó cần điện di một lượng mẫu trong gel agarose hoặc gel polyacrylamide chứa ethidium bromide và quan sát băng DNA dưới UV. Nếu điện di đồng thời với DNA đã biết nồng độ được pha loãng

dần thì có thể xác định được nồng độ DNA cần nghiên cứu. Phương pháp này không chỉ giúp định lượng DNA hay RNA mà còn biết trong DNA có chứa nhiều RNA hay không cũng như các nucleic acid cần nghiên cứu có bị phân giải hay không, làm yên tâm trong quá trình nghiên cứu.

### ***3. Phương pháp nhỏ giọt định lượng nucleic acid***

Trong nhiều trường hợp việc định lượng nucleic acid được thực hiện bằng các phương pháp trên nhưng khi đó phải có nhiều DNA và phải cô đặc lại hoặc khả năng tạp nhiễm nuclease là rất cao. Trong trường hợp tinh chế poly(A)-RNA, lượng nucleic acid có được thường rất ít (dưới 1  $\mu$ g) nên thực hiện định lượng theo các phương pháp trên thường gặp nhiều trở ngại và hao tổn vật liệu. Khi đó có thể dùng phương pháp nhỏ giọt để định lượng nucleic acid. Với phương pháp này có thể nhận ra lượng nucleic acid khoảng 1 ng. Lấy các dung dịch chứa 0,1 - 5 ng nucleic acid có thêm 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide làm dung dịch nucleic acid chuẩn được nhỏ lên tờ giấy bóng mỏng (Saran wrap) đặt trên máy chiếu xạ UV thành nhiều điểm mỗi điểm 3  $\mu$ l. Lại nhỏ 3  $\mu$ l dung dịch nguyên liệu nghiên cứu có chứa ethidium bromide tương tự bên cạnh dãy nucleic acid chuẩn nêu trên. Bật đèn tử ngoại để đối chiếu nồng độ nucleic acid mẫu với nucleic acid chuẩn mà xác định nồng độ mẫu. Sau đó, có thể dùng pipet để hút thu hồi mẫu.

## Chương 2

# KỸ THUẬT CƠ BẢN TRONG TÁI TỔ HỢP DNA

## I. Điều chế DNA plasmid

Trong các thí nghiệm như phân tích gen thường cần lượng lớn plasmid nhưng với các thí nghiệm sàng lọc dòng thuần (clone screening) thì lượng nhỏ plasmid cũng đủ. Vì vậy, tùy vào mục đích thí nghiệm khác nhau mà vận dụng các phương pháp điều chế plasmid khác nhau. Nguyên tắc chung của việc điều chế plasmid trong kỹ thuật tái tổ hợp cũng là nguyên tắc chung của việc điều chế các plasmid có số phiên bản lớn (high-copy plasmids). Tiến trình bao gồm:

- 1) huyền dịch hóa tế bào vi khuẩn trong dung dịch đệm,
- 2) làm tan tế bào trong kiềm mạnh (pH cao, có thể cần xử lý enzyme phân giải protein và peptidoglycan vách tế bào vi khuẩn, đặc biệt vi khuẩn Gram dương),
- 3) hạ pH môi trường về dưới trung tính bằng axit làm cho các protein tế bào biến tính kéo theo DNA nhiễm sắc thể và RNA cùng bị rời lại với nhau thành tủa, còn các DNA plasmid do có cấu trúc siêu xoắn nên không bị kéo vào hỗn hợp không tan đó,
- 4) khử bỏ RNA còn sót bằng RNase và
- 5) tách DNA plasmid tan trong nước khỏi các thành phần không hòa tan bằng li tâm rồi tinh chế như đối với các DNA ngắn (chiết xuất bằng phenol hoặc chloroform, kết tủa bằng isopropyl alcohol, hoặc polyethylene glycol 6000, tức PEG 6000, hoặc ethanol trong muối Na, rửa bỏ muối khỏi DNA bằng ethanol 70%).

## 1. Điều chế lượng nhỏ DNA plasmid

### 1.1. Phương pháp Birnboim

Phương pháp Birnboim chế DNA plasmid còn được gọi là *phương pháp kiềm*. Mô tả dưới đây cho việc điều chế DNA plasmid dòng thuần trong kỹ thuật DNA tái tổ hợp.

- 1) Dùng que cấy hoặc tăm vô trùng lấy vi khuẩn từ khuẩn lạc trắng (của *E. coli* mang plasmid, trên đĩa thạch), cấy vào khoảng 2 - 5 ml *môi trường LB* có chứa chất kháng sinh thích hợp (ví dụ ampicillin, 50 µg/ml đối với

plasmid pGEMT...).

**Môi trường LB** chứa 10 g tryptone, 5 g yeast extract (cao nấm men), 10 g NaCl, hòa tan trong 1 lít nước cất, điều chỉnh pH trung tính bằng NaOH, hấp cao áp tiệt trùng.

2) Bồi dưỡng 6 - 16 giờ ở nhiệt độ 37 °C.

3) Chuyển 1,5 ml sang ống Eppendorf (phần còn lại nên bảo quản ở 4 °C), quay li tâm 3 phút với vận tốc 5.000 v/ph.

4) Thêm 150 µl *dung dịch glucose-lysozyme*, trộn đều, để ở nhiệt độ phòng 5 phút. Để 5 phút ở nhiệt độ phòng hoặc 3 phút ở 37 °C.

**Dung dịch glucose-lysozyme:** glucose 50mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25mM, EDTA 10mM và lysozyme 4 mg/ml.

5) Thêm 200 µl *dung dịch kiểm*. Trộn bằng cách đảo nhẹ ống nghiệm, *chú ý từ bước này trở đi không được lắc mạnh tránh tổn hại DNA*. Để ở nước đá 5 phút.

**Dung dịch kiểm** chứa NaOH 0,2N và SDS 1%.

6) Thêm 150 ml *dung dịch potassium acetate* ở 4 °C, trộn đều, để 5 phút.

**Dung dịch potassium acetate** chứa 60 ml potassium citrate 5M, 11,5 ml acetic acid và 28,5 ml H<sub>2</sub>O.

7) Quay li tâm với vận tốc 12.000 v/ph ở 4 °C trong vòng 15 phút, chuyển nước mặt sang ống mới, bỏ phần cặn.

8) Thêm 400 µl phenol-chloroform, trộn đều, quay li tâm 5 phút với vận tốc 12.000 v/ph.

9) Chuyển phần nước sang ống mới, thêm khoảng 800 µl ethanol, trộn đều rồi để 3 phút ở nhiệt độ phòng.

10) Quay li tâm 12.000 v/ph trong 5 phút, bỏ hết phần dịch lỏng.

11) Rửa phần cặn bằng ethanol 70%, rồi hòa tan phần cặn trong 50 µl TE.

12) Thêm 0,5 µl RNase A nồng độ 1,0 mg/ml (DNase-free), để 1 giờ ở 37 °C.

13) Thêm 30 µl *dung dịch polyethylene glycol-NaCl*, để 1 giờ ở 0 °C.

**Dung dịch polyethylene glycol-NaCl** chứa polyethylene glycol 6000 ở nồng độ 20% và NaCl 2,5M.

14) Li tâm 10 phút với vận tốc 12.000 v/ph. Hút bỏ nước mặt.

15) Rửa kết tủa bằng ethanol 70%, để khô hoàn toàn rồi thêm 50 µl TE.

## 1.2. Phương pháp đun sôi

1) Thực hiện các bước đầu từ 1 đến 4 như trong phương pháp trên (1.1.).

2) Hòa phân cặn (vi khuẩn) trong 200 µl *dung dịch STET*.

**Dung dịch STET** chứa saccharose 8%, Triton X-100 0,5%, EDTA (pH 8,0) 50mM và Tris-HCl (pH 8,0) 10mM.

3) Thêm 20 µl *dung dịch lysozyme*. Trộn đều, để ít phút ở nhiệt độ phòng.

**Dung dịch lysozyme** chứa lysozyme 10 mg/ml, Tris-HCl (pH 8,0) 10mM. Dung dịch lysozyme nên pha mới (*chú ý* hóa chất này bảo quản lạnh, khi lấy ra *cần để cân bằng nhiệt độ với nhiệt độ phòng* rồi mới mở nắp tránh đọng nước vào hóa chất khi còn lạnh), hoặc pha chuẩn bị trước trong dung dịch glycerol 50% rồi bảo quản ở -20 °C cũng tốt.

4) Đun cách thủy 1 phút.

5) Quay li tâm 12.000 v/ph trong 10 phút. Loại bỏ cặn bằng que tăm.

6) Thêm vào nước mặt 200 µl isopropyl alcohol, trộn, để ở nhiệt độ phòng 10 phút.

7) Quay li tâm 12.000 v/ph trong 10 phút ở 4 °C, loại bỏ hết phần nước mặt.

8) Thêm 150 µl dung dịch sodium acetate 0,3M (pH 5,0), hòa đều cho tan rồi cho thêm 300 µl ethanol, trộn đều rồi để 10 phút ở -70 °C hoặc lâu hơn ở -20 °C để kết tủa DNA.

9) Quay li tâm 12.000 v/ph trong 10 phút ở 4 °C, loại bỏ hoàn toàn nước mặt.

10) Tráng cặn bằng ethanol 70%, để khô hoàn toàn rồi hòa vào 50 µl TE.

11) Xử lý RNase A (DNase-free) ở nồng độ cuối là 10 µg/ml.

12) Kết tủa bằng ethanol rồi tráng bằng ethanol 70% và hòa tan trong TE ta có DNA plasmid sạch có thể cắt bằng enzyme hạn chế.

## 2. Điều chế lượng lớn DNA plasmid

### 2.1. Nuôi cấy vi khuẩn

1) Lấy vi khuẩn từ khuẩn lạc trắng bằng que cấy hoặc tăm đã tiệt trùng vào 5 ml môi trường LB có thêm chất kháng sinh thích hợp (penicillin,



chloramphenicol..., tùy thuộc vào loại plasmid vector có mang gen kháng thuốc đối với chất kháng sinh này hay chất kháng sinh khác).

2) Ủ 1 giờ ở 37 °C.

3) Chuyển lứa cấy vi khuẩn trên vào 400 ml môi trường LB, tiếp tục nuôi cấy ở 37 °C cho đến khi  $OD_{600} = \sim 0,8$ .

4) Thêm 2 ml chloramphenicol (dung dịch pha trong ethanol có nồng độ 34 mg/ml, bảo quản ở -20 °C), ủ tiếp khoảng 12 - 20 giờ. Bước gây cảm ứng này có thể không cần thiết đối với nhiều loại plasmid vector.

5) Quay li tâm 5.000 v/ph trong 10 phút để tập trung tế bào. Bỏ nước mặt. Thêm vào cặn 40 ml **dung dịch STE** ở 4 °C, trộn đều tạo huyền dịch tế bào.

**Dung dịch STE** chứa NaCl 0,1M, Tris-HCl (pH 7,8) 10mM và EDTA 1mM.

6) Chuyển sang ống li tâm cỡ 50 ml, quay li tâm 5.000 v/ph trong 10 phút, loại bỏ nước mặt.

## 2.2. Chiết xuất DNA

1) Cho vào (ống đã chuẩn bị ở bước 6) mục trên) 7 ml dung dịch glucose-lysozyme, trộn đều tạo huyền dịch, để ở nhiệt độ phòng 10 phút.

2) Thêm 14 ml dung dịch kiềm (*chứa* NaOH 0,2N và SDS 1%), làm lạnh trên nước đá, vừa trộn đều *nhẹ nhàng* tránh làm đứt DNA, để lạnh 10 phút.

3) Thêm 10,5 ml potassium acetate, trộn đều, để 10 phút trong băng hay nước đá.

4) Quay li tâm 15.000 v/ph trong 20 phút ở 4 °C, rồi chuyển dịch trong sang ống nghiệm 50 ml (Falcon, Corning...).

5) Thêm 0,6 lần isopropyl alcohol, trộn đều, để 10 phút ở nhiệt độ phòng.

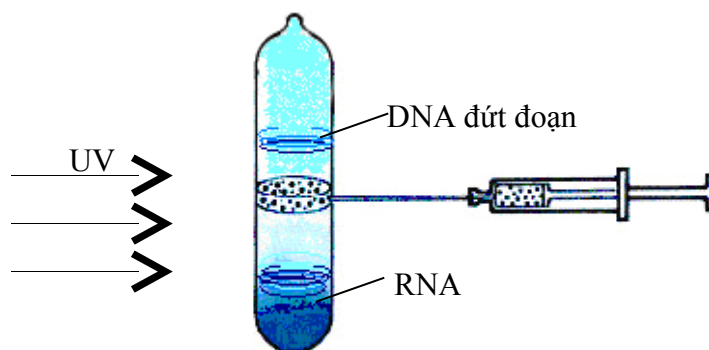
6) Quay li tâm 3.000 v/ph trong 10 phút ở 4 °C, loại bỏ hết phần nước mặt.

7) Rửa cặn bằng ethanol rồi để khô hoàn toàn (có thể dốc ngược ống trên giấy thấm, *chú ý* để hở miệng ống cho thoát khí làm nhanh quá trình bay hơi của ethanol). Không cần làm khô trong chân không vì DNA quá khô sẽ khó hòa tan.

8) Hòa tan vào TE.

### 2.3. Điều chế plasmid bằng li tâm phân đoạn trong mật độ cesium chloride (CsCl)

- 1) Cho 3,7 g CsCl (bột tinh thể) vào 3,5 ml dịch plasmid rồi thêm 0,2 ml ethidium bromide 10 mg/ml. Trộn đều cho CsCl tan hoàn toàn. Lượng này vừa đủ cho rotor máy li tâm siêu tốc.
- 2) Chuyển dịch nêu trên sang ống nhựa chuyên dụng cho máy li tâm siêu tốc, nếu các ống chưa đầy hoàn toàn thì làm đầy ống bằng CsCl hoặc parafin lỏng, kiểm tra khối lượng các ống để đảm bảo rotor có khối lượng cân đối.
- 3) Hàn ống hoặc gài miệng ống theo thiết kế.
- 4) Ráp ống vào rotor máy li tâm, *chú ý* sự cân bằng của rotor. Quay li tâm 55.000 v/ph ở 15 °C trong 15 giờ (dùng rotor RPV 65 T Hitachi, chẳng hạn).
- 5) Tắt máy li tâm. Nhẹ nhàng lấy rotor khỏi máy. Tháo các ống nhựa li tâm khỏi rotor, thông thường trong dịch hình thành hai băng tách biệt thấy được dưới UV (hình 6), băng dưới là DNA plasmid vòng khép kín (closed circular plasmid DNA). Phần dưới đáy tập trung các RNA. Dùng kim tiêm chọc thủng phần trên của ống hàn (hoặc mở nắp ống cài) cho thông khí (không thông khí thì sẽ không thể hút chiết phần dịch phía dưới qua kim tiêm). Giá ống li tâm đó vào kẹp đặt bên cạnh đèn tử ngoại để soi, rồi dùng kim tiêm chọc ngay phần dưới của băng DNA plasmid, hút băng plasmid vào syringe, chú ý tránh hút phần khác, đặc biệt là băng DNA khác (nick) phân bố ở lớp trên. Cho vào ống nghiệm cỡ 30 ml (ống Corex...).



**Hình 6: Phương pháp hút chiết băng DNA plasmid sau khi li tâm trong dịch chênh lệch mật độ cesium chloride.**

*Chú ý* mang găng tay, mặt nạ chống UV trong khi thực hiện, cẩn thận không hút băng bao gồm các DNA đứt đoạn phía trên và RNA phía dưới.

6) Thêm vào một lượng tương đương butanol (hoặc propanol), trộn đều rồi li tâm 3.000 v/ph trong 1 phút butanol (propanol) cùng ethidium bromide sẽ nổi lên trên, hút bỏ lớp này rồi lặp lại 3 - 4 lần để loại bỏ hoàn toàn thuốc nhuộm (hết màu là được).

7) Thẩm tích đôi TE để loại bỏ CsCl.

Nếu *không thẩm tích* có thể áp dụng các bước sau để loại trừ CsCl. Thêm hai lần TE, trộn đều rồi thêm 6 - 8 lần ethanol, quay li tâm 10.000 v/ph 20 phút ở 4 °C, đổ bỏ nước mặt, thẩm cho sạch nước, lại hòa tan trong 500 µl sodium acetate 3M rồi cho thêm ethanol bằng 2 lần thể tích dịch trong ống (1 ml), để 5 phút ở 0 °C, quay li tâm như trên để thu tủa DNA plasmid.

## II. Điều chế DNA phage $\lambda$

Bằng vector cosmid hoặc plasmid có thể sàng lọc và tạo dòng được thư viện bộ gen, hay thư viện genome (genomic library), và thư viện DNA bổ sung (cDNA library), nhưng nhiều trường hợp sử dụng phage vector hệ lambda ( $\lambda$ ) đối với các thư viện genome và cDNA mới. Việc nghiên cứu so sánh cấu tạo bộ gen đích cũng như việc tái tạo dòng thuần (subcloning) đòi hỏi phải điều chế DNA phage. Để điều chế DNA phage với ít tạp chất nhất thiết phải sử dụng phage phát triển tốt (để có phage với hiệu giá (titre) cao). Kết quả việc nuôi cấy phage kém phát triển là do sự phát triển phage và của *E. coli* ký chủ không nhất trí. Lượng phage thu hồi được phụ thuộc nhiều vào tỷ lệ giữa lượng vi khuẩn ký chủ và lượng phage được đưa vào môi trường. Để thu được phage với hiệu giá cao cần bồi dưỡng trong điều kiện tốt nhất.

### 1. Phương pháp xác định hiệu giá phage

Để nuôi cấy thu phage với hiệu giá cao nhất cần biết titre của phage trong dịch dung khuẩn.

1) Trộn 0,1 ml vi khuẩn *E. coli* đã cấy qua đêm với 0,1 ml dịch dung khuẩn của phage đã được pha loãng trong *dung dịch SM* để có nồng độ 100 pfu (plaque-forming unit). Ủ ở 37 °C trong 10 phút.

**Dung dịch SM** chứa 5,8 g NaCl, 2,0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25 ml Tris-HCl 2M (pH 7,5), 5 ml gelatin 2%, thêm nước cất cho đủ 1 lít rồi hấp cao áp tiệt trùng.

2) Sau đó, rót 2,5 ml dịch agar phủ (agar nửa lỏng, top agar) đã làm nguội đến 50 °C. San ra đĩa môi trường LB.

3) Để ở nhiệt độ phòng 15 phút, khi agar phủ hoàn toàn hóa rắn thì ủ ở 37 °C bồi dưỡng qua đêm.

4) Đếm số plaque, tính toán hiệu giá phage của dịch dung khuẩn.

### 2. Điều chế lượng nhỏ DNA phage

Đối với các thí nghiệm như làm bản đồ enzyme hạn chế các dòng thuần của phage đã được sàng lọc thư viện cũng như lai phân tử thì lượng DNA phage cần thiết không nhiều, thường dùng lượng DNA chế từ 5 ml môi trường lỏng. Nếu cần điều chế lượng phage lớn hơn thì tăng số lượng

ống nuôi cấy.

## 2.1. Phương pháp điều chế dịch phage dung khuẩn

1) Dùng tăm (hoặc đầu pipet) vô trùng lấy một plaque duy nhất đã sàng lọc được genomic library hoặc cDNA library khuấy vào 100  $\mu$ l *môi trường SM*.

**Môi trường SM** chứa 5,8 g NaCl, 2,0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25 ml Tris-HCl 2M (pH 7,5), 5 ml gelatin 2%, thêm nước cho đủ 1 lít, hấp cao áp tiệt trùng.

2) Để một giờ ở nhiệt độ phòng.

3) Cho vào 20  $\mu$ l vi khuẩn đã bồi dưỡng qua đêm, để 15 phút ở 37 °C.

4) Thêm 5 ml *môi trường NZYM*, bồi dưỡng qua đêm ở 37 °C. Cuối cùng môi trường trở nên trong mặc dù không hoàn toàn và quan sát thấy các mẫu cận phân giải của vi khuẩn.

**Môi trường NZYM** chứa 10,0 g NZ amine, 5,0 g NaCl, 5,0 g cao nấm men (yeast extract), 2,0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , chế thêm nước cất cho đủ 1 lít, hấp cao áp tiệt trùng.

5) Thêm 100  $\mu$ l chloroform, trộn đảo 15 phút.

6) Quay li tâm 3.000 v/ph trong vòng 10 phút, hút lấy nước mặt (dịch phage dung khuẩn) chuyển qua ống khác.

7) Với phương pháp này có thể thu được phage với hiệu giá cao đến  $10^{10}$  pfu/ml.

## 2.2. Điều chế lượng nhỏ DNA phage

1) Thêm vào dịch phage dung khuẩn (thu được ở 7) mục trên) 5  $\mu$ g/ml DNase I và 5  $\mu$ g/ml RNase A, ủ 30 phút ở 37 °C.

2) Thêm *dung dịch PEG 6000 20% - NaCl 2M* đến mức 10% so với tổng thể tích, trộn rồi để trên nước đá 1 giờ. Polyethylene glycol 6000 gây kết tủa DNA.

**Dung dịch PEG 6000 20% - NaCl 2M** chứa 20% polyethylene glycol 6000 và 2 mol/lít NaCl so với thể tích toàn bộ.

3) Quay li tâm 3.000 v/ph 20 phút ở 4 °C, loại bỏ hoàn toàn nước mặt.

4) Thêm 0,5 ml SM vào cặn, tạo huyền phù rồi chuyển sang ống Eppendorf.

- 5) Quay li tâm 8.000 v/ph trong 2 phút, chuyển lớp mặt sang ống Eppendorf mới.
- 6) Thêm EDTA 10mM và SDS 10mM cho đủ 0,1% mỗi loại, ủ ở 60 - 65 °C trong 15 phút.
- 7) Thực hiện một lần chiết xuất bằng phenol, phenol-chloroform rồi bằng chloroform.
- 8) Kết tủa DNA bằng cách cho thêm vào lớp nước còn lại một lượng tương đương isopropanol, trộn rồi để 10 phút ở -70 °C.
- 9) Quay li tâm 12.000 v/ph trong 5 phút, loại bỏ lớp mặt.
- 10) Tráng cặn DNA bằng ethanol 70%, làm khô.
- 11) Hòa tan vào 50 µl TE hoặc nước cất tiệt trùng ta được dung dịch DNA phage.

### **3. Điều chế lượng lớn DNA phage**

Sau khi có dòng thuần đoạn DNA được xác nhận nhờ lượng nhỏ DNA phage, việc phân tích dòng thuần tiếp sau đó thường cần điều chế lượng lớn DNA phage. Để thu lượng lớn dịch phage dung khuẩn có phương pháp dung giải dịch thể và dung giải trên đĩa (plate lysis). Phương pháp dung giải dịch thể đơn giản và có thể thu được DNA với lượng lớn nhưng nhiều clone không thu được dịch phage dung khuẩn với hiệu giá cao. Phương pháp dung giải trên đĩa mất thời gian nhưng là phương pháp không bị ảnh hưởng bởi tính cá thể của từng clone của phage.

#### **3.1. Phương pháp chế dịch phage dung khuẩn**

##### **3.1.1. Phương pháp nuôi cấy lỏng**

- 1) Cho vào 5 ml *E. coli* đã bồi dưỡng qua đêm 5 ml dịch phage dung khuẩn đã pha loãng bằng SM nồng độ  $1 - 5 \times 10^9$  pfu/ml, ủ ở 37 °C trong 10 phút.
- 2) Thêm 1 lít môi trường NZYM, ủ 1 đêm ở 37 °C.
- 3) Khi xác nhận sự dung khuẩn thì thêm 5 ml chloroform, đảo trộn 10 phút.
- 4) Quay li tâm 5.000 v/ph trong 10 phút, lấy nước mặt.
- 5) Đo hiệu giá của dịch dung khuẩn. Lượng phage  $10^{13}$  pfu chứa khoảng 500 µg DNA.

### 3.1.2. Phương pháp dung giải trên đĩa

- 1) Thêm 0,1 ml SM chứa  $10^5$  -  $10^6$  pfu phage vào 0,1 ml *E. coli* đã bồi dưỡng qua đêm, ủ 10 phút ở 37 °C. Để có lượng phage lớn cần khoảng 10 - 50 đĩa Petri.
- 2) Thêm 2,5 ml top agar (agar mềm) ở 50 °C, trộn rồi san ra các đĩa LB (có mặt ẩm thì tốt hơn).
- 3) Chờ top agar rắn, lật đĩa lại, cho vào túi chất dẻo và ủ ở 37 °C.
- 4) Sau 6 - 7 giờ bắt đầu xuất hiện dung khuẩn. Khi đã thấy dung khuẩn thì cho vào mặt môi trường 5 ml SM, rồi nhỏ lên một số giọt chloroform.
- 5) Khi SM lan hết mặt thạch, đặt đĩa thạch ở 4 °C qua đêm.
- 6) Dùng pipet Pasteur hút hết SM trên mặt thạch. Từ mỗi đĩa có thể thu  $10^{11}$  pfu phage. Có thể thu được nhiều hơn nếu lấy cả top agar nhưng DNA này thường lẫn tạp chất khó thực hiện một số phản ứng như cắt bằng enzyme hạn chế.

### 3.2. Điều chế DNA

- 1) Thêm dung dịch *NaCl* 1M - PEG 6000 10% vào dịch phage dung khuẩn cho đến lượng 10%, làm cho hòa đều.
- 2) Để 1 giờ ở 0 °C.
- 3) Quay li tâm 5.000 v/ph ở 4 °C trong vòng 20 phút. Bỏ nước mặt.
- 4) Thêm vào cặn của 1 lít dịch phage dung khuẩn 5 ml dung dịch chứa Tris-HCl 20mM (pH 7,5) và  $MgSO_4$  10mM, sau đó thêm 50  $\mu$ l DNase I (10 mg/ml), trộn đều.
- 5) Thêm 5 ml chloroform, trộn đảo đều.
- 6) Quay li tâm 8.000 v/ph trong 15 phút ở 15 °C. Hút lấy nước mặt. Từ đây có thể vận dụng một số phương pháp tinh chế DNA. Dưới đây là biến thể có sử dụng máy li tâm siêu tốc (đương nhiên, có thể thay thế bằng các phương pháp khác điều chế DNA mô tả ở trên).
- 7) Cho vào ống li tâm siêu tốc bằng chất dẻo (như Hitachi 13 CN) ba lớp CsCl có nồng độ khác nhau: lớp dưới cùng 1,5 ml chứa 95 g CsCl trong 75 ml SM, lớp tiếp theo 2 ml chứa 67 g CsCl trong 82 ml SM và lớp thứ ba (trên cùng) 2 ml chứa 60 g CsCl trong 85 g SM. Tỷ trọng tương ứng là 1,45, 1,5 và 1,7). Cho 2 ml mẫu DNA phage lên trên lớp thứ ba.
- 8) Quay li tâm 36.000 v/ph trong 60 phút ở 15 °C (với máy Hitachi RPS

40 T chẳng hạn).

9) Băng DNA hình thành giữa ống được thấy rõ khi soi dưới UV. Lấy kim và bơm tiêm hút lớp này.

10) Thăm tích đối 1 lít dung dịch Tris 10mM (pH 7,5) và  $\text{MgSO}_4$  10mM trong 3 giờ.

11) Nếu tổng lượng là 1 ml thì cho vào đó 10  $\mu\text{l}$  SDS 10%, 100  $\mu\text{l}$  NaCl 5M, 500  $\mu\text{l}$  phenol và 500  $\mu\text{l}$  chloroform, trộn đảo từ từ trong 30 phút.

12) Li tâm 3.000 v/ph trong 10 phút. Lấy nước mặt.

13) Thêm 1 ml chloroform, trộn đảo nhẹ trong 30 phút.

14) Li tâm 5 phút 3.000 v/ph.

15) Thêm sodium acetate 3 M với lượng 10% so với mẫu và ethanol gấp hai lần mẫu, để lạnh trên nước đá 10 - 30 phút, quay li tâm thu cặn DNA.

16) Rửa cặn DNA bằng ethanol 70%, để khô.

17) Pha TE hoặc nước cất theo nồng độ mong muốn.



### III. Điều chế DNA tế bào động vật

Để tạo dòng bộ gen (genome) và thực hiện lai (Southern hybridization) DNA động vật cần điều chế DNA động vật có phân tử lượng lớn và ít tạp nhiễm. Nhưng do DNA dài thường dễ bị đứt bởi enzyme phân giải cũng như các tác động cơ giới - vật lý nên khi điều chế phải sử dụng dụng cụ đã tiệt trùng và tránh hút DNA bằng ống hút có đầu lỗ nhỏ cũng như tránh lắc trộn mạnh. Có thể điều chế DNA từ mẫu vật đã được bảo quản nhưng nếu điều chế từ vật liệu tổ chức tươi mới thì tốt hơn. Lượng DNA thu được thường phụ thuộc vào loại tổ chức nhưng thông thường từ mỗi gam tổ chức có thể thu được khoảng 10 mg DNA.

1) Cắt nhỏ tổ chức nguyên liệu bằng kéo đến độ 0,1 g. Nếu tổ chức lẫn máu hoặc lông thì rửa trước bằng *dung dịch TNM*. Trong trường hợp mô ung thư thường lẫn nhiều mô hoại tử thì làm sạch trước là cần thiết. Cần *chú ý* thực hiện trên nước đá hoặc trong phòng lạnh để tránh DNA bị phân giải (kể cả các bước tiếp theo).

**Dung dịch TNM** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 20mM, NaCl 0,1M và MgCl<sub>2</sub> 1,5mM.

2) Cho vào mỗi gam tổ chức 20 ml dung dịch TNM, nghiền nhuyễn (bằng homogenizer, như Porter), quay li tâm 2.000 v/ph trong 5 phút ở 4 °C, thu cặn.

3) Tráng cặn bằng *dung dịch TNE*, đổ bỏ nước mặt. Lại cho 5 ml TNE vào trộn đều thành huyền dịch rồi bổ sung thêm TNE cho đủ 20 ml, trộn đảo đều.

**Dung dịch TNE** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, NaCl 0,1M và EDTA 1mM.

4) Thêm từ từ SDS 10% vừa thêm vừa trộn đảo nhẹ cho đạt mức 0,3% so tổng lượng. Thêm dung dịch proteinase 10 mg/ml cho đạt đến mức 1% so tổng lượng. Ủ 4 giờ đến qua đêm ở 60 °C.

5) Thêm lượng tương đương phenol, trộn đảo nhẹ khoảng 5 giờ đến 1 đêm.

6) Quay li tâm 3.000 v/ph trong 10 phút, dùng pipet có lỗ to hút phần nước, tránh khuấy động phần phenol. Lại chiết xuất bằng phenol một lần và bằng chloroform một lần nữa.

7) Thẩm tích đôi 2 lít TE qua một ngày đêm có thay TE một lần.

- 8) Thêm RNase (DNase-free) 1 mg/ml đến mức 1/50 thể tích, ủ 37 °C trong 1 giờ.
- 9) Thêm lượng tương đương phenol, trộn đảo nhẹ trong 1 giờ.
- 10) Li tâm 3.000 v/ph trong 1 phút, hút lấy lớp nước bằng pipet có lỗ miệng lớn.
- 11) Thẩm tích đối TE qua đệm có thay ngoại dịch như trên.
- 12) Cho DNA thu được vào ống chất dẻo, bảo quản ở 4 °C. Với DNA động vật có thể bảo quản 4 - 5 năm trong điều kiện này.

## IV. Phương pháp đánh dấu DNA

Ban đầu, trong kỹ thuật sinh học phân tử việc đánh dấu DNA và RNA... để có các *mẫu dò* (hay *dò*, probe) dùng để xác nhận sự hiện diện của yếu tố đặc hiệu của sinh vật đích, thường bằng đồng vị phóng xạ nhưng ngày nay các kỹ thuật đánh dấu phi phóng xạ đã phát triển giúp cho việc ứng dụng mẫu dò rộng rãi hơn mà không cần các phòng thí nghiệm chuyên biệt cho riêng kỹ thuật phóng xạ. Dưới đây mô tả kỹ thuật đánh dấu mẫu dò bằng đồng vị phóng xạ và kỹ thuật phi phóng xạ sử dụng digoxigenin 11-dUTP (DIG-dUTP).

Các nucleic acid do chứa gốc phosphate nên có thể đánh dấu bằng nguyên tố đồng vị phóng xạ  $^{32}\text{P}$ . Đại diện được trình bày ở đây là phương pháp đánh dấu các mẫu dò dùng cho Southern hybridization và Northern hybridization, S1 mapping và đánh dấu base để xác định trình tự nucleotide (sequencing).

Các phương pháp lai (hybridization) yêu cầu phải có mẫu dò DNA có năng lực phóng xạ cao. Trong các phương pháp đánh dấu mẫu dò cho Southern hybridization và Northern hybridization có 1) phương pháp nick-translation và 2) phương pháp multiprime. Ngoài ra, phương pháp riboprobe sử dụng SP 6 polymerase (thu được RNA probe) cũng có thể thu được probe có năng lực phóng xạ cao.

*Phương pháp nick-translation* ("dịch khác") là phương pháp dùng DNase I cắt một đầu của đoạn DNA tạo nên vết khác (nick) sau đó dùng DNA polymerase I hoạt động theo hướng từ 5' đến 3' vừa cắt bỏ nucleotide vừa tổng hợp mới đoạn DNA hai sợi. Do trong dịch phản ứng có lẫn các nucleotide đánh dấu  $^{32}\text{P}$  phóng xạ nên có thể tạo được DNA đánh dấu phóng xạ. Nói chung có thể điều chế được mẫu dò có năng lực phóng xạ đến  $10^8 - 10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$ .

*Phương pháp multiprime* ("nhiều mồi") là phương pháp làm tách đôi DNA hai sợi thành DNA một sợi (làm khuôn) bằng cách gia nhiệt rồi hạ nhiệt cấp tốc, sau đó cho các hexanucleotide (random 6-mer) gắn kết bắt cặp (anneal) một cách ngẫu nhiên với DNA khuôn rồi dùng chúng như những mồi (primer) cho đoạn Klenow (DNA-polymerase I fragment, hoặc *Taq* polymerase) tổng hợp kéo dài DNA. Trong quá trình tổng hợp DNA này, do trong thành phần phản ứng có các nucleotide chứa đồng vị phóng xạ  $^{32}\text{P}$  như trên nên có thể tạo được DNA có năng lực phóng xạ. Với phương pháp này có thể tạo được mẫu dò đạt  $10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$ .

Trong *phương pháp đánh dấu đầu mút* người ta loại bỏ gốc phosphate ở đầu mút 5' của DNA sau đó dùng nucleotide kinase của phage T4 chuyển gốc  $\gamma\text{-PO}_4$  của  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  sang đầu 5' của DNA, hoặc phương pháp dùng enzyme hạn chế loại bỏ đầu 5' rồi từ điểm đó dùng enzyme Klenow DNA-polymerase đưa nucleotide phóng xạ vào chỗ đã bị cắt bỏ. Với phương pháp này người ta đánh dấu được đầu 3'.

### 1. Phương pháp nick-translation

1) Cho nước vào các hóa được dưới đây cho đủ 50  $\mu\text{l}$ , trộn đều rồi để 2 giờ ở 16 °C cho phản ứng xảy ra: 0,1  $\mu\text{g}$  DNA, 5  $\mu\text{l}$  *dung dịch nick-translation* 10 $\times$ , 5  $\mu\text{l}$  dNTP khoảng 500  $\mu\text{M}$  các loại (trừ dCTP), 1  $\mu\text{l}$  DNase I (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ), 2  $\mu\text{l}$  DNA-polymerase I của *E. coli* (10 đơn vị), 100  $\mu\text{Ci}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (3.000 Ci/mmol).

**Dung dịch nick-translation 10 $\times$**  chứa Tris-HCl (pH 7,2) 0,5M,  $\text{MgSO}_4$  0,1M, dithiothreitol (DTT) 1mM, albumin huyết thanh bò 500  $\mu\text{g/ml}$ .

2) Thêm 2  $\mu\text{l}$  EDTA 0,5M làm dừng phản ứng, chiết xuất phenol-chloroform 1 lần.

3) Lọc qua gel Sephadex G-50 hoặc Bio-Gel P-60 loại bỏ các nucleotide đánh dấu chưa kết hợp với DNA.

### 2. Phương pháp nhiều môi (multiprime method)

1) Hòa tan DNA khuôn vào nước để đạt nồng độ 10 - 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

2) Đặt ống chứa DNA vào nước sôi 100 °C trong 3 phút rồi cho nhanh vào nước đá để biến tính DNA.

3) Thực hiện phản ứng với những hóa chất dưới đây pha trong nước đến 25  $\mu\text{l}$ , cho phản ứng xảy ra trong 3 giờ đến 1 đêm: 5,0  $\mu\text{l}$  HEPES 1M (pH 6,6), 0,1 mM dNTP (trừ dCTP) các loại (dATP, dTTP và dGTP mỗi loại 100  $\mu\text{M}$ ) pha trong *dung dịch TM*, 1,4  $\mu\text{l}$  random primer, 1,0  $\mu\text{l}$  BSA (10  $\text{mg/ml}$ ), 1 - 5  $\mu\text{l}$  DNA khuôn đã biến tính (10 - 50 ng), 5,0  $\mu\text{l}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (>3.000 Ci/mM, 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) và 2,5 đơn vị enzyme Klenow.

**Dung dịch TM** là dung dịch nước chứa Tris-HCl (pH 8,0) 250mM,  $\text{MgCl}_2$  25mM và 2-mercaptoethanol 50mM.

4) Trong đa số trường hợp có thể sử dụng dịch phản ứng này làm mẫu dò, nhưng nếu cần loại bỏ nucleotide chưa phản ứng thì dùng cột Sephadex G-50 hoặc những loại cột sắc ký tương tự.

### 3. Đánh dấu đầu mút

#### 3.1. Đánh dấu đầu 5'

##### 3.1.1. Loại bỏ gốc phosphate đầu 5'

1) Hòa tan DNA khuôn (khoảng 5 pmol) vào 45  $\mu$ l nước, rồi trộn với các hợp chất dưới đây, để cho phản ứng xảy ra trong 1 giờ ở 37 °C: Dung dịch DNA khuôn 45  $\mu$ l, dung dịch đệm cho *dung dịch CIP* 10 $\times$  5  $\mu$ l, CIP (phosphatase kiềm ruột bê - calf intestine alkaline phosphatase) hoặc BAP (bacterial alkaline phosphatase) 20 đơn vị.

**Dung dịch CIP 10 $\times$**  chứa Tris-HCl (pH 9,0) 0,5M, MgCl<sub>2</sub> 10mM, ZnCl<sub>2</sub> 1mM và spermidine 10mM.

2) Chiết xuất bằng phenol-chloroform. Hút lấy phần nước.

3) Cho thêm vào phần nước một lượng NaCl 5M bằng 1/10 so với nước, kết tủa bằng ethanol.

##### 3.1.2. Đánh dấu

Hòa tan DNA đã loại bỏ phosphate đầu 5' rồi thêm vào đó các hóa chất sau: 40  $\mu$ l dung dịch DNA, 5  $\mu$ l *dung dịch đệm kinase* 10 $\times$ , 5  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3.000 Ci/mmol) (50  $\mu$ Ci) và 10 đơn vị T4 polynucleotide kinase (Takara, BioRad...).

Cho phản ứng ở 37 °C qua đêm.

**Dung dịch đệm kinase 10 $\times$**  chứa Tris-HCl (pH 7,5) 0,5M, MgCl<sub>2</sub> 0,1M, DTT 50mM, spermidine 1mM và EDTA 1mM.

#### 3.2. Đánh dấu đầu 3'

1) Hòa tan đoạn DNA (~5 pmol) vào 21  $\mu$ l nước, rồi thêm các hóa chất sau đây: dung dịch DNA 21  $\mu$ l, dung dịch đệm Klenow 10 $\times$  3  $\mu$ l, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP 5  $\mu$ l, các loại dNTP (trừ dCTP, mỗi loại 1 mM) 1  $\mu$ l, enzyme Klenow 2 đơn vị.

2) Để phản ứng ở 25 °C trong một đêm.

### 4. Lọc gel

#### 4.1. Sephadex

1) Khuấy 3 g Sephadex G-50 vào 100 ml TNE, hấp cao áp tiệt trùng, bảo quản ở tủ lạnh.

2) Lấy một đầu tip pipet Gilson Pipetman P-1000 (hoặc tương đương)

hoặc ống hút Pasteur, nút bông đã loại dầu mỡ và tiệt trùng vào phần thắt của ống. *Chú ý* không nút quá lỏng hoặc quá chặt tránh chảy gel cũng như tắc dòng chảy.

3) Cho vào đó 1 ml Sephadex G-50, sau đó rót 2 ml TNE để rửa cột.

4) Tải dung dịch DNA (khoảng 25 - 50  $\mu$ l) lên trong cột, sau đó cho từ từ dung dịch TNE (50  $\mu$ l) để dung xuất, lấy vào mỗi ống Eppendorf thu mẫu 0,1 ml.

5) Dùng máy đo phóng xạ (scintillation counter) trắc định quang Cerenkov. Đỉnh dung xuất sớm nhất là ở những phân đoạn chứa DNA đã được đánh dấu.

#### 4.2. Phương pháp spin column (cột li tâm) (bằng Bio-Gel P-60)

1) Ngâm 1 g Bio-Gel P-60 (BioRad 100 - 200 mesh) trong 10 ml TE, hấp cao áp tiệt trùng (trong một ống nghiệm 30 hoặc 50 ml). Sau khi hấp cao áp tiệt trùng, lấy ra kiểm tra huyền phù. Bổ sung TE đã tiệt trùng vào ống sao cho cuối cùng lượng Bio-Gel ở lớp dưới bằng lượng TE ở lớp trên, trộn đều trước khi tải cột.

2) Lấy một ống Eppendorf 0,5 ml dùng kim tiêm cỡ 22 chọc một lỗ ở đáy sâu đến nửa phần nghiêng vát của đầu kim. Cho vào ống này 0,3 ml Bio-Gel đã huyền phù hóa trong TE. Lượng gel sẽ là 150  $\mu$ l. Đặt ống 0,5 ml chứa gel này vào ống Eppendorf 1,5 ml. Đặt ống này vào rotor doãng góc (swing-out rotor), quay li tâm 1.000 v/ph trong 1 phút để loại bỏ TE trong gel, đổ bỏ TE trong ống 1,5 ml. Quay li tâm lần nữa để loại bỏ hết TE.

3) Tải 50  $\mu$ l dung dịch DNA đã đánh dấu lên trên Bio-Gel, quay li tâm 750 v/ph trong 1 phút. Thu hồi DNA đã đánh dấu vào ống 1,5 ml. Các nucleotide đánh dấu chưa liên kết lưu lại trong gel.

*Chú ý:* Ngày nay có nhiều kit đánh dấu DNA (RNA) rất hiệu quả và nhanh chóng. Chẳng hạn, **kit AlkPhos Direct** của hãng Amersham Life Science, có thao tác như sau:

1) Hòa tan 20  $\mu$ l dung dịch gắn kết (cross-linker solution) với 80  $\mu$ l nước kèm trong kit để có dung dịch ở nồng độ làm việc.

2) Hòa tan DNA (hoặc RNA) cần đánh dấu đến nồng độ 10 ng/ $\mu$ l với nước kèm trong kit.

3) Cho 10  $\mu$ l mẫu DNA đã pha loãng trên vào một ống li tâm và biến tính DNA trong 5 phút trong nồi nước đang sôi mạnh.

- 4) Làm lạnh cấp tốc DNA trên băng. Li tâm nhẹ cho hỗn hợp xuống đáy của ống (không dính thành ống).
- 5) Thêm 10  $\mu$ l đệm phản ứng (reaction buffer) vào DNA lạnh. Trộn nhẹ nhàng cho kỹ.
- 6) Thêm 2  $\mu$ l chất đánh dấu (labelling reagent), trộn kỹ.
- 7) Thêm 10  $\mu$ l dung dịch gắn kết ở nồng độ làm việc (mục 1)). Trộn kỹ, Quay li tâm nhẹ để tập trung hỗn hợp.
- 8) Ủ phản ứng ở 37 °C trong 30 phút.
- 9) Mẫu dò có thể sử dụng ngay hoặc giữ trên băng 2 giờ. Nếu bảo quản lâu cần pha vào glycerol 50% và giữ ở -15 ~ -30 °C.

### **5. Phương pháp đánh dấu mẫu dò bằng digoxigenin**

#### **5.1. Đánh dấu bằng digoxigenin nhờ phương pháp nhiều mồi**

- 1) Đặt một ống Eppendorf 1,5 ml đã tiệt trùng lên trên nước đá (băng), cho lượng DNA cần làm khuôn (10 - 3000 ng DNA) và thêm nước cất cho đủ 10  $\mu$ l.
- 2) Nhúng ống DNA khuôn nêu trên vào nước đang sôi trong 3 phút để biến tính DNA. Đưa nhanh vào nước đá. Quay li tâm khoảng 5 giây để tập trung các thành phần ngưng đọng trên thành ống (spin-down).
- 3) Đặt ống trở lại nước đá và thêm 2  $\mu$ l *hỗn hợp hexanucleotide (hexanucleotide mixture) 10 $\times$*  và thêm 2  $\mu$ l *hỗn hợp gắn digoxigenin (digoxigenin labeling mixture) 10 $\times$* .

**Hỗn hợp hexanucleotide 10 $\times$**  chứa 500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mg/ml albumin huyết thanh bê (BSA).

**Hỗn hợp gắn digoxigenin 10 $\times$**  chứa 1 mM mỗi loại dATP, dCTP và dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM digoxigenin-11-dUTP (Roche Molecular Biochemicals), điều chỉnh pH đến 7,5 và cất ở -20 °C.

- 4) Thêm nước cất cho đủ 19  $\mu$ l.
- 5) Trộn bằng cách xoáy trộn nhẹ rồi spin-down.
- 6) Thêm 1  $\mu$ l enzyme Klenow (2 U/ $\mu$ l, trộn đều bằng cách hút nhả một số lần để bắt đầu phản ứng đánh dấu.
- 7) Ủ ở 37 °C trong 2 giờ đến qua đêm.
- 8) Dừng phản ứng bằng cách thêm 1  $\mu$ l EDTA 0,5 M pH 8,5. Bảo quản ở -20 °C. Không cần làm sạch các thành phần phản ứng. Có thể cất mấy năm ở điều kiện này.

## 5.2. Đánh dấu bằng digoxigenin nhờ PCR

Các deoxynucleotide gắn digoxigenin, như digoxigenin 11-dUTP có thể được enzyme *Taq* polymerase sử dụng như một cơ chất phản ứng trong PCR (xem mục "PCR"). Phương pháp này vừa có tính đặc hiệu cao vừa sản xuất mẫu dò với hiệu suất lớn. Độ nhạy của các mẫu dò này trong nhiều ứng dụng khác nhau đều cao hơn các phương pháp đánh dấu khác. Tuy vậy, hiệu suất PCR giảm khi có mặt của cơ chất gắn digoxigenin, vì vậy cần đưa DIG-dUTP vào hỗn hợp phản ứng ở một tỷ lệ hợp lý so với lượng dTTP (thường 1:2 đến 1:6). Nếu phản ứng không cần mẫu dò với độ nhạy cao (như sàng lọc thư viện, lai khuẩn lạc và lai Southern) thì có thể giảm thấp lượng DIG-dUTP (đến 1:9).

Vật liệu cần thiết: *Taq* polymerase, DNA khuôn (template DNA), cặp mồi (primers), dung dịch tồn trữ dATP, dCTP, dGTP và hỗn hợp dTTP với DIG-dUTP.

1) Đặt một ống 0,5 ml trong nước đá và cho lần lượt vào đó các thành phần được tính sẵn ứng với nhu cầu như trình bày ở bảng dưới đây.

Hóa chất	Phản ứng 50 $\mu$ l	Phản ứng 100 $\mu$ l	Nồng độ cuối
Dung dịch đệm PCR 10 $\times$	5	10	1 $\times$
dNTP (-dTTP) 50 $\times$	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l	200 $\mu$ M mỗi loại
Hỗn hợp DIG-dUTP + dTTP 5 $\times$	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	200 $\mu$ M (toàn bộ)
Primer xuôi	0,3-2,5 $\mu$ l	0,5-5,0 $\mu$ l	0,1-1,0 $\mu$ M
Primer ngược	0,3-2,5 $\mu$ l	0,5-5,0 $\mu$ l	0,1-1,0 $\mu$ M
DNA eukaryote (100 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	100 ng
DNA prokaryote (10 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	10 ng
<i>Taq</i> polymerase (1 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 U/100 $\mu$ l
Nước	q.s. 50 $\mu$ l	q.s. 100 $\mu$ l	

Dùng pipet hút trộn một số lần. Chú ý không trộn đảo vì *Taq* polymerase nhạy cảm với sức xoáy.

2) Thêm 25  $\mu$ l dầu khoáng (mineral oil) vào mỗi ống. (Cắt bớt đầu côn màu vàng sẽ dễ lấy dầu hơn). Quay li tâm 5 phút. Với các máy luân nhiệt thế hệ mới thiết kế đốt nóng từ nắp máy thì không cần dầu khoáng vì không có hiện tượng ngưng tụ nước trên thành ống như các máy luân nhiệt đốt nóng từ đáy ống. Li tâm nhẹ để tập trung dịch phản ứng.

3) Thực hiện phản ứng PCR như thông thường trong khoảng 30 - 35 chu kỳ luân nhiệt. Chú ý sau chu kỳ cuối nên để nhiệt độ 72 °C trong 5 phút cho phản ứng tổng hợp DNA diễn ra tốt hơn.



***Không cần*** loại bỏ các thành phần chưa phản ứng.

5) Xác định nồng độ của DIG-dUTP bằng cách sử dụng một pha loãng mẫu dò vừa được điều chế bên cạnh mẫu dò DIG-dUTP chuẩn, nhò lên màng (nylon hoặc nitrocellulose), cố định bằng cách chiếu tử ngoại (UV-crosslinking, hãng BioRad...), ngâm rửa (bằng ***dung dịch A***), phong bế bề mặt chưa tiếp xúc (bằng ***dung dịch B***: blocking buffer), cho tiếp xúc với kháng thể (conjugate) đặc hiệu DIG, rửa bỏ các yếu tố không phản ứng và ngâm trong dung dịch phát hiện (bằng detection buffer), hiện màu (cả mẫu thử lẫn mẫu chuẩn) để ước tính nồng độ. Bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Dung dịch A** chứa 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl và 3% Tween-20 (v/v). Khử trùng bằng lọc. Cất ở  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Dung dịch B** chứa 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl và 1% w/v hóa chất phong bế (blocking reagent - Roche Molecular Biochemicals #1096 176). Trước tiên trộn hai chất đầu, chỉnh pH đến 7,5 bằng NaOH 0,1N. Hấp cao áp tiệt trùng. Chờ nguội thì cho thêm blocking reagent 10×. Bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$ .

## V. Điều chế RNA

Việc điều chế RNA từ tổ chức hoặc từ lúa cấy tế bào động vật là những thao tác không thể thiếu đối với Northern blot hybridization và chế tác thư viện DNA bổ sung (cDNA library). Tuy nhiên, do RNA rất dễ bị RNase phân giải nên cần có những chú ý hơn so với điều chế DNA. Các chất ức chế RNase thai người cũng như các loại chất ức chế như tổ hợp vanadyl (vanadyl complex) không hoàn toàn ức chế được tác dụng của RNase. Do đó, điểm cần chú ý khi điều chế RNA là sau khi trích xuất tổ chức cần phải cho thêm guanidine thiocyanate và phenol vào ngay để làm biến tính RNase không để cho RNase có thời gian kịp tác dụng. Trong trường hợp mẫu được bảo quản đông lạnh cũng cần cắt tổ chức thành các mảnh khoảng 1 g và cho vào nitơ lỏng để đông kết rồi bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$ . Để tránh RNase gây nhiễm vào tay và dụng cụ phải chú ý đeo găng tay (loại dùng một lần, nếu nghi nhiễm cần thay ngay), dụng cụ thủy tinh cần nung ở  $200^{\circ}\text{C}$  trong 4 giờ, những dụng cụ khác không thể xử lý nhiệt được thì ngâm vào dung dịch nước oxy già ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 5% rồi rửa sạch bằng nước cất hoặc là ngâm một đêm trong dung dịch diethyl pyrocarbonate (ethoxyformic anhydride) 0,1% qua đêm rồi hấp cao áp tiệt trùng. Các dịch không thể hấp cao áp thì lọc qua lọc 0,22 hoặc 0,45  $\mu\text{m}$ . Trong ngày làm việc điều chế RNA cần chú ý không làm những thí nghiệm khác để tránh ô nhiễm RNase.

### 1. Phương pháp guanidine thiocyanate

1) Nghiền lúa khoảng 1 - 3 g tổ chức hoặc  $2 - 4 \times 10^8$  tế bào lúa cấy trong dung dịch *guanidine thiocyanate* 5,5M (GTC 5,5M). Nếu là lúa cấy tế bào đơn lớp thì rửa bằng *dung dịch PBS(-)* một số lần rồi cho GTC 5,5M trực tiếp vào đĩa Petri có lúa cấy. Chỉ cần trộn kỹ là có thể làm vỡ tế bào. Nếu tổ chức là gan chỉ cần dùng nghiền cối thủy tinh (Teflon glass) cũng có thể nghiền nát dễ dàng, nhưng tổ chức là cơ thì nếu không sử dụng máy nghiền Polytron thì khó nghiền nát. Dù trường hợp nào đi nữa thì cũng cần làm nhanh.

**Dung dịch guanidine thiocyanate 5,5M** (GTC 5,5M) chứa GTC 5,5M, sodium citrate 15mM và sarkosyl 0,5%, điều chỉnh pH bằng NaOH đến 7,0 rồi lọc qua lọc, trước khi dùng cho thêm 2-mercaptoethanol cho đạt đến 0,2 M. (*Chú ý nếu lượng GTC 5,5M ít hơn tổ chức thì có thể tỷ lệ thu hồi RNA giảm*).

**Dung dịch PBS(-)** (dung dịch muối đệm phosphate) được

chế bằng cách hòa tan 8,0 g (0,137 M) NaCl, 0,2 g (2,68 mM) KCl, 0,2 g (1,47 mM)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và 0,2 g (8,06 mM)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  vào 1 lít nước cất, hấp cao áp tiệt trùng.

2) Cho dịch nghiền vào syringe 50 ml có gắn kim tiêm cỡ 18, bơm cho dịch nghiền đi qua làm cắt đứt DNA một cách cơ giới, làm giảm độ nhớt của dịch. (Có thể dùng hai bơm tiêm đầu nối qua một kim hai gốc để bơm từ bơm tiêm này sang bơm tiêm khác và ngược lại nhiều lần).

3) Cho *dung dịch CsTFA-EDTA 0,1M* (tỷ trọng 1,51) vào ống li tâm siêu tốc (RPS-25 hoặc RPS-27 của Hitachi, chẳng hạn) đã tiệt trùng bằng hấp cao áp cho đến nửa ống, tải mẫu nguyên liệu lên rồi quay li tâm 23.000 v/ph ở 15 °C trong 24 giờ, RNA sẽ đọng ở đáy ống còn DNA và protein còn lại trong dung dịch.

**Dung dịch CsTFA-EDTA 0,1M** gồm CsTFA (cesium trifluoroacetate) và dung dịch EDTA (pH 8,0) 0,25M, thêm nước cho đến tỷ trọng 1,51.

4) Dùng pipet đầu dài hút bỏ hết lớp dịch chứa DNA, protein... ở trên. Nếu ở dưới còn sót lớp CsTFA thì lộn ngược để bỏ hết phần dịch. Đặt ngược ống lên giấy thấm hay khăn giấy 5 phút cho chảy hết dịch. Lấy giấy thấm (Kimwipe) lau nhẹ phần trong lòng ống cho hoàn toàn hết dịch sót trong thành ống. Lật ống lại khi không còn thấy dòng dịch chảy ngược về đáy ống.

5) Hòa tan cặn (RNA) trong 4 ml *GTC 4M* (GTC 5,5M pha với nước cất cho được GTC 4M). Nên cho GTC từ từ, mỗi lần 1 ml, rồi chuyển qua ống mới (Falcon 2059 chẳng hạn, cho tiện li tâm). RNA trở nên ngưng tụ và khó hòa tan nhưng sau khi hút chuyển nếu trộn xoáy mạnh sẽ tan. Quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 phút để loại bỏ tạp chất, hút lấy dịch mặt cho sang ống mới. Cho vào dịch này 100  $\mu\text{l}$  citric acid 1M (đã qua lọc) rồi thêm 3 ml ethanol, để ở -20 °C trong 3 giờ.

6) Quay li tâm 10.000 v/ph trong 20 phút, đổ bỏ nước mặt. Hòa tan cặn trong 3 ml TE, lại quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 phút hút lấy nước mặt chuyển sang ống khác (loại bỏ tạp chất). Thêm vào nước mặt 0,3 ml NaCl 2M và 6 ml ethanol, rồi để kết tủa ở -20 °C.

## 2. Phương pháp phenol nóng

Để thực hiện lại Northern và tạo thư viện cDNA... phương pháp guanidine thiocyanate nêu trên giúp điều chế được lượng lớn RNA thuần khiết cao (ít tạp chất) là rất cần thiết, nhưng trong trường hợp có một lượng nhỏ tế bào và phải điều chế đồng thời nhiều loại RNA thì phương

pháp phenol nóng (hot phenol method) là rất tiện lợi.

- 1) Cạo lúa cấy tế bào từ 2 - 3 đĩa Petri nuôi cấy, cho vào ống rồi rửa bằng dung dịch TNE, sau đó huyền phù hóa trong TNE.
- 2) Thêm vào 0,5 ml SDS 10%, cho phenol đã làm nóng đến 65 °C rồi để ở 65 °C trong 15 phút thỉnh thoảng khuấy mạnh, sau đó đảo trộn ở nhiệt độ phòng thêm 10 phút.
- 3) Quay li tâm 3.000 v/ph trong 10 phút, lấy phần nước.
- 4) Chiết xuất bằng phenol 2 lần, bằng chloroform 1 lần, kết tủa bằng ethanol.
- 5) Hòa tan tủa trong 300 µl dung dịch chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM và  $MgCl_2$  10mM.
- 6) Thêm vào 140 đơn vị DNase (RNase-free, hãng Takara, BioRad...), để phản ứng ở 4 °C trong 3 giờ.
- 7) Chiết xuất bằng phenol-chloroform (1:1), kết tủa bằng ethanol, tráng bằng ethanol 70% rồi pha TE để có nồng độ thích hợp.

## VI. Chế thư viện DNA bổ sung (cDNA library)

Việc chế thư viện cDNA (DNA bổ sung, hay DNA tương bổ) khác nhau phụ thuộc vào nhiều yếu tố: mục đích chế, nguồn mRNA từ loại tế bào và tổ chức gì, loại vector sử dụng và phương pháp chế tác. Việc sử dụng tế bào tổ chức có nhiều mRNA đích là đương nhiên, trong trường hợp tế bào tổ chức chỉ chứa ít mRNA đích thì việc phân đoạn theo phân tử lượng trong mật độ đường và việc gây cảm ứng tế bào bằng hormone hoặc hóa chất là việc cần thiết. Do đó, khác với thư viện bộ gen (genomic library) trong nhiều trường hợp không thể sử dụng những thư viện cDNA do người khác chế tác cũng như thư viện cDNA được bán ở thị trường (giữa các phòng hay cơ quan nghiên cứu).

Việc sàng lọc cũng khác biệt phụ thuộc vào loại vector được sử dụng. Có thể lấy DNA làm mẫu dò. Trong trường hợp chế tác mẫu dò DNA tổng hợp cần dựa vào trình tự amino acid của protein đã biết hoặc đã có sẵn mẫu dò DNA có độ tương đồng cao (với trình tự nucleotide mục tiêu) và lai chắc chắn với cDNA đích... Với những trường hợp như vậy, các phage vector như  $\lambda$ gt 10,  $\lambda$ gt 11, plasmid vector như pBR, pUC... thường được sử dụng. Trong trường hợp nếu protein đích đã có sẵn kháng thể đặc hiệu thì ta có thể sàng lọc sản phẩm biểu hiện gen đã di nạp trong *E. coli* bằng mẫu dò là kháng thể. Phage vector và plasmid vector về căn bản không có khác biệt lớn nhưng phage vector dễ sàng lọc hơn.

Hơn nữa, với phương pháp tổng hợp cDNA thì sau khi tổng hợp sợi DNA thứ nhất cũng có hàng loạt phương pháp sử dụng hairpin loop (vòng kẹp tóc) để tổng hợp sợi DNA thứ hai như phương pháp Land & CS, Gubler & Hoffman, Okayama & Berg... Trong đó, phương pháp Gubler & Hoffman đơn giản nhất, ít gặp thất bại và có thể tổng hợp được cDNA khá dài (khoảng 5 kb). Phương pháp Okayama & Berg dễ thu được cDNA toàn độ dài nhưng cần nhiều công sức. Dưới đây trình bày phương pháp Okayama & Berg.

### 1. Điều chế RNA-polyA nhờ cột cellulose gắn d(T)

#### 1.1. Chế tác cột gel

1) Lấy một ống hút Pasteur nhét một ít bông thủy tinh vào trong chỗ thắt rồi nung tiệt trùng hoặc nhét bông tấy dầu mỡ rồi hấp cao áp tiệt trùng. *Chú ý* đừng nhét bông quá chặt để dòng chảy qua không bị trở ngại nhưng cũng đừng quá lỏng có thể làm chảy gel.

- 2) Cân 0,5 g bột Oligo(dT) cellulose (Pharmacia type 7, chẳng hạn), ngâm vào nước cất cho trương đều (0,5 g thành 1,5 ml).
- 3) Tải vào cột 1,5 ml gel. Để tránh dòng chảy quá chậm có thể cho trước một ít Sephadex G-50 thì tốt hơn.
- 4) Rửa bằng mấy ml dung dịch NaOH 0,1N.
- 5) Rửa bằng *dung dịch đệm dung xuất*, kiểm tra pH dịch thoát ra bằng giấy đo pH cho đến khi dịch thoát ra có phản ứng trung tính.

**Dung dịch đệm dung xuất** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, EDTA 1mM và SDS 0,1%, hấp cao áp tiệt trùng.

- 6) Cân bằng cột bằng mấy ml *dung dịch đệm NaCl 0,5M*.

**Dung dịch đệm NaCl 0,5 M** chứa 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA và 0,1% SDS, hấp cao áp tiệt trùng.

## 1.2. Sắc ký cột (column chromatography)

- 1) Hòa tan RNA đã kết tủa bằng ethanol trong dung dịch dung xuất (nêu trên) sao cho đạt đến nồng độ khoảng 1 mg/ml. Thêm lượng tương đương *dung dịch đệm NaCl 1M*. Làm như vậy nồng độ muối NaCl sẽ là 0,5M.

**Dung dịch đệm NaCl 1M** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, NaCl 1,0M, EDTA 1mM và SDS 0,1%, hấp cao áp tiệt trùng.

- 2) Để ở 65 °C trong 5 phút rồi hạ nhiệt nhanh trong nước đá. Quay li tâm (3.000 v/ph trong 5 phút) loại bỏ tạp chất không tan, thu nước mặt.
- 3) Tải dung dịch RNA vào cột. Khi đó 1 ml Oligo(dT) sẽ xử lý được khoảng 10 mg RNA. *Chú ý* khi nhiệt độ thấp SDS có thể tách khỏi dung dịch.
- 4) Tải dịch thoát qua lần đầu lên gel lần nữa.
- 5) Rửa cột bằng một số lần lượng dung dịch đệm NaCl 0,5M cho đến khi dịch thoát ra từ cột có OD<sub>260</sub> hạ thấp.
- 6) Lại rửa cột bằng một số lần lượng dung dịch đệm NaCl 0,1M cho đến khi dịch thoát ra từ cột có OD<sub>260</sub> hạ thấp.
- 7) Dung xuất bằng dung dịch dung xuất (nêu trên) thu từng phân đoạn khoảng 500 µl. Kiểm tra OD<sub>260</sub> để thu thập các ống có độ hấp thụ đỉnh. Nếu không kiểm tra OD<sub>260</sub> thì có thể thu từng lượng nhỏ 1 - 5 µl dịch dung xuất pha thêm 20 µl ethidium bromide (1 µg/ml) rồi nhỏ lên giấy chất dẻo

mỏng Saran wrap, chiếu tử ngoại từ phía dưới để kiểm tra RNA (nếu có, RNA sẽ phát huỳnh quang da cam).

8) Thêm 1/10 thể tích sodium acetate (pH 5,1) và hai lần lượng ethanol cho kết tủa ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

9) Nếu cần tinh chế poly(A)<sup>+</sup>RNA thì lặp lại các bước từ bước tải Oligo(dT) cellulose.

### 1.3. Phục hồi cột

1) Rửa cột bằng mấy ml NaOH 0,1N.

2) Rửa bằng mấy ml dung dịch dung xuất cho đến khi dịch thoát ra có phản ứng trung tính.

3) Cân bằng cột bằng dung dịch đệm NaCl 0,5M.

4) *Nếu cần bảo quản lâu* thì sau khi tải cột, cho cột đầy nước cất pha sodium azide 0,02% hoặc dung dịch đệm dung xuất chứa sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), nút kín hai đầu bằng parafilm, cất ở  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2. Phân đoạn nhờ li tâm chênh lệch nồng độ saccharose

1) Lấy ống li tâm siêu tốc, Hitachi 13 PA chẳng hạn, ngâm trong dung dịch diethyl pyrocarbonate 1% ở  $37^{\circ}\text{C}$  qua đêm, hấp cao áp tiệt trùng, để khô. Cho vào đó *dung dịch đường chênh lệch mật độ* từ 5, 10, 15 và 20% (hoặc 5 ~ 30%).

**Dung dịch đường chênh lệch mật độ** chứa saccharose 5% (và 10, 15, 20 và 30%, theo khối lượng/thể tích), Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, EDTA 1mM và SDS 0,1%, hấp cao áp tiệt trùng.

2) Lắp ống chứa dịch đường chênh lệch mật độ vào rotor rồi lắp vào máy hạ nhiệt độ xuống mức nhiệt làm việc của máy là  $15^{\circ}\text{C}$  trong 2 giờ cho cân bằng nhiệt độ toàn hệ thống li tâm.

3) Hòa tan kết tủa do ethanol của khoảng 100  $\mu\text{g}$  poly(A)<sup>+</sup>RNA trong 100 - 200  $\mu\text{l}$  nước cất đã tiệt trùng, thêm vào 1/20 lượng SDS 20%.

4) Đun nóng  $70^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút sau đó hạ nhanh nhiệt độ.

5) Tải mẫu lên đường chênh lệch mật độ. Để có dấu độ lớn phân tử lượng (size marker) đồng thời thực hiện với các RNA có độ lớn đã biết trước (ribosome 28S, 18S) trong ống khác cũng chứa dung dịch đường chênh lệch mật độ cùng loại và cũng được li tâm đồng thời.

6) Li tâm siêu tốc (với RPS 40 T Hitachi chẳng hạn). Li tâm trong 5 - 20%

đường với vận tốc 40.000 v/ph trong 15 giờ ở 15 °C thì RNA 18S sa lắng gần tận đáy ống. Li tâm trong 5 ~ 30% đường với vận tốc 22.000 v/ph trong 16 giờ ở 15 °C thì RNA 28S sa lắng ở tận giữa ống.

7) Chuyển từng phân đoạn, mỗi phân đoạn 0,4 ml, sang ống Eppendorf (được khoảng 30 phân đoạn).

8) Thêm vào mỗi phân đoạn 40 µl sodium acetate (pH 5,1) 3M và một lượng ethanol bằng hai lần dung lượng mẫu (mỗi phân đoạn), để ở -20 °C trong 1 giờ cho kết tủa, quay li tâm 15.000 v/ph trong 10 phút. Đổ bỏ nước mặt, thu cặn.

9) Tráng 3 lần bằng ethanol 70%. Hòa tan trong nước vô trùng theo nồng độ thích hợp. Bảo quản ở -20 °C, nếu cần để lâu.

10) Thực hiện Northern blot hybridization (lai thẩm Northern), điều tra hoạt tính của quá trình phiên mã (cho sản phẩm mRNA), chọn phân đoạn có nồng độ cao làm mRNA đích để tổng hợp cDNA.

### 3. Tổng hợp cDNA

#### 3.1. Biến tính mRNA

1) Hòa tan 5 µg poly(A)<sup>+</sup>RNA trong 10 µl nước cất rồi thêm 1 µl CH<sub>3</sub>HgOH 100 mM, để ở nhiệt độ phòng 10 phút.

2) Thêm 2 µl 2-mercaptoethanol 700mM làm vô hoạt CH<sub>3</sub>HgOH. Sau đó thêm khoảng 60 đơn vị chất ức chế RNase (RNase inhibitor, từ nhau thai của người, Takara...), để ở nhiệt độ phòng 5 phút.

#### 3.2. Tổng hợp cDNA

1) Thêm nước cất vào dung dịch sau đây cho đủ 44 µl: mRNA khoảng 15 µl (5 µg), *dung môi tổng hợp sợi thứ nhất* 5× đậm đặc 10 µl, sodium pyrophosphate 80 mM 2,5 µl, các loại dNTP (10 mM mỗi loại) 5 µl và *mỗi (primer) tổng hợp sợi thứ nhất* 1 mg/ml 5 µl (5 µg).

**Dung môi tổng hợp sợi thứ nhất 5×** chứa Tris-HCl (pH 8,3) 250mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM và KCl 250mM.

**Primer tổng hợp sợi thứ nhất** thường là oligo(dT)<sub>12~16</sub> hoặc là random hexamer (6-mer). Do random 6-mer có thể tổng hợp từ giữa sợi mRNA nên khó thu được cDNA dài như khuôn mRNA như mỗi oligo(dT)<sub>12~16</sub>.

2) Để kiểm tra lượng tổng hợp của hai sợi cần chia đôi lượng trên ra hai ống (mỗi ống 22 µl, đánh dấu ô1 và ô2; ô1 để kiểm tra tổng hợp sợi thứ



nhất, ô2 để kiểm tra tổng hợp sợi thứ 2). Cho vào *cả hai ống* 50 đơn vị enzyme phiên ngược (RT: reverse transcriptase), thêm vào *chỉ riêng ống thứ nhất* 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]dCTP (3.000 Ci/mol). Thêm nước cất vào *cả hai ống* cho đều đủ 25  $\mu\text{l}$ . Cho phản ứng ở 42 °C trong 2 giờ. Khi phản ứng kết thúc lấy từ ống thứ nhất 1  $\mu\text{l}$  để kiểm tra kết quả tổng hợp DNA sợi thứ nhất như mô tả ở phần tiếp theo.

3) Cho vào *cả hai ống* ô1 và ô2 đều 50  $\mu\text{l}$  *dung môi tổng hợp sợi thứ hai*, RNase H 2,0 đơn vị, DNA-polymerase I 100 đơn vị. Thêm vào *chỉ ô2* 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]dCTP, rồi thêm nước cho đều đủ 125  $\mu\text{l}$ , ủ 60 phút ở 12 °C, sau đó ở 22 °C trong 60 phút nữa cho phản ứng xảy ra.

**Dung môi tổng hợp sợi thứ hai** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 100mM,  $\text{MgCl}_2$  50mM, KCl 450mM và BSA 250 mg/ml.

4) Vô hoạt các enzyme ở 70 °C trong 10 phút.

5) Cho vào *cả ô1 và ô2* đều 10 đơn vị T4 DNA-polymerase, ủ 37 °C trong 10 phút.

6) Dừng phản ứng bằng cách thêm vào cả hai ống dung dịch chứa 1,25  $\mu\text{l}$  SDS 10% và 1,25  $\mu\text{l}$  EDTA 0,25M.

7) Kiểm tra phản ứng ở ống thứ hai bằng cách lấy ra thử với 5  $\mu\text{l}$ .

8) Chiết xuất bằng phenol-chloroform (1:1).

9) Thêm lượng tương đương sodium acetate 4M rồi thêm hai lần thể tích ethanol so với tổng lượng để kết tủa ở -70 °C trong 30 phút, quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 phút để thu tủa DNA.

10) Lại hòa tan tủa vào 100  $\mu\text{l}$  TE, chiết xuất phenol-chloroform, kết tủa rồi rửa nhẹ tủa bằng ethanol 70%.

### 3.3. Định lượng cDNA tổng hợp

1) Thêm vào dịch cDNA thu được 20  $\mu\text{g}$  carrier DNA, rồi thêm 30  $\mu\text{l}$  EDTA 0,25M.

2) Đặt lên một tờ giấy chất dẻo mỏng (Saran wrap, hãng Dow Chemical Company) một mẫu giấy DE 81 (Whatman) cỡ 1 cm  $\times$  1 cm, rồi nhỏ lên giấy thấm DE 81 đốm 4  $\mu\text{l}$  DNA, sấy khô ở 80 °C có quạt gió cho chóng khô (khoảng trong 1 - 2 giờ).

3) Đo cường độ quang Cerenkov bằng scintillation counter (giá trị X).

4) Xử lý giấy DE 81 trên bằng  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5M 6 lần trong 5 phút, rửa bằng

nước cất 2 lần mỗi lần một phút rồi rửa lại bằng ethanol 2 lần.

5) Lại đo cường độ quang Cerenkov bằng scintillation counter (giá trị Y).  $Y/X$  là lượng cDNA được tổng hợp trong số DNA tổng số. Giả định trong cDNA các loại dNTP được thu nạp một cách đồng đều thì lượng cDNA được tổng hợp là  $5 \mu\text{l} \times 10 \text{ mM} \times Y/X \times 350 \times 4$ ; trong đó  $5 \mu\text{l}$  là tổng lượng dCTP, 350 là phân tử lượng bình quân của các dNTP. Thông thường khoảng 20 - 40% cDNA được tổng hợp từ mRNA.

### 3.4. Kiểm định độ dài cDNA

1) Cho 0,5 g agarose vào 45 ml nước cất trong bình tam giác, đun cho agarose tan chảy đều. Để nguội rồi cho vào đó 5 ml dung dịch NaOH 0,3M có pha EDTA 10mM. Trộn đều, đổ khuôn điện di ngang rồi để cho gel agarose hóa rắn.

2) Cho 1  $\mu\text{l}$  dung dịch NaOH 0,3M - EDTA 10mM vào 9  $\mu\text{l}$  mẫu, rồi cho vào đó 2  $\mu\text{l}$  *dung dịch màu tái mẫu* 6 $\times$  (chứa glycerol 50%, BPB 0,1% và XC 0,1%). Đổ ngập khuôn gel agarose bằng dung dịch đệm kiểm chứa NaOH 0,03N pha EDTA 1mM. Sử dụng DNA đầu khối lượng phân tử (DNA MW marker) đã được gắn phóng xạ như các đoạn của DNA  $\lambda$  gắn phóng xạ được cắt bằng *Hind* III hoặc các đoạn của pBR 322 gắn phóng xạ được cắt bằng *Hind* I cũng đã được xử lý kiểm tương tự.

3) Sau khi kết thúc điện di trong gel, thực hiện tự ký phóng xạ (autoradiography) bằng cách đặt lên gel một tấm Saran wrap, đưa vào buồng tối rồi ép một tấm film X-quang (như Hyperfilm của hãng Amersham Life Science) lên đó, ép đều bề mặt film lên gel, rửa hiện hình sau 30 - 60 phút.

4) Cũng có thể xác định độ lớn của cDNA bằng phương pháp điện di thông thường không xử lý kiểm trong gel agarose pha sẵn ethidium bromide trong dung dịch đệm TAE cùng với DNA MW marker bình thường rồi kiểm tra các băng dưới UV.

### 3.5. Methyl hóa vị trí cắt của enzyme hạn chế *Eco* RI của cDNA

Methyl hóa làm cho DNA không còn nhận biết được bởi enzyme hạn chế nên không bị các enzyme này phân cắt. Nhờ vậy, trong quá trình thí nghiệm với enzyme hạn chế các DNA đích vẫn được bảo tồn trong khi các DNA khác bị cắt đoạn.

1) Làm khô cDNA đã được kết tủa bằng ethanol, hòa tan vào 36  $\mu\text{l}$  nước rồi thêm vào đó các hóa chất sau: 5  $\mu\text{l}$  Tris-HCl 1M (pH 7,5), 1  $\mu\text{l}$  EDTA 50mM, 2  $\mu\text{l}$  BSA (DNase-free) 10  $\mu\text{g/ml}$  và 5  $\mu\text{l}$  S-adenosyl-L-methionine

(Sigma, Boehringer...) 100 $\mu$ M. Nền pha trước S-adenosyl-L-methionine trong sodium acetate 10mM (pH 5,0) ở nồng độ 100mM rồi cất ở  $-20^{\circ}\text{C}$ , khi sử dụng thì pha loãng 100 lần.

2) Thêm vào ống 20 đơn vị (1  $\mu$ l) *Eco* RI methylase (Boehringer...) cho phản ứng ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 60 phút.

3) Chiết xuất bằng phenol-chloroform (1:1).

4) Thêm 2,5  $\mu$ l NaCl 5M và 150  $\mu$ l ethanol, để ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho kết tủa, quay li tâm thu tủa, rửa nhẹ bằng ethanol 70%, làm khô (nên dùng máy cô đặc bằng chân không để tăng tốc độ làm khô).

### 3.6. Gắn đoạn nối *Eco* RI (*Eco* RI linker)

Các phân tử cDNA có đầu bằng, vì vậy cần có thao tác biến đổi thành đầu dính phù hợp với đầu dính của vector. Do vector trong các thí nghiệm được giới thiệu ở đây được cắt mở vòng bởi *Eco* RI nên việc nối thêm ở hai đầu cDNA hai mảnh DNA nối (linker DNA đặc hiệu *Eco* RI) để enzyme này có thể nhận biết và phân cắt tạo nên đầu dính tương ứng là cần thiết.

Hòa tan cDNA trong 5,4  $\mu$ l nước cất, rồi trộn vào hỗn hợp sau đây: 0,8  $\mu$ l dung dịch đệm ligation 10 $\times$ , 1  $\mu$ l linker (đã phosphoryl hóa, 500 ng/ml) và 0,8  $\mu$ l (200 đơn vị) T4 DNA ligase (Takara...), rồi ủ ở  $4^{\circ}\text{C}$  để cho phản ứng liên kết (ligation) xảy ra.

**Dung dịch đệm ligation 10 $\times$**  chứa Tris-HCl (pH 7,5) 100mM, MgCl<sub>2</sub> 100mM, DTT 100mM và ATP 10mM.

### 3.7. Cắt bằng *Eco* RI

Phân cắt DNA bằng enzyme *Eco* RI nhằm tạo đầu dính cho các cDNA tạo khả năng liên kết với đầu dính của plasmid đã cắt bằng enzyme này.

1) Đưa ống ligation nêu trên ủ ở  $65^{\circ}\text{C}$  20 phút làm vô hoạt ligase.

2) Thêm vào 20  $\mu$ l dung dịch đệm *Eco* RI 10 $\times$  và 5  $\mu$ l (50 đơn vị) *Eco* RI rồi thêm nước cất cho đủ 200  $\mu$ l, tiêu hóa ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 4 giờ.

3) Chiết xuất bằng phenol-chloroform (1:1) rồi kết tủa bằng cách thêm 10  $\mu$ l NaCl 5M và 500  $\mu$ l ethanol rồi li tâm thu tủa và rửa tủa trong ethanol 70%, làm khô.

### 3.8. Lọc bằng gel

- 1) Cho vào một đầu pipet 2 ml (loại ống nhựa dùng một lần) rồi cho vào đó khoảng 3 ml Sepharose CL-44 B cho đến gần miệng pipet.
- 2) Cân bằng cột bằng TE chứa 0,4 M NaCl.
- 3) Hòa tan tủa cDNA đã tiêu hóa nêu trên vào 50  $\mu$ l TE, tải lên cột gel.
- 4) Dung xuất bằng *dung dịch đệm dung xuất* (nêu ở 1.1.), thu từng phân đoạn 100  $\mu$ l, ước khoảng sau 1 ml thì cDNA sẽ lưu xuất khỏi cột.

**Dung dịch đệm dung xuất** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, EDTA 1mM và SDS 0,1%, hấp cao áp tiệt trùng.

- 5) Điện di các phân đoạn để xác định độ lớn phân tử, làm khô gel và cho tự ký hoặc quan sát dưới UV gel đã nhuộm ethidium bromide (bên cạnh DNA MW marker).
- 6) Chọn các phân đoạn chứa cDNA có độ lớn thích hợp.

### 3.9. Tổ hợp vào vector

- 1) Xác định trước khối lượng phân tử của cDNA. Làm phản ứng tổ hợp vào vector trong 3 ống. Trộn 1  $\mu$ g DNA  $\lambda$ gt 10 hoặc  $\lambda$ gt 11 gắn đầu dính (arm-DNA  $\lambda$ gt 10, arm-DNA  $\lambda$ gt 11) với một lượng cDNA trong mỗi ống sao cho tỷ lệ theo mol giữa vector và cDNA là 2:1, 1:1 và 1:2 (để tăng khả năng tổ hợp đúng). Trộn đều rồi kết tủa bằng ethanol.
- 2) Hòa tan tủa vào 4  $\mu$ l nước cất thêm 0,5  $\mu$ l dung dịch đệm ligation 10 $\times$  và 150 đơn vị ligase (0,5  $\mu$ l). Ủ ở 12 °C để kết nối xảy ra.
- 3) Kiểm tra liên kết bằng cách lấy 0,5  $\mu$ l dịch phản ứng cho điện di trong agarose gel 0,8% rồi cho tự ký phóng xạ. Nếu cDNA đã tổ hợp đúng với vector thì sẽ thấy dưới băng DNA ở trên vị trí của arm-DNA (DNA đã tổ hợp có khối lượng phân tử bằng tổng khối lượng phân tử của arm-DNA và cDNA còn sót lại).

### 3.10. *in vitro* packaging (lắp ráp phage trong ống nghiệm)

Phương pháp *in vitro* packaging đưa cDNA đã kết nối đầu dính (nhờ có arm-DNA) với đầu dính của DNA phage vector vào vỏ phage. *Dịch vỏ phage* (packaging extract, gồm Sonic Extract (SE) và Freeze Thaw Lysate (FTL)) có thể mua từ các hãng (như Amersham Life Science, Stratagene... có thể hy vọng đạt 1 - 10 $\times$ 10<sup>5</sup> pfu cho mỗi  $\mu$ g DNA).

- 1) Lấy SE và FTL khỏi tủ lạnh sâu -80 °C và cho tan ở nhiệt độ nước đá.

Cho vào SE tất cả 4  $\mu$ l dịch kết quả phản ứng tổ hợp nêu ở bước trên. (Thực hiện đối với cả ba tỷ lệ tổ hợp). Trộn nhẹ cho đều, thêm 15  $\mu$ l, lại trộn đều.

2) Ủ ở nhiệt độ phòng 90 - 120 phút cho phản ứng xảy ra.

3) Thêm vào các ống 500  $\mu$ l SM, thêm mấy giọt chloroform, trộn đều rồi bảo quản 4 °C.

4) Cấy khoảng 1 - 5  $\mu$ l từ mỗi dịch trên lên bề mặt môi trường thạch có lúa cấy vi khuẩn ký chủ để kiểm tra hiệu quả packaging.

#### **4. Sàng lọc thư viện cDNA trong $\lambda$ gt 10 nhờ mẫu dò DNA tổng hợp**

##### **4.1. Lựa chọn mẫu dò**

Mẫu dò là phương tiện để nhận biết sản phẩm cần có (sản phẩm đích). Nếu trình tự amino acid của protein đã biết là khá dài (hoặc đã biết toàn bộ) thì chọn những đoạn giàu Met, Trp rồi sau đó là Tyr, Cys, His, Glu, Gln, Asn, Asp, Lys, Phe và Arg. Khi không tìm thấy đoạn có codon một nghĩa thì có thể chọn tất cả mọi khả năng có thể có của trình tự nucleotide suy diễn để tổng hợp mỗi oligonucleotide, hoặc là chỉ chọn những *codon có tần suất xuất hiện cao* (ứng với loài sinh vật) để quyết định chọn trình tự nucleotide mỗi cần tổng hợp. Cũng có thể lấy base thứ ba của các codon là inosinic acid.

Có thể tổng hợp mẫu dò dựa theo trình tự nucleotide của codon nhưng với Northern hybridization thì cần tổng hợp mẫu dò theo trình tự bổ sung. Độ dài của mẫu dò nên vượt quá 16 base.

Tốt hơn là nên tổng hợp cả hai mẫu dò theo trình tự amino acid của vùng gần đầu amino ( $-\text{NH}_2$ ) lẫn đầu carboxyl ( $-\text{COOH}$ ), nếu có thể.

##### **4.2. Đánh dấu mẫu dò**

Mẫu dò có thể đánh dấu phóng xạ như trình bày dưới đây hoặc phương pháp phi phóng xạ gắn DIG-dUTP (tham khảo mục 5. Chương 2).

1) Hòa khoảng 50  $\mu$ g DNA mẫu dò, 5  $\mu$ l *dung dịch đệm phosphate hóa* 5 $\times$  và [ $^{32}\text{P}$ ]ATP 30 - 50  $\mu$ Ci. Thêm nước cất cho đủ 50  $\mu$ l, ủ ở 37 °C trong 1 - 2 giờ.

**Dung dịch đệm phosphate hóa (5 $\times$  chứa Tris-HCl (pH 7,6) 0,66M, ATP 10mM, spermidine 10mM,  $\text{MgCl}_2$  100mM và DTT 150mM.**

2) Thêm EDTA 0,5 M 50 ng và 2  $\mu$ l carrier RNA (10 mg/ml, chiết từ nấm

men...) chiết xuất bằng phenol-chloroform rồi lọc qua cột Sephadex G-25.

#### 4.3. Nhiễm phage vào vi khuẩn *E. coli* và cấy trải đĩa

1) Hòa vào dung dịch phage thư viện (library phage)  $\lambda$ gt 10 chứa  $2 - 5 \times 10^4$  pfu, 400  $\mu$ l SM và 400  $\mu$ l *E. coli* đã cấy qua đêm, ủ 15 phút ở 37 °C, sau đó thêm vào 9 ml NZYME-agarose 0,7% (đã hấp cao áp tiệt trùng và ủ ở 50 °C) rồi trải đều lên mặt đĩa môi trường NZYME-agarose 1,5%.

2) Ủ ở 37 °C qua đêm (khoảng 12 - 16 giờ, không ủ quá lâu làm plaque quá to).

#### 4.4. Cố định DNA lên màng

1) Khi thấy plaque thì làm lạnh các đĩa môi trường ở 4 °C (khoảng 30 phút), sau đó đặt lên bề mặt môi trường đĩa một tấm màng nitrocellulose (Milipore, S & S... hoặc màng nylon) đã đánh số (bằng bút bi) tương ứng với số đánh trên đĩa một cách nhẹ nhàng sao cho không khí không còn sót dưới màng để các plaque tiếp xúc tốt với bề mặt màng. Để yên 3 phút.

2) Dùng kim tiêm đánh dấu vị trí của màng so với mặt đĩa (Chọc thủng xuyên cả màng lẫn agarose).

3) Lấy màng ra làm khô tự nhiên (khoảng 5 - 7 phút).

4) Đặt màng (sao cho các plaque hướng lên trên) *lần lượt* ở trên các lớp giấy thấm đã ngấm đều các dung dịch sau: 1) NaOH 0,5M và NaCl 1,5M trong khoảng 30 - 60 giây, 2) Tris-HCl (pH 7,5) 0,5M và NaCl 1,5M trong 3 - 5 phút, và 3) SSC 2× trong 3 - 5 phút. Do sau khi xử lý dung dịch thứ nhất (trên giấy thấm) tế bào đã phân giải và DNA biến tính đã cố định khá tốt lên màng nên các dung dịch thứ hai và thứ ba có thể xử lý trực tiếp bằng cách đặt màng vào một khay nhỏ có sẵn lượng nhỏ của một trong hai dung dịch đó.

5) Làm khô ở 80 °C trong 1 - 2 giờ. Có thể làm khô một đêm ở nhiệt độ phòng hoặc 60 °C nhưng nên làm khô *càng nhanh càng tốt* để tránh DNA một sợi phân giải dần trong quá trình làm khô.

#### 4.5. Hybridization

1) Ngâm màng nitrocellulose trong dung dịch SSC 6× rồi ngâm sang dung dịch SSC 6×-Denhardt 1×-SDS 0,5%, lai tiền khởi (**prehybridize**) ở nhiệt độ ủ thích hợp với độ dài của mẫu dò. Nếu mẫu dò dài 17 base cần ủ ở khoảng 37 °C, 20 base thì 37 - 42 °C, 56 base thì khoảng 50 °C, mẫu dò dài hơn có thể ủ ở 65 °C.

2) Thực hiện hybridization trong túi chất dẻo. Cho màng vào giữa hai lớp của một mảnh màng polyethylene đã hàn (bằng kẹp nhiệt) một cạnh bên, sau đó hàn tiếp cạnh bên còn lại rồi cho vào đó dung dịch lai. Với màng lọc đường kính 15 cm cần cho vào túi 0,3 - 0,4 ml dung dịch lai. Sau khi cho màng và dịch vào túi thì hàn kín mép còn lại (lưu ý khi hàn: càng ít không khí sót lại càng tốt).

**Dung dịch lai (hybridization solution)** chứa Tris-HCl (pH 8,0) 50mM, EDTA 10mM, SDS 0,1%, khoảng  $2 \times 10^5$  cpm/ml probe và 50 µg/ml RNA nấm men.

3) Ủ ở nhiệt độ thích hợp với độ dài của mẫu dò (như nêu ở trên). Có thể lắc đảo túi lai (để trong ống Corning... hoặc trong khay) trên máy trộn đảo. Thực hiện lai trong khoảng 15 giờ.

4) Đồng thời, trong một túi khác cần thực hiện lai âm tính để kiểm tra phóng xạ nền: Ngâm một màng tương tự nhưng chưa gắn plaque vào dung dịch lai.

#### 4.6. Rửa và tự ký phóng xạ

1) Lấy màng lai và màng kiểm tra phóng xạ nền ra khỏi túi rồi rửa (riêng nhưng cùng chế độ) trong khoảng 50 - 100 ml dung dịch chứa SSC 6× và SDS 0,1%. Nâng dần nhiệt độ cao hơn nhiệt độ lai mỗi lần 2 °C, đồng thời kiểm tra phóng xạ màng nền cho đến bao giờ hết phóng xạ thì dừng lại. Như vậy chắc chắn không còn tồn dư các probe không đặc hiệu trên các màng.

2) Làm khô tự nhiên hoặc khô nhanh ở 80 °C có quạt gió trong 1 - 2 giờ. Đặt lên màng một tấm film X-quang (trong buồng tối) khoảng 5 giờ đến 1 đêm (ở -80 °C thì tốt, nhưng có thể ở 4 °C). Sau đó rửa film để hiển thị. Khi được film nào thì *phải ghi số tương ứng* với số của màng đã tự ký.

#### 4.7. Sàng lọc lại

1) Nếu thấy có film có vết đen tương ứng với plaque là có plaque dương tính cần tìm. Tìm lại màng đã có kết quả dương tính và dùng vị trí đâm kim trước đây để kiểm tra vị trí của plaque đó trên mặt môi trường agarose.

2) Dùng que tăm đã tiệt trùng lấy lớp agarose mềm cạnh plaque dương tính rồi hòa vào 1 ml SM.

3) Pha huyền dịch trên (~100 lần), trộn 10 µl dịch này với 300 µl lúá cấy *E. coli* khả biến (C600 hfl...) đã cấy qua đêm, thêm vào đó 8 ml agarose-

NZYM (thạch phủ mặt, nồng độ agarose khoảng 0,3 - 0,5%, tan ở 50 °C) rồi láng lên bề mặt môi trường 1,5% agarose-NZYM, để thạch phủ mặt cứng thì ủ ở 37 °C qua đêm.

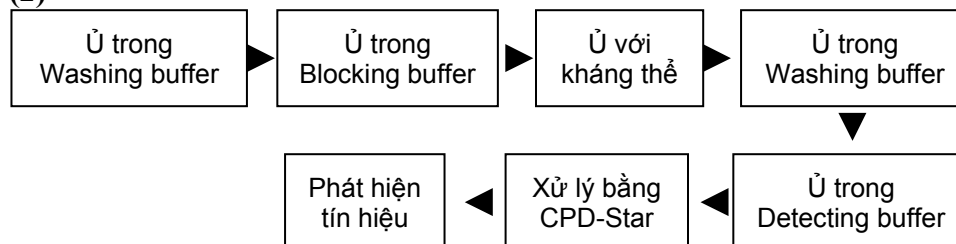
4) Thực hiện lại các thao tác sàng lọc (screening) như đã mô tả đối với sàng lọc, ở trên.

*Chú ý:* Nếu sử dụng **phương pháp DIG-dUTP** để đánh dấu môi thì sau khi cố định DNA lên màng các bước *lai* (1) và *phát hiện* (2) *clone đích* được tiến hành theo sơ đồ sau:

(1)



(2)



1) Với phương pháp dùng chai lai, đặt màng khô đã gắn DNA vào một chai hybridization bằng thủy tinh (glass hybridization bottle, hãng HyBaid...), sao cho mặt màng có gắn DNA không tiếp xúc với mặt thủy tinh.

2) Rót 10 ml Dig Easy Hyb solution vào một ống li tâm bằng nhựa 15 ml rồi rót dung dịch này vào chai hybridization. Giữ chai nhựa lại sẽ dùng lần nữa.

3) Đậy kín nắp chai hybridization và đặt nó vào lò lai (hybridization oven, hãng BioRad, HyBaid...). Cho quay nhẹ (~5 v/ph) trong 1 - 3 giờ ở 41 °C để ủ đều.

4) Khoảng 10 phút trước khi kết thúc quá trình lai tiền khởi nêu trên, cần chuẩn bị dò: rót 10 ml dung dịch dò, chẳng hạn Dig Easy Hyb (hãng Roche Molecular Biochemicals) vào chai nhựa li tâm nêu ở mục trên. Thêm dò để có nồng độ khoảng 20 - 25 ng/ml. Nắp kín nắp chai nhựa rồi đặt vào trong bể ủ 80 °C trong khoảng 30 phút để biến tính DNA.

5) Sau khi lai tiền khởi kết thúc, lấy chai hybridization ra khỏi lò lai và rót



bỏ hết dung dịch lai tiền khởi (dung dịch này có thể cất giữ lại để dùng lần sau).

6) Thêm dò đã biến tính (nêu trên: Dig Easy Hyb) vào chai hybridization, lắp vào lò lai và để quay chậm ở 41 °C qua đêm.

7) Rót bỏ dung dịch lai vào chai nhựa 15 ml (cất ở -20 °C khi cần dùng lại thì giải đông, tái sử dụng được 3 - 4 lần nữa).

8) Thêm 20 ml dung dịch rửa (washing solution) I vào chai lai, vặn nắp kín, lắp vào lò lai và cho quay với tốc độ tối đa trong 15 phút (nhiệt độ phòng) để rửa.

9) Rót bỏ hết dung dịch rửa I bằng cách dốc ngược chai lên tờ giấy thấm. Lắp lại bước rửa một lần nữa.

10) Thêm 20 ml dung dịch rửa II ấm ở 62 °C, lắp vào lò lai đã đặt nhiệt độ 62 °C vào quay chậm 15 - 20 phút.

11) Rót bỏ dung dịch rửa II, làm hết dung dịch nhờ giấy thấm hoặc khăn giấy. Lắp lại rửa bằng dung dịch rửa II một lần nữa.

12) Rót bỏ dung dịch rửa II, làm hết dung dịch bằng cách dốc ngược lên một khăn giấy.

12) Thêm 20 ml dung dịch đệm rửa (washing buffer - buffer A). Lắp vào lò lai ở nhiệt độ phòng và quay với tốc độ tối đa 2 - 5 phút.

13) Rót bỏ buffer A, rồi thêm 10 ml dung dịch đệm phong bế (blocking buffer - buffer B). Lắp vào lò cho quay chậm ở nhiệt độ phòng trong 1 - 3 giờ.

15) Rót bỏ hết dung dịch B (vứt bỏ). Dốc miệng chai lai lên giấy thấm để loại bỏ hết dịch.

16) Rót 10 ml dung dịch đệm B (buffer B) vào một chai nhựa 15 ml rồi thêm vào đó 2 µl dung dịch tồn trữ kháng thể chống DIG gắn phosphatase kiềm (anti-DIG-alkaline phosphatase stock solution). Trộn đều và rót vào chai lai có màng. Nắp chai lai và lắp vào lò lai rồi cho quay với tốc độ chậm 30 phút ở nhiệt độ phòng.

17) Rót bỏ hết dung dịch kháng thể.

18) Rót vào chai lai 20 ml buffer A và cho quay ở nhiệt độ phòng với tốc độ tối đa trong 15 phút.

19) Rót bỏ hết buffer A. Thêm vào chai lai 50 ml dung dịch phát hiện (detection buffer - buffer C), quay ở nhiệt độ phòng 20 phút với tốc độ tối

đa. Lặp lại bước này một lần nữa.

20) Chuyển màng sang một túi chất dẻo (plastic bag, hãng Roche Biochemicals, hãng Kapak...) bằng cách xóc nhẹ chai cho màng lên miệng chai rồi mở nắp rót một nửa buffer C vào túi, đeo găng tay không bụi và dùng hai đầu ngón tay đưa màng sang túi. Lưu ý màng cần sát đáy túi để tiết kiệm dung dịch cơ chất quang hóa (chemiluminescent substrate) vốn đắt tiền.

21) Rót bỏ buffer C khỏi túi lại, đặt túi lên một tấm giấy lọc Whatman 3MM và đặt lên đó một tờ giấy thấm Kimwipe, ép nhẹ (không được nặng tay vì sẽ làm tăng màu nền) cho dịch trong túi thoát ra hết.

22) Mở túi nhẹ nhàng sao cho bề mặt màng không mang DNA vẫn dính sát thành túi. Thêm 1 ml dung dịch CDP-Star (CDP-Star solution) thành dòng dọc theo thành túi (không đưa trực tiếp lên màng). Đặt túi lên một tờ giấy Whatman 3MM sao cho bề mặt chứa DNA ở trên và ép nhẹ thành túi (với giấy Kimwipe) cho dung dịch phân bố đều trên bề mặt của màng một cách chắc chắn. Lưu ý không ép mạnh tránh để lại dấu ép khi hiển thị dò trên film. Bằng một tờ Kimwipe ép nhẹ túi lại cho CDP-Star thoát hết ra ngoài sao cho không còn dịch thừa trên bề mặt màng (trong góc túi có thể vẫn còn ít dịch). Hàn kín túi bằng một đường hàn nhiệt.

23) Đặt một tấm film X-quang (trong tối) lên túi lại sao cho bề mặt nhũ của film nằm về phía túi (nên để túi sẵn trong một hộp film X-quang), giữ ở nhiệt độ phòng 10 - 15 phút. Thời gian bộc lộ này có thể kéo dài đến 12 giờ. Rửa film X-quang để hiện vị trí dò. Chú ý rằng phát xạ CDP-Star mạnh nhất sau khoảng 20 - 30 phút xử lý và kéo dài đến hơn 24 giờ vì vậy có thể lặp lại việc bộc lộ một số tấm film nếu cần thiết.

## **5. Sàng lọc thư viện cDNA trong $\lambda$ gt 10 nhờ mẫu dò DNA đã dòng hóa**

### **5.1. Phân li và tinh chế mẫu dò**

Dùng DNA đã dòng hóa (đã clone hóa) thường cần đoạn DNA dài hơn 100 base và đặc biệt là cần tránh sự tạp nhiễm với vector cũng như vi khuẩn chủ. Để được điều đó nên cắt DNA đích bằng enzyme hạn chế rồi điện di trên agarose gel để kiểm tra.

### **5.2. Đánh dấu mẫu dò**

Đánh dấu (bằng phương pháp nick-translation hoặc multiprime) khoảng 0,1 - 0,25  $\mu$ g DNA sử dụng 20 - 40  $\mu$ Ci [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP. Mỗi lần được khoảng 10 - 30  $\times 10^6$  cpm. Bảo quản mẫu dò ở  $-20^\circ\text{C}$ .

### 5.3. Nhiễm và cấy trải đĩa

Như mục 4.3. nêu trên.

### 5.4. Cố định DNA

Như mục 4.4. nêu trên.

### 5.5. Lai (hybridization)

Các bước lai tương tự các bước đã trình bày ở mục 4.5., nhiệt độ lai và rửa là 65 °C. Rửa 2 lần trong dung dịch chứa SSC 0,1× và SDS 0.1% trong 30 phút. Tụ ký phóng xạ như trình bày mục trên.

### 5.6. Sàng lọc lại

Khi có plaque dương tính thì thực hiện các bước sàng lọc lại như trình bày ở mục 4.7.

## 6. Sàng lọc thư viện cDNA trong λgt 11 nhờ mẫu dò kháng thể

Đưa cDNA vào vị trí của *Eco* RI của vector λgt 11 là vị trí kề bên gen *lacZ* về phía đầu 3' cho nên nếu hướng của khung đọc (reading frame) thích hợp thì sản phẩm protein dung hợp với β-galactosidase sẽ được tổng hợp (xác suất tính toán khoảng 1/6). Protein dung hợp được tổng hợp sẽ tập trung trong tế bào vi khuẩn *E. coli* chủ, nếu tải vi khuẩn này lên màng (nitrocellulose hoặc nylon) rồi phá vỡ vi khuẩn tạo chấm thâm (blot) và cho kết hợp với kháng thể đặc hiệu với protein đích sau khi rửa và lại cho tổ hợp này kết hợp với kháng thể đánh dấu (enzyme, phóng xạ (<sup>125</sup>I)) thì có thể phát hiện được protein đích.

### 6.1. Cắm nhiễm và cấy trải đĩa

- 1) Nuôi cấy trước một ngày chủng *E. coli* (1090 chẳng hạn) bằng môi trường NZYM chứa 0,2% maltose.
- 2) Thêm 0,2 ml *E. coli* 1090 đã cấy qua đêm vào 0,1 ml dung dịch SM chứa thư viện trong λgt 11 (chứa khoảng 2 - 10×10<sup>4</sup> plaque), ủ 15 phút ở 37 °C.
- 3) Thêm lượng trên vào khoảng 10 ml NZYM-agarose mềm rồi tráng lên môi trường thạch đường kính 15 cm đã được làm ấm ở 37 °C. hong ở 37 °C (trong buồng vô trùng) cho ráo thạch rồi ủ ở 42 °C trong 3 - 4 giờ (phage λgt 11 tạo plaque rất sớm, sau 3 - 4 giờ). Môi trường mềm agarose được chế bằng cách làm tan 0,7% agarose trong môi trường NZYM, tiệt trùng rồi để nguội ở 50 °C.

## 6.2. Chuyển thấm protein (protein blotting)

1) Lấy một màng lọc nitrocellulose (hoặc màng nylon) đã hấp cao áp tiệt trùng, làm ướt bằng dung dịch IPTG (isopropyl thiogalactoside, hãng Sigma...) 10mM, hong cho không còn dịch chảy khỏi màng (có thể thấm vào khăn giấy) rồi đánh dấu (bằng bút chì, *không được dùng bút bi* để tránh nhầm lẫn khi phát màu bằng peroxidase ở các bước sau) tương ứng với số của đĩa môi trường.

2) Đặt màng có số tương ứng lên bề mặt môi trường đĩa đã hình thành plaque, ủ ở 37 °C trong 3,5 giờ. Dùng kim tiêm chọc thủng màng lần thạch môi trường để đánh dấu vị trí. Khi cần chuyển thấm lên hai màng thì lấy màng thứ nhất ra rồi đặt lên môi trường màng thứ hai, đâm kim đánh dấu, rồi ủ với thời gian và nhiệt độ tương tự.

3) Lấy màng khỏi môi trường, tráng nhẹ trong *dung dịch TBST* khoảng 1 phút.

**Dung dịch TBST** chứa Tris-HCl (pH 7,9) 50mM, NaCl 150mM và Tween-20 0,05%.

4) Ủ màng trong TBST chứa 20% huyết thanh bê 30 phút ở 37 °C. Cũng có thể thay huyết thanh bê (FCS) bằng albumin huyết thanh bê (BSA), huyết thanh ngựa, gelatin hoặc sữa đã loại bơ (skim milk).

## 6.3. Ủ với mẫu dò kháng thể

Sử dụng phương pháp này để sàng lọc thì kết quả phụ thuộc nhiều vào chất lượng kháng thể. Có thể dùng kháng huyết thanh nhưng dùng kháng thể đơn dòng cũng tốt. Kháng thể phải có hiệu giá cao. Thêm vào đó, trong nhiều trường hợp nếu không được tinh chế qua cột sắc ký hấp phụ thì các kháng thể đặc hiệu *E. coli* (chủ) tạo nền dương tính giả. Do đó trước khi sàng lọc cần sắc ký loại bỏ các kháng thể không mong muốn này khỏi kháng huyết thanh cần sử dụng.

1) Chọn độ pha loãng thích hợp: chuyển thấm khoảng 1 ng kháng nguyên lên màng lọc (nitrocellulose hay nylon) cho tiếp xúc (nhỏ lên màng) huyết thanh có độ pha loãng dần từ 200 - 1.000 lần trong TBS pha 20% huyết thanh bê. Sử dụng nồng độ pha có tỷ số signal/background cao nhất.

2) Loại bỏ kháng thể đặc hiệu *E. coli*: Tập trung tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng Y-1090 từ 500 ml lúa cấy qua đêm, trộn đều vào 20 ml nước cất, xử lý trong 5 - 10 phút ở 100 °C, quay li tâm 10.000 v/ph thu lấy nước mặt. Trộn 1 ml dịch mặt này với 100 ml kháng thể, để 2 giờ ở 4 °C, quay li tâm 10.000 v/ph trong 15 phút, thu nước mặt để thực hiện sàng lọc. Cũng có

thể lấy dịch dung giải *E. coli* pha thêm cho được  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9,0) 0,1M và NaCl 0,5M rồi cố định vào cột Sepharose 4 B (hãng Pharmacia) đã hoạt hóa bằng CNBr rồi dùng để xử lý (lọc) kháng thể.

3) Ủ màng (có đốm thâm) 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong dung dịch TBST-FCS 20%. Nếu ủ 10 tấm màng thì cần khoảng 50 ml (FCS: fetal calf serum - huyết thanh bê). Có thể ủ trong đĩa Petri, khi ủ cần trộn đảo nhẹ.

4) Rửa 3 lần bằng khoảng 100 ml TBST mỗi lần 3 phút để loại bỏ những kháng thể và protein không kết hợp đặc hiệu.

5) Ủ với kháng thể đánh dấu (kháng thể thứ hai, hay conjugate đặc hiệu với  $\gamma$ -globulin loài động vật đã cho kháng huyết thanh - tức cho kháng thể thứ nhất) (có thể mua từ nhiều hãng như Miles, BioRad...). Trước tiên pha loãng conjugate theo nồng độ chỉ định của nhà sản xuất (pha loãng 1.000 lần), cần pha khoảng 50 ml. Cũng có thể sử dụng conjugate đánh dấu phóng xạ bằng  $^{125}\text{I}$  (trong thành phần protein A liên kết với kháng thể).

6) Rửa bằng khoảng 100 ml TBS 3 lần mỗi lần 3 phút, lại rửa bằng 100 ml TBST 10 phút và sau đó bằng TBS cũng 10 phút. Nếu dùng conjugate phóng xạ thì thực hiện tự ký phóng xạ (autoradiography).

7) Ngâm màng lọc vào dung dịch cơ chất của enzyme tương ứng đã gắn trên conjugate (ví dụ, TMB hoặc 5-aminosalicylic acid với HRPO hay horse radish peroxidase). Nếu 10 màng cần 50 ml. Thời gian ngâm khoảng 20 - 40 phút, để lâu hơn có thể làm đậm màu nền.

8) Rửa màng bằng nước cất rồi sấy khô.

9) Nếu có clone dương tính thì thực hiện sàng lọc lại (secondary screening), bắt đầu từ việc tìm vị trí plaque dương tính, cạo agarose kề bên hòa vào môi trường thích hợp... tương tự như đã trình bày ở mục trước.

## VII. Tạo dòng thuần DNA bộ gen

Để làm sáng tỏ cấu trúc và chức năng của bộ gen cần phải tạo dòng (dòng hóa, clone hóa hay cloning) các đoạn chứa các gen từ DNA của tế bào (động, thực vật...). Để biết trình tự amino acid của protein được mã hóa bởi gen có thể tạo dòng cDNA rồi dựa vào trình tự của nó mà suy định trình tự của amino acid cũng tốt. Tuy nhiên, để xác định cơ cấu exon-intron của gen thì nhất thiết phải tạo dòng từ genome, đặc biệt chỉ có thể bằng cách này mới biết được các cơ cấu DNA không có mặt trong thành phần gen cấu trúc như cơ cấu điều tiết biểu hiện của gen như đoạn DNA nằm phía đầu 5' của một exon...

*Điều kiện* để dòng hóa (cloning) DNA genome (genomic DNA cloning) khả thi: Việc dòng hóa DNA bộ gen có thể thực hiện được nhờ lai với mẫu dò từ cDNA với độ nghiêm mật tương đồng 100% nhưng nhiều trường hợp cũng có thể áp dụng với các mẫu dò có tính tương đồng khoảng trên 70%, chẳng hạn dùng mẫu dò của một gen của loài này để phát hiện gen cùng loại của loài khác hoặc dùng mẫu dò chung cho nhiều protein cùng thuộc một họ (chẳng hạn họ globulin miễn dịch). Nếu biết trước trình tự amino acid của sản phẩm của gen thì dựa vào đó tổng hợp oligonucleotide làm mẫu dò để clone hóa gen đó được. Trong trường hợp nhờ phương pháp *phân tích liên kết* mà thấy rằng có mẫu dò của DNA của gen hoặc biết được DNA biểu hiện tính đa hình độ dài đoạn hạn chế (RFLP - restriction fragment length polymorphism) ở rất gần gen cần dòng hóa thì cũng có thể bằng phương pháp "gene walking" và "gene jumping" mà dòng hóa được gen đích (xem mục PCR đảo ngược).

Lựa chọn phương pháp tạo thư viện DNA genome: Hiện tại có thể dùng một số loại vector cho thư viện DNA bộ gen (genomic DNA library) như vector phage có nguồn gốc từ phage lambda, cũng như vector cosmid. Nếu DNA genome cần dòng hóa ngắn hơn 20 kb thì có thể dùng vector phage, còn cosmid vector có thể dòng hóa DNA dài đến 45 kb.

Độ dài của genome người và chuột khoảng 3 triệu kb, nếu sử dụng vector phage thì cần phải sàng lọc 150 nghìn thể tổ hợp để có thể có trung bình 1 phiên bản DNA, còn nếu sử dụng vector cosmid thì cần sàng lọc khoảng 70 nghìn thể tổ hợp để có đích tương tự. Hơn nữa, nếu biết trước độ dài enzyme hạn chế của gen đích có thể dùng enzyme hạn chế tương ứng cắt DNA rồi phân đoạn chọn các phân đoạn có độ dài tối thiểu để chế tác thư viện bộ phận. Nhờ cách này có thể giảm thiểu công việc rất nhiều

so với việc sàng lọc toàn bộ DNA genome.

Để có những đoạn DNA đủ ngắn có thể biến nạp có thể có một số phương pháp cắt DNA, nhưng trước hết đều cần điều chế DNA của genome ở dạng tinh chế và càng ít bị tổn thương càng tốt. Phương pháp cắt DNA phổ biến là xử lý có điều chỉnh thời gian bằng enzyme *Sau* 3A, phun tạo mù (tức phun dung dịch DNA dưới áp suất cao qua lỗ nhỏ DNA sẽ cắt đứt đoạn tương đối bằng nhau và có độ dài phụ thuộc áp lực phun, sau đó cần gắn kết đoạn nối (linker) đặc hiệu enzyme hạn chế sẽ sử dụng trong xử lý phage hay plasmid). Thí nghiệm dưới đây sử dụng enzyme *Sau* 3A.

### 1. Vector phage

Việc lựa chọn vector phage loại này hay loại khác phụ thuộc vào chủng loại enzyme hạn chế được sử dụng và độ dài DNA có thể được dòng hóa, còn các thao tác kỹ thuật thì hầu như giống nhau. Dưới đây giới thiệu một số vector phage đã từng sử dụng trong việc chế tác thư viện DNA genome.

**Charon 4A:** có thể clone các đoạn dài 7 - 20 kb vào vị trí của *Eco* RI (G↓AATTC). Có thể chế tác thư viện bằng cách tiêu hóa *Eco* RI và cũng có thể chế tác thư viện từ các đoạn DNA genome cắt bởi các enzyme nhận biết 4 base (*Alu* I (AG↓CT), *Hae* III (GG↓CC)...) rồi gắn với linker cho *Eco* RI. (Bằng các enzyme nhận biết nhiều base như các enzyme này trở lên thì các đoạn DNA được tạo ra không bị cắt quá ngắn và có khả năng chứa gen cấu trúc).

**Charon 28 (và Charon 30):** Có thể clone hóa đoạn DNA dài 6 - 19 kb vào vị trí của *Bam* HI. Có thể sử dụng để tạo dòng các đoạn cắt bởi *Bam* HI (G↓GATCC,) *Bgl* II (A↓GATCT), *Bcl* I (T↓GATCA) nhưng thường sử dụng để dòng hóa các đoạn của *Sau* 3A hoặc của *Mbo* I (↓GATC).

**EMBL 3 (và EMBL 4):** Có thể sử dụng để clone hóa các đoạn dài 9 - 23 kb vào vị trí của *Eco* RI, *Bam* HI, *Sal* I. Do có polylinker ở vị trí dòng hóa nên có thể xử lý nhiều enzyme để có thể làm giảm DNA nền (tức không đủ ngắn để có thể được dòng hóa vào vị trí cắt của một enzyme hạn chế). Thí nghiệm trình bày dưới đây sử dụng hệ Charon 28-*Sau* 3A.

Các hệ vector-enzyme khác cũng có những thao tác tương tự. Đồng thời, cũng có những biến thể khác có thể vận dụng với kết quả tốt.

#### 1.1. Điều chế vector

1) Điều chế DNA Charon 28 (khoảng 100 mg). Do phage DNA này có hai

vị trí xác nhận và tác dụng của *Bam* HI nằm ngoài khu vực điều tiết tự sao của phage nên có thể loại bỏ bớt một đoạn ngắn nhờ enzyme này mà không làm mất năng lực dung khuẩn của phage.

2) Thêm 3 đơn vị *Bam* HI vào 1  $\mu\text{g}$  DNA, cho phản ứng 2 giờ.

3) Lấy 0,5  $\mu\text{g}$  (hoặc một phần nếu lượng ban đầu thay đổi) xử lý 10 phút ở 68 °C rồi làm lạnh nhanh trong nước đá để ngăn trở sự gắn kết trở lại của các đầu dính, sau đó thực hiện điện di trong gel agarose 0,5 % để kiểm tra sự phân cắt hoàn thành. Sau khi xác nhận sự phân cắt, xử lý phenol-chloroform và kết tủa bằng ethanol.

4) Hòa tan trong 500  $\mu\text{l}$  dung dịch chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM và  $\text{MgCl}_2$  10mM.

5) Ủ 1 giờ ở 42 °C làm kết nối các đầu dính.

6) Dùng li tâm chênh lệch mật độ đường để loại bỏ những sản phẩm không cần thiết. Để làm điều đó cần chế dịch chênh lệch mật độ đường từ 10% đến 40% trong dung dịch đệm chứa các thành phần sau: NaCl 1M, Tris-HCl (pH 7,5) 20mM và EDTA 5mM. Cho các lớp dịch đường (theo thứ tự nồng độ giảm dần, dưới cùng 40%, trên cùng 10%) vào ống chuyên dụng cho rotor cao tốc (như RPS 25.1 của Hitachi...), tải 250  $\mu\text{l}$  DNA lên mỗi ống chứa đường chênh lệch mật độ, quay li tâm với rotor doãng góc (swing-out rotor) ở 22.500 v/ph trong 24 giờ.

6) Phân đoạn từng 1 ml.

7) Từ mỗi phân đoạn lấy một lượng nhỏ mẫu để điện di kiểm tra: lấy 5  $\mu\text{l}$  mẫu hòa vào 10  $\mu\text{l}$  nước và 5  $\mu\text{l}$  dung dịch màu tải mẫu 6 $\times$  để 10 phút ở 68 °C trong 10 phút rồi điện di trong gel agarose 0,4%.

8) Thêm dung dịch TE vào phân đoạn có chứa DNA phage sao cho lượng TE bằng hai lần lượng mẫu, rồi gây kết tủa bằng ethanol.

## 1.2. Thí nghiệm cắt chuẩn bị từng phần bằng *Sau* 3A

Cắt từng phần DNA bằng *Sau* 3A quyết định chất lượng của thư viện bởi vì enzyme này tác động càng lâu và với lượng càng nhiều thì tạo được các đoạn DNA càng ngắn từ DNA có phân tử lượng lớn. Hơn nữa, năng lực phân cắt của enzyme này đối với DNA có phân tử lượng lớn là có sự hạn chế và phụ thuộc nhiều vào phương pháp điều chế DNA. Do đó, muốn có thư viện genome thích hợp cần thực hiện bước tiêu hóa chuẩn bị để chọn chế độ xử lý enzyme thích hợp.

1) Cho vào 5 ống mỗi ống 10  $\mu\text{g}$  DNA nguyên liệu (phân tử lượng cao) rồi



thêm vào đó 0,1, 0,3, 1,0 3,0 và 10 đơn vị *Sau* 3A, ủ một giờ.

2) Làm lạnh ở trong nước đá, thêm EDTA cho đến 20 mM để dừng phản ứng. Điện di 3  $\mu$ g DNA trong gel agarose 0,4%.

3) Chọn chế độ xử lý với lượng *Sau* 3A cho nhiều đoạn DNA có phân tử lượng 15 - 20 kb nhất.

### 1.3. Điều chế đoạn DNA để đưa vào tổ hợp

1) Cắt lượng 200  $\mu$ g DNA có phân tử lượng lớn với nồng độ *Sau* 3A đã chọn, bên cạnh hai nồng độ *Sau* 3A lượng lớn hơn (1,5 lần) và nhỏ hơn (0,7 lần).

2) Làm lạnh ở 0 °C, thêm cho đạt 20 mM EDTA để dừng phản ứng.

3) Lấy 3  $\mu$ g để điện di trong gel agarose 4%.

4) Chọn sản phẩm chứa nhiều đoạn DNA có độ dài thích hợp, thực hiện li tâm phân đoạn trong các ống chênh lệch mật độ đường.

5) Chọn các phân đoạn có độ dài 15 - 20 kb (di động chậm hơn MW marker chút ít do nồng độ muối cao), thêm vào đó 2 lần TE (và carrier RNA, cho dễ kết tủa), kết tủa bằng ethanol.

6) Kiểm tra lại phân tử lượng của các đoạn DNA bằng cách điện di trong gel agarose bên cạnh DNA MW marker.

### 1.4. Ligation (kết nối)

1) Thông thường thiết lập phản ứng với các trường hợp kết nối DNA vector và DNA mẫu với một số tỷ lệ nồng độ khác nhau để tăng khả năng hình thành những tổ hợp kết nối thích hợp. Đồng thời, cũng nên thiết lập phản ứng kết nối *không* với chỉ DNA mẫu (không có DNA vector).

Phản ứng chính có thể thực hiện trong ống Eppendorf với tổng lượng 10  $\mu$ l chứa những thành phần sau: 2  $\mu$ g DNA vector, 1  $\mu$ g DNA mẫu, 1  $\mu$ l dung dịch đệm kết nối (ligation buffer) 10 $\times$ , 100 đơn vị T4 ligase, thêm nước cho đủ 10  $\mu$ l. Các thí nghiệm kết nối "không" có lượng bằng 1/2 thí nghiệm chính. (Dung dịch đệm kết nối 10 $\times$  được bán kèm với enzyme T4 ligase).

2) Ủ 14 °C trong 1 đêm.

3) Lấy 2  $\mu$ l dịch từ mỗi ống pha với 5  $\mu$ l nước và 2  $\mu$ l dung dịch màu tải mẫu 6 $\times$  và điện di trong agarose, xác nhận sự kết nối (độ dài DNA vượt quá 50 kb).

### 1.5. *in vitro* packaging

- 1) Lấy SE (Sonic Extract) và FTL (Freeze Thaw Lysate) ra khỏi tủ lạnh sâu, cho tan chảy ở trong nước đá hay 0 °C. (Các dịch này thường đựng trong ống nhỏ với lượng đủ dùng).
- 2) Thêm 3 µl dịch phản ứng chính (nêu ở mục trên) vào lọ SE, trộn nhẹ cho đều rồi thêm 15 µl FTL, trộn nhẹ.
- 3) Làm tương tự với phản ứng kết nối chỉ vector (nêu ở mục trên).
- 4) Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1,5 đến 2 giờ.
- 5) Thêm 500 µl SM rồi thêm một số giọt chloroform, trộn đảo, giữ ở 4 °C.
- 6) Từ mỗi phản ứng (chính và chỉ vector) này lấy 1 - 5 µl trải lên mặt môi trường thạch, kiểm tra tỷ suất packaging. Tỷ suất phage vector lắp ráp cao trong thí nghiệm kết nối chỉ vector có nghĩa là trong nhiều phage ở thí nghiệm chính không có DNA đích kết nối vào (kết quả thư viện không mong muốn).

### 1.6. Sàng lọc

- 1) Cấy đĩa: Thêm khoảng  $50 \times 10^3$  pfu phage đã lắp ráp vào 300 µl vi khuẩn chủ *E. coli* C600 đã cấy qua đêm trong môi trường có pha thêm 0,2% maltose (để cảm ứng tạo thụ thể bề mặt cho phage), ủ 10 phút ở 37 °C.
- 2) Thêm vào 50 ml agarose phủ mặt (top agar, 0,7% agarose-NZYM) để ấm ở 50 °C, rồi rót lên bề mặt thạch NZYM đường kính 150 mm.
- 3) Để top agar cứng thì ủ đĩa ở 37 °C trong 1 đêm.
- 4) Thực hiện plaque hybridization như đối với clone hóa cDNA.

### 1.7. Điều chế thư viện (phương pháp dung giải trên đĩa)

Sau khi có những sản phẩm, tức các đoạn DNA, tổ hợp vào phage vector ta có thể tuyển lựa và làm tăng lượng mỗi một dòng thuần để bảo quản, sản xuất protein đích, sequencing... Việc đó được gọi là *điều chế thư viện*. Dưới đây giới thiệu phương pháp dung giải trên đĩa được coi là có kết quả chắc chắn.

- 1) Thêm 9 ml SM vào đĩa Petri loại 150 mm đã hoàn thành việc sàng lọc, cho lan rộng kỹ, sau đó thêm mấy giọt chloroform.
- 2) Ủ 1 đêm ở 4 °C.
- 3) Dùng pipet hút SM trên mặt thạch, quay li tâm, lấy nước mặt, cho vào

đổ ít giọt chloroform, ủ ở 4 °C. Thu được lysate chứa khoảng 1 triệu pfu/μl. Ở trạng thái này có thể để hàng tháng không giảm hiệu giá, nếu cho thêm 80% glycerol thì bảo quản ở -80 °C đến gần như vĩnh viễn.

## 2. *Vector plasmid và cosmid*

Bên cạnh vector là phage còn có các vector là các plasmid và coplasmid. Plasmid là vector khá dễ sử dụng với enzyme hạn chế có đầu dính cũng như đầu bằng (như pGEMT và pGEMT easy vector) nhưng chỉ đưa được những đoạn DNA ngắn không thể vận dụng trong việc tạo thư viện genome.

Nếu tổ hợp và chế tác được thư viện của các đoạn DNA càng dài (từ tế bào động vật vào vector) thì có thể chế tác được thư viện genome với một số lượng clone tái tổ hợp cần sàng lọc càng ít và có thể sàng lọc được các gen lớn cũng như tập đoàn gen trong một lúc. Bằng *in vitro* packaging có thể đưa DNA vào *E. coli* chủ một cách có hiệu quả. Tuy vậy, mặc dù các đoạn DNA có thể đưa vào phage lambda có thể dài đến 50 kb nhưng khi đó sẽ mất đoạn khá dài cần thiết cho quá trình sinh sản của phage nên các đoạn DNA có thể di nạp bằng phage thường chỉ khoảng 20 kb. Khi đó nên vận dụng plasmid. Một mặt plasmid có ưu điểm dễ tuyển lựa những dòng tế bào đã chuyển thể (biến nạp) nhờ thuộc tính kháng thuốc kháng sinh của các tế bào mang chúng, nhưng mặt khác mặc dù độ dài của plasmid có thể phát triển trong vi khuẩn *E. coli* là không hạn chế nhưng hiệu suất di nạp DNA nhờ quá trình biến nạp tổ hợp DNA-plasmid thường không cao hơn so với *in vitro* packaging, đặc biệt việc di nạp plasmid có phân tử lượng lớn thường có hiệu suất rất thấp. Do đó, để có những thư viện với DNA dài cần đến những tổ hợp plasmid và phage.

Cosmid là một plasmid vector kết hợp những thuộc tính sở trường của plasmid và phage như có miền *cos* (*cos* site) của plasmid và có năng lực *in vitro* packaging của phage nên sau khi di nạp vào *E. coli* chủ thì phát triển như một plasmid, cho nên có thể clone hóa được những đoạn DNA dài đến 45 kb.

Nhờ tổ hợp được với đoạn DNA dài và đã có nhiều thành công, coplasmid sử dụng plasmid pTL 5 được mô tả dưới đây. Bên cạnh đó, trong trường hợp nếu chế coplasmid từ pJB 8 (là plasmid được sử dụng có hiệu quả trong nhiều trường hợp) thì thay thế enzyme hạn chế như *Bst* EII bằng *Hind* III, *Pvu* II bằng *Sal* I, *Bgl* II bằng *Bam* HI cũng như thay thế yếu tố tuyển lựa là tetracycline bằng ampicillin.

## 2.1. Điều chế vector

- 1) Điều chế khoảng 100 µg DNA pTL 5.
- 2) Lấy 50 µg DNA cắt bằng *Bst* EII và 50 µg còn lại bằng *Pvu* II, sau đó chiết xuất bằng phenol và kết tủa bằng ethanol.
- 3) Xử lý cả hai mẫu DNA đã cắt bằng CIP (calf intestinal phosphatase) hoặc BAP (bacterial alkaline phosphatase) để loại bỏ gốc phosphate ở đầu.
- 4) Chiết xuất bằng phenol-chloroform 2 lần rồi kết tủa bằng ethanol.
- 5) Phân cắt cả 2 mẫu DNA nêu trên bằng enzyme *Bgl* II.
- 6) Bằng điện di trong gel agarose 1% phân li và tinh chế các đoạn DNA *Bst* EII-*Bgl* II dài 4,7 kb và đoạn DNA *Pvu* II- *Bgl* II dài 1,6 kb, hỗn hợp lại (vector DNA).

## 2.2. Điều chế đoạn cần gắn

Thực hiện cắt DNA bằng *Sau* 3A tương tự như nêu ở trên, li tâm chênh lệch mật độ đường để thu phân đoạn có độ dài khoảng 35 - 50 kb.

## 2.3. Ligation (kết nối)

- 1) Thêm 100 đơn vị T4 ligase vào hỗn hợp chứa 1 µg DNA di nạp, 1 µg DNA vector, 1 µl dung dịch đệm ligation 10× và cho đủ 10 µl nước cất.

**Dung dịch đệm ligation (kết nối) 10×** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 500mM, MgCl<sub>2</sub> 100mM, DTT 100mM và ATP 10mM.

- 2) Thực hiện kết nối chỉ chứa DNA di nạp cũng như chỉ DNA vector làm đối chứng.

## 2.4. *in vitro* packaging

Thực hiện tương tự với phage vector.

## 2.5. Tải nạp

- 1) Nuôi cấy *E. coli* chủ chủng 490 A *recA*<sup>-</sup> trong 5 ml môi trường LB trong 1 đêm.

(Ký hiệu *recA*<sup>-</sup> cũng như *recA* (đổi lập với *recA*<sup>+</sup>) sau tên chủng vi khuẩn chỉ rằng chủng vi khuẩn này mất khả năng quang hoạt hóa, tức là sau khi bị chiếu tia tử ngoại dù sau đó có được chiếu bức xạ khả kiến (ánh sáng nhìn thấy) thì vi khuẩn cũng không sửa sai được DNA, nên không thể sống sót).

- 2) Quay li tâm 3.000 v/ph trong 10 phút. Thu tế bào.

- 3) Pha thêm 2,5 ml dung dịch  $\text{MgSO}_4$  10mM, trộn đều thành huyền dịch.
- 4) Thêm vào mỗi 100  $\mu\text{l}$  vi khuẩn khoảng 50  $\mu\text{l}$  DNA đã được lắp ráp *in vitro*.
- 5) Để ở nhiệt độ phòng 20 phút.
- 6) Thêm 1 ml môi trường LB, ủ ở 37 °C 45 phút.

## 2.6. Plating (trái đĩa)

- 1) Đặt tấm màng nitrocellulose (vô trùng, không chứa chất tẩy rửa) trên bề mặt đĩa môi trường thạch LB chứa 10  $\mu\text{g/ml}$  tetracycline (thạch LB-tet), sao cho không còn bọt khí dưới màng.
- 2) Trái vi khuẩn đã di nạp lên màng (15.000 khuẩn lạc trên mỗi đĩa 150 mm).
- 3) Ủ ở 37 °C.

## 2.7. Cấy sao bản (replication plating)

- 1) Sau khi trái đĩa ủ khoảng 12 giờ bắt đầu thấy các khuẩn lạc trên mặt màng nitrocellulose. Ủ cho đến khi thấy khuẩn lạc nhỏ vừa đủ thấy thì dừng lại.
- 2) Lấy màng ra và đặt màng lên tấm giấy thấm (đã tiệt trùng) sao cho các khuẩn lạc nằm phía trên.
- 3) Lấy một màng mới đặt lên đĩa thạch LB-tet mới, chờ cho ẩm đều thì đặt tấm màng đã mang khuẩn lạc lên đó, sao cho mặt trên của hai màng áp sát nhau. Có thể in lên hai màng mới (hai bản sao).
- 4) Đặt giấy thấm lên rồi áp phẳng mặt màng cho bề mặt hai tấm màng áp sát nhau.
- 5) Đánh dấu vị trí của các màng lọc bằng cách đâm kim. Lấy màng trên (màng cũ) đặt lên đĩa LB-tet mới sao cho các khuẩn lạc ở mặt trên, ủ ở 37 °C, sau khoảng 1 giờ sẽ thấy lại các khuẩn lạc trên màng cũ và khoảng 3 giờ trên màng bản sao.

## 2.8. Sàng lọc

- 1) Ủ đến khi thấy khuẩn lạc trên màng bản sao.
- 2) Lấy màng bản sao đặt (sao cho các khuẩn lạc bên trên) lần lượt lên các tờ giấy thấm đã thấm sẵn các dung dịch như sau: SDS 10% trong 10 phút, thấm rửa dịch bằng giấy thấm, NaOH 0,5M - NaCl 1,5M trong 3 phút, thấm rửa dịch bằng giấy thấm rồi đặt lên ammonium acetate 1M - NaOH

0,02M trong 3 phút rồi thấm ráo dịch tương tự trên.

3) Rửa màng trong dịch SSC 2×, có giấy ráp Kimwipe hỗ trợ sẽ rửa nhanh văng của khuẩn lạc.

4) Thực hiện lai (hybridization) với phương pháp đã định với mẫu dò DNA thích hợp với gen đích.

## **2.9. Bảo quản**

Có thể bảo quản library ở  $-70^{\circ}\text{C}$  trên màng theo 2 cách.

1) Tải màng lọc gốc lên mặt thạch đĩa LB-tet chứa 5% glycerol, ủ  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ. Sau đó ép lên trên màng đó một màng lọc mới đã làm ẩm bằng glycerol 5%, dùng kim chọc lỗ đánh dấu rồi cho đĩa vào bì chất dẻo hàn kín và để ở  $-70^{\circ}\text{C}$ .

2) Tải màng lọc gốc lên mặt thạch đĩa LB-tet chứa 25% glycerol, cho đĩa vào bì chất dẻo hàn kín và để ở  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## VIII. Tạo tế bào khả biến hay chịu di nạp (competent cell)

Việc di nạp DNA plasmid vào tế bào vi khuẩn *E. coli* là một trong những kỹ thuật trọng yếu và cơ bản của công nghệ DNA tái tổ hợp hay kỹ thuật di truyền học phân tử. Các loại vi khuẩn *E. coli* có năng lực tăng cao trong thu nhận DNA từ bên ngoài gọi là tế bào chịu di nạp hay tế bào khả biến (competent cell). Hiện tượng một vi khuẩn tiếp nhận DNA ngoại lai đó gọi là hiện tượng chịu di nạp (competency) của vi khuẩn. Kỹ thuật tạo vi khuẩn khả biến cần cho việc chế tác DNA tái tổ hợp, tái tạo dòng để xác định trình tự nucleotide, sản xuất protein đích bằng *E. coli*, clone hóa cDNA và tái chế plasmid vector (shuttle plasmid) (vector plasmid rescue). Hiệu suất của tế bào chịu di nạp phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó là chủng loại *E. coli* được sử dụng. Dưới đây mô tả 3 phương pháp tạo *E. coli* chịu di nạp, trong đó phương pháp dùng  $\text{CaCl}_2$  có thể được với các *E. coli* chủng K 12. Tuy đây là phương pháp đơn giản nhưng hiệu suất thấp (với khoảng  $10^5$  -  $10^6$  khuẩn lạc/ $\mu\text{g}$  pBR322 trần). Phương pháp rubidium chloride ( $\text{RbCl}$ ) sử dụng được với các chủng *E. coli* nêu trên với hiệu suất cao hơn ít nhiều ( $10^6$  -  $10^8$  khuẩn lạc/ $\mu\text{g}$  pBR322 trần). Phương pháp Hanahan áp dụng với nhiều chủng *E. coli* như JM 109, C 600, DH 1... Tuy với DH 1, chẳng hạn, có thể thu được  $10^7$  -  $10^9$  khuẩn lạc/ $\mu\text{g}$  pBR322 trần nhưng đây là phương pháp khá phiền phức. *Chú ý* rằng dù áp dụng phương pháp nào thì điều quan trọng nhất vẫn là thời điểm thu vi khuẩn từ lứa cấy có nồng độ vi khuẩn thích hợp và thực hiện chế tác ở  $4^\circ\text{C}$ .

### 1. Phương pháp $\text{CaCl}_2$

- 1) Nuôi cấy 1 ml vi khuẩn *E. coli* đã nuôi qua đêm vào 100 ml môi trường SOB.
- 2) Ủ ở  $37^\circ\text{C}$  cho đến khi có mật độ tế bào  $4 - 9 \times 10^7$  ( $\text{OD}_{550} = 0,2 - 0,4$  đối với vi khuẩn *rec*<sup>+</sup> và  $\text{OD}_{550} = 0,45 - 0,55$  đối với vi khuẩn *rec*<sup>-</sup>), lắc nhẹ nhàng khi ủ.
- 3) Chuyển sang ống đã tiệt trùng. Để trên nước đá 10 - 15 phút.
- 4) Quay li tâm  $1.000 \times g$  trong 15 phút ở  $4^\circ\text{C}$ .
- 5) Đổ bỏ nước mặt, chỉ để lại chút nước không thể rót bỏ hết được, lật úp ống, gõ nhẹ lên mặt giấy thấm một số lần cho hết nước mặt thì tốt.
- 6) Cho vào ống 30 ml *dung dịch* CPG đã làm lạnh, trộn đảo nhẹ.

**Dung dịch CPG** chứa  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50mM, KCl 100mM,

glycerol 10% (w/v) và  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (pH 7,5) 10mM, điều chỉnh pH cuối cùng đến 6,2, hấp cao áp tiệt trùng (hoặc lọc qua lọc vi khuẩn 0,2  $\mu\text{m}$ ).

Cũng có thể *thay thế* dung dịch CPG bằng dung dịch CTG hoặc CMPG có thành phần như sau:

**Dung dịch CTG** chứa  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50mM, thymidine 0,05 mg/ml và glycerol 10%. Lọc qua lọc vi khuẩn hoặc hấp cao áp tiệt trùng.

**Dung dịch CTG** chứa  $\text{CaCl}_2$  10mM, KCl 100mM,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50mM,  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (pH 7,5) 10 mM và glycerol 10% (w/v). Lọc qua lọc vi khuẩn hoặc hấp cao áp tiệt trùng.

7) Để trên nước đá khoảng 30 phút.

8) Quay li tâm 1.000  $\times g$  ở 4 °C trong 15 phút.

9) Bỏ nước mặt, chỉ để lại ít giọt dịch không thể rót bỏ hết.

10) Hòa vào 8 ml CPG đã làm lạnh. (Glycerol có trong thành phần dung dịch CPG là chất chống đông băng, ngăn trở sự hình thành các tinh thể nước đá càng lạnh sâu càng tăng thể tích và có khả năng chọc thủng tế bào vi khuẩn).

11) Rót khoảng 0,2 - 1,0 ml vào ống có nắp (cryo vial, ống Eppendorf 1,5 hay 2,0 ml), đậy kín rồi làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Bảo quản trong nitơ lỏng hoặc ở -70 °C. Khi dùng cho thí nghiệm di nạp thì lấy ra để tan dần trong nước đá.

*Chú ý:* Phương pháp rubidium chloride không mô tả ở đây chỉ khác phương pháp calcium chloride ở việc thay thế dung dịch CPG (hoặc CTG và CMPG) nêu trên bằng *dung dịch RF1* hoặc *dung dịch RF2* dưới đây:

**Dung dịch RF1** chứa RbCl 100mM,  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (pH 7,5) 30mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10mM,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  50mM, glycerol 15% (w/v) và thêm acetic acid 0,2M cho đạt pH 5,8, lọc qua lọc vi khuẩn cỡ không 0,22  $\mu\text{m}$  khử trùng.

**Dung dịch RF2** chứa RbCl 10mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  75mM, glycerol 15% (w/v) và MOPS (pH 6,8) 10mM; (pH cuối cùng 6,8), lọc qua lọc vi khuẩn với cỡ không 0,22  $\mu\text{m}$  khử trùng.

## 2. Phương pháp Hanahan

1) Thực hiện các bước đầu như trên để có vi khuẩn cần trong ống pha



thành huyền dịch trong 8 ml (các bước 1 ~ 9) chỉ khác là ở các bước 6) và 10) thì thay dung dịch CPG bằng *dung dịch FSB*.

**Dung dịch FSB** chứa KCl 100mM,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  45mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10mM, hexamine cobalt chloride 3mM,  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (pH 7,5) 10mM và glycerol 10%; chỉnh pH cuối cùng đến 6,1 - 6,5, lọc qua lọc 0,2  $\mu\text{m}$  khử khuẩn.

2) Để có huyền dịch vi khuẩn *E. coli* pha vào trong 8 ml huyền dịch thu được 280  $\mu\text{l}$  DMSO (dimethylsulfoxide, nồng độ DMSO sẽ là 7%), trộn nhẹ trong 15 phút, để lạnh trên nước đá.

3) Chia 0,2 - 1,0 ml ra các ống 1,5 ml, đậy kín, làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Bảo quản trong nitơ lỏng hoặc ở tủ lạnh sâu  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3. Sử dụng tế bào khả biến

1) Lấy tế bào competent ra khỏi tủ lạnh sâu hay nitơ lỏng, để nhiệt độ phòng cho dung dịch giải rồi đặt vào nước đá (nhưng *tốt hơn là* cho tan từ từ bằng cách để ống trong nước đá).

2) Chia ra các ống, mỗi ống  $\sim 100 \mu\text{l}$ .

3) Thêm vào mỗi ống 1 - 10  $\mu\text{l}$  DNA (ít hơn 1  $\mu\text{g}/\text{ống}$ ), trộn đều nhẹ nhàng trong 5 phút (vẫn giữ lạnh thì tốt hơn).

4) Để trên nước đá 10 - 30 phút.

5) Gây sốc nhiệt bằng cách để vào bể ủ  $42^\circ\text{C}$  trong 50 giây (hoặc ở  $37^\circ\text{C}$  trong 2 phút) (tránh lắc quấy).

6) Đưa nhanh về nước đá. Để khoảng 5 phút.

7) Thêm vào ống 900  $\mu\text{l}$  môi trường SOC (hoặc LB nhưng hiệu suất thường thấp hơn), để ở  $37^\circ\text{C}$  trong 60 phút.

8) Li tâm 100 v/ph trong 5 phút, hút bỏ bớt nước mặt chỉ để lại chút ít, thêm 100  $\mu\text{l}$  LB hòa thành huyền dịch.

9) Nhỏ sang bề mặt thạch đĩa LB chứa chất kháng sinh thích hợp (để tuyển lựa những tế bào đã mang plasmid hay cosmid có gen đề kháng với thuốc) và chất tuyển lựa khác (X-gal với IPTG), dùng que thủy tinh vô trùng (hoặc 5 - 7 viên bi thủy tinh vô trùng) san đều khắp mặt thạch.

10) Ủ qua đêm ở  $37^\circ\text{C}$ .

## IX. Tạo dòng phụ (Subcloning)

Subcloning (tạo dòng phụ) là thao tác gắn một phần của DNA đã được dòng hóa bằng một plasmid vector hay một phage vector vào một plasmid riêng biệt, và là kỹ thuật thiết yếu và căn bản trong các trường hợp cần biến nạp đoạn DNA có phân tử lượng lớn, để giải đọc trình tự nucleotide (giải trình DNA) hoặc đưa vào vector phát hiện...

### 1. Điều chế vector plasmid

Cắt khoảng 2 - 3  $\mu\text{g}$  DNA vector bằng 10 đơn vị enzyme hạn chế. Xác nhận hoàn thành việc phân cắt bằng cách điện di một lượng nhỏ DNA. Nếu cần thiết thì cũng có thể phân tách DNA đã cắt bằng điện di. Nếu đã có hai đầu khác nhau (do cắt bằng 2 enzyme) thì thực hiện chiết xuất bằng phenol-chloroform rồi kết tủa bằng ethanol. Nếu hai đầu giống nhau thì khử bỏ gốc phosphate đầu 5' bằng CIP: thêm 3  $\mu\text{l}$  dung dịch đậm CIP 10 $\times$ , 1 đơn vị CIP, thêm nước cất cho đủ 30  $\mu\text{l}$ , ủ 37 °C trong 1 giờ. Sau đó chiết xuất và kết tủa DNA như làm ở trên. Hai đầu không giống nhau để DNA vector cũng như DNA cần di nạp không tự khép vòng mà kết nối với DNA di nạp có trật tự (định hướng).

### 2. Điều chế DNA cần gắn

Nếu hai đầu đoạn DNA cần di nạp là khác nhau thì cần phải dùng linker. Phản ứng trình tự là phosphoryl hóa linker, ligation rồi cắt bằng enzyme hạn chế.

#### 2.1. Phản ứng làm bằng đầu đoạn DNA cần gắn

##### 2.1.1. Đầu 5'

1) Dùng enzyme Klenow hoàn thành đầu dính 5': Trộn 5  $\mu\text{l}$  (~1  $\mu\text{g}$ ) DNA, 1  $\mu\text{l}$  dNTP (4 loại, mỗi loại 1 mM), 1  $\mu\text{l}$  dung dịch đậm nick-translation 10 $\times$ , 2  $\mu\text{l}$  nước cất và 1  $\mu\text{l}$  enzyme Klenow (~ 2 đơn vị) (tổng cộng 10  $\mu\text{l}$ ). Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

2) Ủ ở 70 °C trong 5 phút để vô hoạt enzyme Klenow. Để nguyên dịch thực hiện phản ứng kết nối linker.

##### 2.1.2. Đầu 3'

1) Để cắt bỏ đầu dính 3' dùng T4 DNA polymerase: Trộn 10  $\mu\text{l}$  (~1  $\mu\text{g}$ ) DNA, 2  $\mu\text{l}$  dung dịch đậm T4 DNA polymerase 10 $\times$ , 1  $\mu\text{l}$  dNTP (4 loại,

mỗi loại 2 mM), 6  $\mu$ l nước cất và 1  $\mu$ l T4 DNA polymerase (~2 đơn vị), ủ ở 37 °C trong 5 phút.

**Dung dịch đệm T4 DNA polymerase 10×** chứa 0,03 M Tris-acetic acid (pH 7,9), 0,66 M potassium acetate, 0,1 M magnesium acetate, 5,0 mM DTT và 1 mg/ml BSA.

2) Thêm 1  $\mu$ l EDTA 0,5 M để dừng phản ứng, chiết xuất phenol-chloroform và kết tủa ethanol.

3) Hòa DNA vào TE hoặc nước cất rồi thực hiện phản ứng kết nối linker.

## 2.2. Phosphoryl hóa linker (linker phosphorylation)

Trộn 1  $\mu$ l (~1  $\mu$ g) linker DNA, 1  $\mu$ l *dung dịch đệm polynucleotide kinase 10×*, 7  $\mu$ l nước cất và 1  $\mu$ l (10 đơn vị) T4 polynucleotide kinase, cho phản ứng ở 37 °C trong 1 giờ.

**Dung dịch đệm polynucleotide kinase 10×** chứa Tris-HCl (pH 7,6) 0,66M, ATP 10mM, spermidine 10mM,  $MgCl_2$  100mM và DTT 150mM.

## 2.3. Kết nối linker (linker ligation)

DNA đã hoàn thành đầu (ở 2.1.) 5  $\mu$ l (0,5 mg), linker DNA đã phosphoryl hóa (ở 2.2.) 5  $\mu$ l (0,5 mg) và T4 ligase 1  $\mu$ l (~300 đơn vị), trộn đều cho phản ứng diễn ra ở 22 °C trong 6 giờ hoặc ở 4 °C qua 1 đêm. Phản ứng diễn ra có sự tham gia của ATP cũng đã có sẵn trong dịch phản ứng ở bước 2.2. ở trên.

## 2.4. Cắt bằng enzyme hạn chế

Do trong dịch chứa nhiều phân tử linker (đã kết nối và chưa kết nối) nên cần một lượng lớn enzyme hạn chế, ủ lâu và dung lượng lớn. Nếu không hoàn thiện bước cắt này thì ở bước sau có thể thu được các clone không mong muốn chỉ chứa các đoạn linker đã kết nối với nhau.

1) Sau khi kết thúc bước ủ linker ligation ở trên, lấy dịch phản ứng đem chiết xuất bằng phenol-chloroform và kết tủa bằng ethanol. Hòa tan DNA với 50  $\mu$ l nước.

2) Trộn vào 50  $\mu$ l DNA thu được với 6  $\mu$ l dung dịch đệm enzyme hạn chế 10× (bản kèm enzyme) và 30 đơn vị enzyme hạn chế.

3) Phân li DNA đích khỏi linker nhờ điện di trong gel agarose.

## 2.5. Kết nối vector với DNA

1) Trộn 1  $\mu\text{l}$  (0,1  $\mu\text{g}$ ) vector DNA, 1  $\mu\text{l}$  (tính theo mol cần gấp 2 - 3 lần DNA vector) DNA cần di nạp, 1  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm ligation  $10\times$ , 7  $\mu\text{l}$  nước cất và 1  $\mu\text{l}$  ( $\sim 300$  đơn vị) T4 ligase, ủ ở 22 °C trong 3 giờ.

Để nguyên dạng dịch phản ứng, trộn trực tiếp với vi khuẩn khả biến để biến nạp.

## 2.6. Sàng lọc

Lấy vi khuẩn từ một số khuẩn lạc, cấy vào 1,5 ml môi trường lỏng và ủ một thời gian, thu vi khuẩn để điều chế plasmid. Cắt bằng enzyme hạn chế rồi điện di để kiểm tra kết quả di nạp. Điều này giúp phân biệt các plasmid có kết nối với DNA đích với các plasmid không có DNA đích. Ngoài ra có thể phát hiện DNA hay gen nhờ các phương pháp hybridization.

## X. Phân tích điều tiết phiên mã nhờ thử nghiệm CAT (CAT assay)

Trong trường hợp cần phải trắc định hiệu quả phiên mã của gen đã được di nạp vào tế bào nhân thực (eukaryota) người ta thường sử dụng gen CAT (chloramphenicol acetyl transferase) như là một gen chỉ báo (reporter gene) và kỹ thuật này được gọi là CAT assay (trắc nghiệm CAT). Đây là trắc nghiệm đơn giản, dễ tái hiện và có độ nhạy cảm cao nên rất tiện lợi. Trong đa số trường hợp, 48 giờ sau khi đưa gen vào tế bào nhân thực người ta đã có thể đo đạc được hoạt tính enzyme của CAT trước khi gen tái tổ hợp vào nhiễm sắc thể.

### 1. Thí nghiệm chính: chuyển nạp gen vào tế bào eukaryota

Kỹ thuật chuyển nạp DNA vào tế bào nhân thực (eukaryota) bằng cách trộn cho kết tủa chung calcium phosphate với DNA và lợi dụng năng lực thực bào của tế bào là kỹ thuật phổ biến, ngoài ra còn có thể sử dụng một số phương pháp khác như micro-injection (tiêm vi thể), phương pháp sử dụng DEAE-dextran và phương pháp sốc điện. Dưới đây trình bày phương pháp kết tủa chung calcium phosphate với DNA là phương pháp đơn giản và được coi là có hiệu quả cao.

- 1) Trước ngày thực hiện chuyển nạp cần trải khoảng  $0,5 - 2 \times 10^6$  tế bào đang ở giai đoạn phát triển theo cấp số nhân vào đĩa môi trường 10 cm. Các loại tế bào HeLa, tế bào L khoảng  $1 \times 10^6$ , tế bào 3Y1 khoảng  $2 \times 10^6$ /đĩa 10 cm là thích hợp.
- 2) Trước khi thêm DNA cần chuyển nạp (trong tổ hợp với vector plasmid) khoảng 1 giờ thì thay đổi môi trường mới.
- 3) Tạo kết tủa  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA trên tế bào bằng cách: thêm 50  $\mu\text{l}$  dung dịch  $\text{CaCl}_2$  2,5 M vào 0,5 ml nước chứa 10 - 20  $\mu\text{g}$  DNA. Sau đó duy trì đảo trộn dịch DNA vừa nhỏ từng giọt dung dịch HBS  $2\times$  cho đến hết 2,5 ml. Khoảng ít phút sau khi bắt đầu nhỏ sẽ thấy kết tủa trắng.

**Dung dịch HBS  $2\times$**  chứa 8,18 g (280 mM) NaCl, 5,95 g (50 mM) HEPES, 0,2 g (2,8 mM)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , thêm nước cho đủ 500 ml. Điều chỉnh pH bằng NaOH 1 M (khoảng 6 ml) cho đến 7,1 ở nhiệt độ phòng, lọc khử trùng rồi bảo quản ở 4 °C nếu cần dùng ngay hoặc ở -20 °C nếu bảo quản lâu.

**HEPES:**     *N*-2-hydroxyethyl     piperazine-*N'*-3-propane

sulfonic acid, dung dịch có tác dụng đệm.

4) Để yên 10 phút, cho tế bào vào rồi ủ 4 giờ.

5) Gây sốc bằng glycerol: rửa trắng tế bào bằng khoảng 10 ml *PBS(-)*, nghiêng đĩa Petri để đổ hết dịch rửa, sau đó cho vào tế bào (vẫn trong đĩa) 1,5 ml *dung dịch 15% glycerol-HBS*, để ở nhiệt độ phòng 0,5 - 3 phút, hút bỏ dung dịch glycerol-HBS, rửa thêm 2 lần nữa bằng dung dịch *PBS(-)* như trên, thêm môi trường và ủ 40 - 48 giờ ở 37 °C.

**Dung dịch 15% glycerol-HBS** chứa 30 ml glycerol 50% (w/v), 50 ml HBS 2×, 20 ml nước cất, lọc khử trùng, bảo quản ở 4 °C.

**PBS(-) (phosphate buffered saline)** chứa 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,16 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , thêm nước cất cho đủ 1 lít, hấp cao áp tiệt trùng.

6) Sau khi nuôi cấy 40 - 48 giờ, rửa và tập trung tế bào để thực hiện CAT assay (nhằm kiểm tra có gen vector vào tế bào hay chưa).

## 2. CAT assay

1) Sau khi rửa tế bào bằng khoảng 10 ml *PBS(-)*, chuyển tế bào vào ống, quay li tâm 2.000 v/ph trong 5 phút để tập trung tế bào.

2) Huyền dịch hóa tế bào bằng 100 µl Tris-HCl 0,25M pH 7,5.

3) Phá vỡ tế bào bằng hóa băng - giải băng 6 lần (cho vào tủ lạnh -70 °C 30 phút rồi ngâm trong nước ở 37 °C cho đến khi tan chảy hết), kết hợp xoay trộn.

4) Quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 phút để thu nước mặt.

5) Lấy một phần nhỏ để đo protein (có thể thu được khoảng 2 - 5 µg/µl từ 1 đĩa 10 cm).

6) Lấy một lượng để có khoảng 30 - 100 µg protein, thêm 25 µl Tris pH 7,5.

7) Hút lấy 25 µl nước mặt vào một ống Eppendorf 1,5 ml, thêm 50 µl (0,1 µCi) [ $^{14}\text{C}$ ]chloramphenicol 4mM (pha trong Tris 0,25M, hãng Sigma...).

8) Ủ 1 giờ ở 37 °C.

9) Thêm ethyl acetate 0,3 ml, lắc trộn mạnh, quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 giây, thu lấy lớp ethyl acetate ở trên, chú ý tuyệt đối không được hút theo nước phía dưới.

10) Thêm 0,3 ml ethyl acetate lần nữa, chiết xuất rồi hòa lẫn hai đợt ethyl acetate đã thu được. Cho vào bình hút ẩm (deccicator) và hút bằng aspirator (máy hút thủy tĩnh) để làm khô. *Chú ý* không dùng máy hút chân không (vacuum pump) vì ethyl acetate sẽ nhanh chóng làm hỏng máy. Để loại bỏ ethyl acetate còn có thể bơm thổi khí nitơ vào ống.

11) Hòa tan lại trong 20  $\mu$ l ethyl acetate, nhỏ giọt đốm (spot) cách nhau 1 cm trên gần một đầu (cách mép 2 - 3 cm) của một bản sắc ký lớp mỏng silica gel. Khi đó, dùng một ống mao quản 5  $\mu$ l dùng một lần (disposable capillary) hoặc pipet tự động loại nhỏ, mỗi lần nhỏ khoảng 1  $\mu$ l, lặp lại mấy lần để có một giọt đốm.

12) Sử dụng dung môi chloroform-methanol (95:5) trong chậu chuyên dụng cho sắc ký lớp mỏng, nhúng mép dưới của bản gel trong dung môi, triển khai sắc ký (khoảng 1 đêm) cho đến khi dung môi ngấm lên cách mép trên 0,5 - 1,0 cm. (*Chú ý* nhúng đủ sâu coi chừng dung môi sụt xuống trong quá trình sắc ký).

13) Làm khô gel, tự ký phóng xạ (autoradiography). Thường thấy trên film X-quang mỗi lần có 3 băng (đốm đen) của chloramphenicol, 1'-methyl chloramphenicol và 3'-methyl chloramphenicol.

14) Trong trường hợp cần thiết thì dùng kéo cắt bản sắc ký để thu lấy đốm (spot), đo cường độ phóng xạ bằng liquid scintillation counter để xác định tỷ lệ [ $^{14}$ C]chloramphenicol đã methyl hóa (thành 1'-acetyl chloramphenicol di động trong gel kị thủy với chloroform-methanol nhanh hơn chloramphenicol, còn 3'-acetyl chloramphenicol di động nhanh nhất). Sự có mặt của hai sản phẩm chuyển hóa từ chloramphenicol chứng tỏ bộ gen mã hóa enzyme CAT nằm trên genome của vector đã hoạt động, và như vậy khả năng các gen trên DNA tái tổ hợp trong tế bào chủ (tế bào eukaryota) biểu hiện tính trạng là cao.

## Chương 3

# KỸ THUẬT PHÂN TÍCH XÁC NHẬN PHÂN TỬ

## I. Kỹ thuật lai Southern (Southern hybridization)

Kỹ thuật chuyển/lai Southern (hay phương pháp Southern transfer/hybridization) là tổ hợp kỹ thuật được Southern sáng tạo được công bố vào 1975, nhờ đó có thể đồng định một nucleic acid làm mẫu dò, hay dò (probe) đã đánh dấu với một DNA có miền mang trình tự nucleotide bổ sung, tức là dùng mẫu dò đã biết để xác nhận sự hiện diện của DNA tương đồng trong mẫu nghiệm, là một trong những phương pháp hữu ích áp dụng trong nghiên sinh học phân tử. DNA mẫu nghiệm có thể là nguyên vẹn. Thêm vào đó, trong nhiều trường hợp, sau khi cắt DNA bằng enzyme hạn chế và điện di trong gel agarose để phân li rồi chuyển qua và cố định trên màng nitrocellulose (hoặc màng nylon, sau này hay dùng hơn do bền và cố định DNA rất tốt và có thể tái sử dụng), thực hiện lai với mẫu dò đã đánh dấu có thể kiểm xuất được những đoạn DNA trên màng có trình tự bổ sung với mẫu dò.

Thí nghiệm trình bày dưới đây là nguyên gốc sử dụng mẫu dò (probe) đánh dấu phóng xạ. Ngày nay các mẫu dò đánh dấu phi phóng xạ đã phổ biến, có thể đặt mua và vận dụng thay thế, khi đó phương pháp autoradiography (tự ký phóng xạ) được thay thế bằng phương pháp fluorography (huỳnh quang ký, hoặc sử dụng thiết bị đọc non-RF fluorescence, như FMBIO® II Multi-View, chẳng hạn) hoặc phương pháp đánh dấu biotin phát hiện được nhờ streptavidin (hoặc DIG phát hiện bằng kháng thể đặc hiệu DIG, tương ứng) đánh dấu enzyme alkaline phosphatase (AP) để nhận biết kết quả lai với sự hỗ trợ của hợp chất quang hóa (chemiluminescent substrate) như CDP-Star, Lumi-Phos 530, CSDP (hoặc đánh dấu enzyme horse radish peroxidase (HRPO) với cơ chất quang hóa là ECL hoặc LumiGLO). Phương pháp trình bày dưới đây sử dụng mẫu dò đánh dấu phóng xạ như ban đầu phát kiến ra phương pháp này.

### 1. Chuyển Southern (Southern transfer)

1) Phân giải DNA mẫu bằng enzyme hạn chế, điện di để phân li trong gel agarose. Khi đó nên điện di đồng thời trong 1 làn gel DNA MW marker đã đánh dấu phóng xạ như [<sup>32</sup>P]Hind III marker DNA, chẳng hạn.



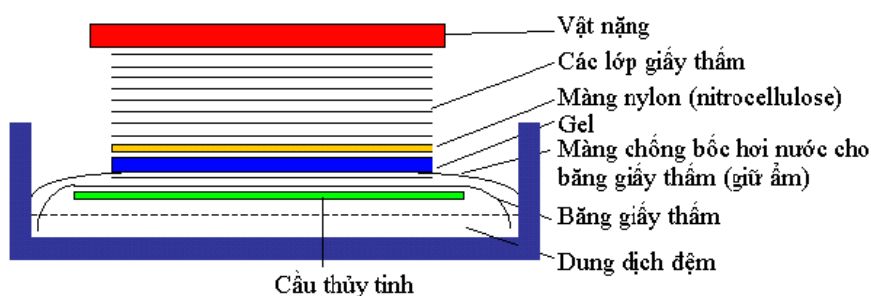
*Chú ý:* cũng có cách khác là dùng DNA MW marker không đánh dấu phóng xạ nhưng sau khi điện di (trong gel chứa ethidium bromide) thì đặt dọc theo gel một thước milimetre phát huỳnh quang dưới UV và chụp ảnh (bằng pollaroid film) (hoặc đo đoạn đường dịch chuyển của các băng đích nếu bản gel điện di với số lượng làn hạn chế) để đánh dấu kích thước phân tử theo độ dài dịch chuyển các băng.

2) Ngâm gel vào 150 ml dung dịch NaOH 0,2N - NaCl 0,6M, trộn lắc nhẹ trong 30 phút đến 1 giờ để làm biến tính DNA. *Chú ý* không ngâm gel agarose quá lâu trong dung dịch kiềm vì gel sẽ bị mềm và dễ vỡ và dính vào màng khi chuyển nucleic acid và làm cho màu nền (background) quá đậm.

3) Rửa gel bằng nước loại ion rồi ngâm trong 150 ml Tris-HCl (pH 7,5) 0,6M trộn đảo nhẹ trong 1 giờ, giữa chừng thay dịch. Bằng cách này trung hòa gel.

4) Cắt một tấm màng nitrocellulose hoặc nylon kích thước bằng kích thước tấm gel, ngâm vào nước cất cho thấm ướt đều rồi ngâm vào *dung dịch SSC 10×*.

**Dung dịch SSC 10×** chứa 3 M NaCl và 0,3 M sodium citrate (pH 7,0).



**Hình 7: Sơ đồ chuyển nucleic acid nhờ tính thấm**

5) Chuyển thấm DNA: việc chuyển được thực hiện nhờ dòng dung dịch đậm ngấm dần từ dưới lên (từ chậu chứa) nhờ tính mao dẫn (qua tấm giấy lọc lót) từ một tấm giấy lọc lớn vắt qua tấm thủy tinh làm cầu để dung dịch SSC 10× lưu dẫn từ trong chậu chứa qua một tấm giấy lọc 3MM đến gel rồi màng nitrocellulose rồi đến các lớp khăn giấy (có tác dụng hút dịch) đặt trên (hình 7).

*Chú ý:* có thể thay thế cầu thủy tinh và tờ giấy thấm nêu trên bằng một tấm mút nhưng coi chừng các chất bảo quản trong mút có thể làm trở ngại blotting và tạo màu nền đậm). Lớp khăn giấy (phía trên gel và màng) được ép bởi một tấm thủy tinh phẳng và một khối đủ nặng (khoảng 200 - 300 g, để các lớp dính sát vào nhau). Thời gian để chuyển bằng phương pháp mao dẫn khoảng 10 giờ (để qua đêm). Cần *lưu ý* bọc kín cả hệ thống bằng màng polyethylene (Saran wrap) để giấy không bị khô trong suốt quá trình chuyển thấm. Hơn nữa, ngày nay người ta áp dụng thay thế phương pháp chuyển thấm DNA nêu trên bằng dòng điện một chiều (electroblotting) qua hai bản cực có diện tích lớn (semi-dry transfer equipment). Cần tuân thủ quy trình của nhà sản xuất. Do chuyển nhanh (10 phút đủ để chuyển các đoạn DNA lớn hơn 10 kb), chất lượng chuyển cao như DNA ít bị xê lệch và DNA không bị giảm lượng do bị phân giải nên semi-dry transfer system được ưa dùng. Ban đầu chuyển ở điện áp 10 V trong 1 giờ ở 5 °C, các DNA ngắn chuyển tốt hơn ở điện áp thấp, sau đó tăng điện áp đến 40 V trong 2 giờ ở 5 °C để kết thúc chuyển.

6) Khi kết thúc chuyển, đánh dấu vị trí điểm xuất phát điện di và chiều điện di (cắt một góc của màng bằng kéo, chẳng hạn). Ngâm trong SSC 2×, rửa nhẹ.

7) Kẹp màng giữa hai tấm giấy lọc, xử lý làm khô ở 80 °C trong 2 giờ.

*Chú ý:* có thể sử dụng UV để cố định DNA trên màng lọc. Khi đó dùng đèn có bước sóng 254 nm, đặt màng ướt ở trên một miếng giấy thấm 3MM ướt (tránh màng bị khô) và dưới đèn khoảng 25 cm trong 1 - 2 phút.

## **2. Lai (hybridization)**

1) Ngâm màng đã khô trong dung dịch SSC 3×, ủ trong 30 phút ở 60 °C.

2) Thực hiện lai tiền khởi (prehybridization) trong 2 giờ với dung dịch prehybridization ở 65 °C.

**Dung dịch prehybridization** chứa 25 ml SSC 20×, 10 ml SDS 10%, 10 ml *dung dịch Denhardt* 10×, thêm nước (55 ml) cho đủ 100 ml.

3) Cho màng vào một túi polyethylene, chú ý không gấp màng, (tốt nhất là kẹp màng vào giữa hai nửa của một tấm polyethylene đã gấp đôi, sau đó hàn ba mép còn lại của hai lớp, cắt một góc để bơm dịch lai), thêm vào túi lượng vừa đủ *dung dịch hybridization* (~10 ml), hàn miệng túi, chú ý tránh để tồn lưu bọt khí trong túi. Ủ ở 65 °C trong 1 đêm.

**Dung dịch hybridization** chứa 1,5 ml NaCl 5M, 0,1 ml Tris-HCl 2M (pH 8,0), 0,05 ml EDTA 0,5M, 1 ml *dung dịch Denhardt 10×*, 1ml SDS 10%, 0,5 ml DNA cá hồi đã biến tính 1 mg/ml và mẫu dò đánh dấu bằng  $^{32}\text{P}$  đã biến tính  $1 - 3 \times 10^7$  cpm, tổng 10 ml.

**Dung dịch Denhardt 10×** chứa 2% BSA fraction V, 2% polyvinyl pyrrolidone và 2% ficoll 400 (Pharmacia); sử dụng BSA thường gặp nấm mốc nên khi dùng mới pha, bảo quản ở tủ lạnh chỉ được 1 tháng.

*Chú ý:* Một số màng lọc như Gene Screen *Plus*... cần phải lai tiền khởi (prehybridization) 8 giờ.

Có thể tái sử dụng màng lọc nylon (như Nitran của S&S...), khi đó ngâm màng trong NaOH 0,2N ở nhiệt phòng trong 2 giờ loại bỏ mẫu dò không có tương tác bổ sung, rửa nước cho sạch rồi trung hòa bằng dung dịch chứa 0,2 M Tris-HCl (pH 7,2) và 0,1% SDS. Ngâm trong túi polyethylene chứa dung dịch prehybridization trong 2 giờ ở 65 phút rồi bảo quản ở tủ lạnh, bảo quản được lâu trong buồng lạnh sâu. Khi dùng lấy ra cho ấm ở 65 °C rồi thực hiện từ bước lai (hybridization).

### 3. Lai gel khô

Do thiết bị tổng hợp DNA ngày càng phổ biến, việc sử dụng DNA tổng hợp làm mẫu dò cho lai Southern ngày càng trở nên có thể. Trong những trường hợp đó, không cần sử dụng màng mà có thể sử dụng gel trực tiếp để lai với cảm độ cao và ngày càng trở nên phổ biến. Các bước có thể tiến hành như sau:

1) Chế gel agarose 1% (thông thường 0,6 - 8%). Khi đó đổ lớp gel hơi mỏng hơn thông thường ít nhiều (chỉ khoảng 3 - 5 mm). Điện di (với điện áp cao hơn hay thời gian kéo dài hơn so với gel có nồng độ agarose thấp hơn), xử lý kiểm và trung hòa *gần* giống như đối với màng nitrocellulose hay màng nylon.

-Xử lý kiểm: NaOH 0,5N - NaCl 0,15M, nhiệt độ phòng 30 phút;

-Trung hòa: Tris (pH 7,0) 0,5M - NaCl 0,15M, nhiệt độ phòng, 30 phút.

2) Sau khi điện di, nhuộm ethidium bromide, chụp ảnh lưu tư liệu, nếu cần.

Tuy nhiên, nếu khi điện di đã cho DNA MW marker phóng xạ (như [ $^{32}\text{P}$ ]-DNA đã tiêu hóa bằng *Hind* III) rồi thì bỏ qua bước chụp ảnh.

3) Đặt tấm gel trên 2 tấm giấy lọc 3MM, đặt phía trên bằng một tấm Saran wrap (tờ giấy bọc mỏng bằng chất dẻo), rồi đặt cả lên gel dryer (máy sấy gel). Hút khô ở nhiệt độ phòng trong 30 - 60 phút, tiếp tục hút ở nhiệt độ 60 °C trong 30 - 40 phút. Sau bước này, gói gel khô bằng tấm Saran wrap có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng.

4) Ngâm vào chậu nhỏ chứa nước cất, giấy lọc 3MM hút nước, gel lại ngâm nước và trương lên. Cần thận tháo gel ra, ngâm vào SSC 20 phút ở nhiệt độ phòng.

5) Lai tiến hành tương tự như Southern hybridization nêu ở trên. Ngâm gel vào dung dịch lai ở nhiệt độ thích hợp (không quá 60 °C vì tránh để gel mềm) 16 giờ.

**Dung dịch lai** chứa 2,5 ml SSPE 20×, 0,1 ml SDS 10%, 0,1 ml DNA của cá hồi hoặc của *E. coli* (1 sợi) 1 mg/ml, mẫu dò đánh dấu phóng xạ 1 -  $2 \times 10^7$  cpm và 7,3 ml nước (tổng 10 ml).

**SSPE 20×** dung dịch đệm chứa 0,2 M phosphate (pH 7,0), 3,6 M NaCl và 20 mM EDTA. Tương tự Southern hybridization, cho gel vào túi polyethylene rồi rót vào (đối với bản gel 20 cm × 10 cm) 10 ml dung dịch lai, để qua đêm trên máy lắc nhẹ.

6) Lấy gel khỏi túi, lần lượt ngâm (trong chậu) trong các dung dịch như sau:

-SSC 6×, nhiệt độ phòng, 15 phút, hai lần;

-SSC 6×, nhiệt độ phòng, 4 giờ;

-SSPE 5×, nhiệt độ lai 3 phút;

-SSC 6×, nhiệt độ phòng, 30 phút.

7) Khi thay dịch cần chú ý vì gel khó thấy, dùng tay đeo găng mà ép nhẹ gel khi rót bỏ dịch.

8) Đặt gel lên 1 tờ giấy thấm 3MM, đặt bằng Saran wrap, thực hiện tự ký phóng xạ.

9) Có thể tái sử dụng. Xử lý kiềm loại bỏ mẫu dò rồi trung hòa như với màng. hong khô ở nhiệt độ phòng trên tờ giấy thấm.

10) Để đánh dấu DNA tổng hợp bằng phóng xạ, có thể đánh dấu đầu 5' bằng [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP hoặc T4 polynucleotide kinase và phương pháp nối dài môi. Phương pháp nối dài primer thường có độ nhạy cao. Khi đó tổng hợp DNA khuôn (dài 30 - 40 nucleotide) và primer (khoảng 8 nucleotide) rồi

dùng phương pháp multiprimer để tổng hợp mẫu dò.

*Chú ý:* Có thể tính được nhiệt độ lai từ thành phần của mẫu dò, khi đó nhiệt độ lai thích hợp (tính bằng độ C) là:  $2 \times (A+T) + 4 \times (C+G) - 5$ .

## II. Lai Northern (Northern hybridization) và lai thẩm đốm (dot blot hybridization)

Đối với việc phân tích RNA đặc hiệu thể hiện trong tế bào hay tổ chức, sau khi điện di có thể sử dụng các phương pháp Northern blot để xác định độ lớn và lượng của chúng, và với mẫu RNA pha loãng dần có thể bán định lượng bằng phương pháp phân tích dot blot (thẩm đốm). Trong cả hai trường hợp đều cần phải làm biến tính RNA rồi cố định lên màng (nitrocellulose, nylon) rồi kiểm xuất RNA bằng mẫu dò đặc hiệu. Phương pháp biến tính RNA có thể là phương pháp formaldehyde, glyoxal, hydroxymethyl thủy ngân. Dưới đây mô tả phương pháp Northern blot dùng formaldehyde và phương pháp dot blot dùng hydroxymethyl thủy ngân ( $\text{CH}_3\text{HgOH}$ ). Mặc dù mô tả ở đây nhưng tác giả khuyến cáo không nên dùng hydroxymethyl thủy ngân vì rất độc cũng như nếu sử dụng thời gian kéo dài sẽ có tác động môi trường trầm trọng nếu không có quy chế quản lý sớm.

Phương pháp dot blot đơn giản, hữu hiệu khi muốn đồng định số lượng lớn mẫu RNA lượng lớn nhưng nhiều khi (do nhiễm nhiều protein...) nên thường đậm và có khả năng cho kết quả dương tính với RNA khác loại nhưng có sự tương đồng (trình tự nucleotide). Trong phương pháp phân tích Northern blot, do kiểm xuất được RNA dưới dạng một băng đặc hiệu nên không gặp trở ngại trên. Cho nên thông thường cần thực hiện phân tích dot blot chọn ra các mẫu dương tính để phân tích Northern blot với mẫu dò đặc hiệu.

### 1. Northern hybridization (biến tính RNA bằng formaldehyde)

1) Ngâm bản gel, lược, chậu điện di trong xà phòng rồi rửa kỹ, sau đó ngâm chúng vào nước ôxy già ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 5% khoảng 1 giờ, lại rửa nước. Ngâm rửa kỹ như vậy để tránh tác động của RNase vốn rất sẵn do vi khuẩn, nấm... sản sinh và rất bền trong tự nhiên.

2) Cho nước đã tiệt trùng vào agarose, làm tan chảy sau đó thêm 1/5 lượng cần thiết dung dịch đệm điện di  $5\times$ , cho formaldehyde cho đạt 2,2 M. Nếu cần chế 40 ml gel agarose 1% thì cân 0,4 g agarose, thêm 24,8 ml nước tiệt trùng, gia nhiệt làm dung giải, sau đó cho 8,0 g dung dịch đệm điện di gel  $5\times$  và 7,2 ml formaldehyde, trộn đều, rồi chế bản gel.

**Dung dịch đệm gel điện di  $5\times$**  chứa MOPS (3-(morpholino)propane sulfonic acid) (pH 7,0) 0,2M, sodium acetate 50mM và EDTA 5mM, hấp cao áp tiệt trùng.

3) Điều chế mẫu: cho vào trong một ống Eppendorf 4,5  $\mu$ l (gần 20  $\mu$ g) RNA, 2,0  $\mu$ l dung dịch đệm gel điện di 5 $\times$ , 3,5 ml formaldehyde, 10,0  $\mu$ l formamide, trộn đều, để 15 phút ở 55 °C.

4) Thêm 2  $\mu$ l dung dịch màu tải mẫu 10 $\times$ , điện di ở 100 V, size marker cũng xử lý tương tự và cùng điện di cho đến khi BPB tiến gần đến mép cuối của gel là được.

**Dung dịch màu tải mẫu 10 $\times$**  chứa glycerol ở nồng độ 50%, EDTA 1mM, BPB 0,4%, XC 0,4%, hấp cao áp tiệt trùng.

5) Ngâm gel trong nước 5 phút, khi đó thay nước một số lần.

6) Ngâm gel trong dịch chứa NaOH 50mM và NaCl 10mM trong 10 phút.

7) Ngâm gel 10 phút trong Tris-HCl 0,1M pH 7,5.

8) Ngâm gel 20 phút trong SSC 10 $\times$ .

9) Chuyển rời lai như đối với Southern hybridization, nhưng sau khi chuyển không rửa bằng dịch có nồng độ muối thấp trước khi làm khô.

*Chú ý:* Size marker có thể là DNA đánh dấu phóng xạ nhưng marker không đánh dấu cũng tốt, xử lý biến tính tương tự với mẫu RNA. Cũng có thể sử dụng RNA marker (28S, 18S rRNA...), điện di đồng thời với RNA mẫu, có thể quan sát dưới UV sau khi nhuộm gel bằng ethidium bromide. Khi đó, ngâm gel 30 phút, thay nước một số lần, ngâm vào ammonium acetate 0,1M 30 phút, ngâm vào dung dịch chứa ethidium bromide 0,5  $\mu$ g/ml, ammonium acetate 0,1M và 2-mercaptoethanol 0,1M. Sau đó ngâm 30 phút trong dịch chứa ammonium acetate 0,1M và 2-mercaptoethanol 0,01M.

## **2. Dot blot hybridization (sử dụng hydroxymethyl thủy ngân)**

1) Ngâm thiết bị thấm đốm (blotting apparatus) 1 giờ trong hydroxymethyl thủy ngân 10%, rửa nước.

**Thiết bị thấm đốm** cấu tạo từ một khay mẫu là một tấm phẳng có khoan sẵn hàng loạt lỗ để nếu lót ở phía dưới một tấm màng cho sát khay mẫu và nhỏ dung dịch mẫu lên trên thì dung dịch mẫu thoát qua màng và các nucleic acid sẽ được giữ lại trong màng, một hoặc hai tấm đệm cho khay mẫu và một khoang chân không (khay) ở phía dưới nối với một máy hút chân không hoặc vòi hút.

2) Ngâm một màng lọc 12 cm  $\times$  8 cm trong nước, sau khi ngâm hoàn toàn thì ngâm trong SSC 20 $\times$  trong 1 giờ.

3) Thiết định màng vào thiết bị blotting (trên tấm gôm kẹp giữa khoang chân không và khay mẫu), đồng thời để tránh hydroxymethyl thủy ngân thoát ra cần phải thiết lập chai bẫy nước (water trap) cho máy hút (aspirator) hoặc bơm chân không.

4) Hòa tan RNA (đến 20  $\mu$ g) trong SSC 3 $\times$ , CH<sub>3</sub>HgOH 10mM, chế dãy pha loãng trong dung dịch này. Cho máy hút chạy nhẹ tạo áp suất âm vừa phải, nhỏ khoảng 30  $\mu$ l mẫu lên mỗi lỗ khay mẫu, mẫu sẽ được hút vào màng. Hút khoảng 20 - 30 phút.

5) Xử lý nhiệt cho khô màng rồi thực hiện tương tự đối với Southern hybridization. Để giảm phát màu nền cần lai tiền khởi, tức thực hiện việc che phủ, hay phong bế, các phần chưa kết hợp của màng. Với mục đích đó có thể dùng sữa loại bơ (skim milk) hoặc nhũ thanh (iris cream liquor).



### III. Phương pháp xác định trình tự nucleotide của DNA

Các phương pháp xác định trình tự nucleotide (giải trình nucleotide, giải trình DNA) có thể chia thành hai nhóm. Thứ nhất là phương pháp Maxam-Gilbert với việc sử dụng việc đánh dấu hóa học đặc hiệu các nucleotide và thứ hai là phương pháp dideoxy làm dừng một cách đặc hiệu nucleotide sự tổng hợp DNA bằng DNA-polymerase nhờ sử dụng các dideoxynucleotide. Do thao tác đơn giản và các nguyên liệu được thương mại hóa dưới dạng các bộ chế sẵn (kit) nên gần đây hầu như để xác định trình tự nucleotide người ta chỉ sử dụng phương pháp dideoxy. Còn phương pháp Maxam-Gilbert như là phương pháp kiểm chứng sự nối dài primer, S1 mapping và xác định trình tự nucleotide đoạn đặc hiệu tương đối ngắn.

Trong cả hai phương pháp, người ta đều cần cắt ngắn các đoạn DNA vừa phải để giải trình dần. Từ kết quả các đoạn DNA sau một loạt lần giải trình người ta có thể ghép nối để có trình tự nucleotide hoàn chỉnh. Có thể mô hình hóa cách đọc trình tự nucleotide như sau:

*Kết quả một số lần giải trình (1), (2), (3):*

1)TGCGGTACTTCCGTACGTA

2) CGTACGTATAGGCCCGTATGCAAATC

3)  GCAAATCGGCCTTCGTT

đoạn lặp (overlap)

đoạn lặp

*Trình tự thực:*

TGCGGTACTTCCGTACGTATAGGCCCGTATGCAAATCGGCCTTCGTT

Trong đó, các đoạn lặp là các trình tự giúp ta đọc được toàn bộ độ dài của phân tử DNA. Kỹ thuật giải trình tiến bộ nhất cũng chỉ cho phép xác định trình tự DNA dưới 1.000 nucleotide (khoảng 300 - 400 base với BioRad sequencer kiểu 370A, khoảng 800 - 1.000 base với Shimidzu Fluorescent sequencer kiểu DSQ 1000L). Với các plasmid vector hiện có ta có thể clone hóa đoạn DNA dài hơn 10.000 base. Khi đó, sau khi xác định trình tự một đoạn DNA kề primer chung M13 (cả phía F lẫn R) người ta có thể dựa vào trình tự này để thiết kế những môi oligonucleotide mới để giải trình đoạn DNA tiếp theo. Sau đó lại tiếp tục thiết kế môi mới bắt cặp được với đoạn vừa xác định để giải trình đoạn tiếp theo nữa. Người thường gọi các thao tác này là "gene walking". Với các đoạn DNA khác nhau là sản phẩm DNA tế bào đã phân giải bằng enzyme hạn chế hoặc cắt đứt cơ giới bằng phun tạo mù (nebulisation) hay sóng siêu âm thì để giải trình đầy đủ người ta cần phải dòng hóa (cloning) trong *E. coli* sau đó giải

trình từng clone rồi tìm đoạn lắp, thực hiện "gene walking" để giải quyết toàn bộ chiều dài của genome.

### 1. Phương pháp dideoxy

Enzyme DNA-polymerase của vi khuẩn *E. coli* sử dụng DNA một sợi làm khuôn và một oligonucleotide bổ sung với nó làm mồi và tiến hành phản ứng lắp thêm nucleotide bổ sung làm kéo dài DNA xuất phát từ gốc 3'-OH của mồi theo hướng 5'→3'. Cơ chất cho phản ứng này là 4 loại deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), và nếu thêm vào đó một dideoxyribonucleotide triphosphate (ddNTP) thì tại vị trí bổ sung sẽ hoặc là dNTP hoặc là ddNTP được lắp vào chuỗi. Nếu dNTP lắp vào chuỗi thì (cung cấp gốc 3'-OH nên) phản ứng tiếp tục dài thêm nhưng nếu ddNTP lắp vào thì phản ứng nối dài bị dừng lại (do thiếu gốc 3'-OH). Nếu chọn tỷ lệ dNTP/ddNTP thích hợp thì từ một khuôn DNA hàng loạt chuỗi bổ sung được tổng hợp có độ dài khác nhau một cách ngẫu nhiên do dừng phản ứng nối dài một cách đặc hiệu từ vị trí đối ứng với nucleotide bổ sung với ddNTP đó. Trên nguyên lý đó Sanger và CS đã sáng tạo ra phương pháp dideoxy.

Trong thực tế enzyme DNA polymerase của *E. coli* còn có hoạt tính 5'→3'-exonuclease, cho nên để tránh sự phân giải primer theo hướng 5'→3' người ta sử dụng enzyme Klenow là enzyme đã loại bỏ hoạt tính 5'→3'-exonuclease để thực hiện các phản ứng đối ứng với bốn loại base (bốn ống cho bốn loại ddNTP). Đồng thời trong các phản ứng người ta còn sử dụng một loại base được đánh dấu [<sup>32</sup>P] hoặc [<sup>35</sup>S] hoặc chất phát huỳnh quang để đánh dấu sợi DNA được tổng hợp mới. Điện di sản phẩm mới được tổng hợp trong gel polyacrylamide-urea có độ phân giải cao (để phân tách các đoạn DNA có độ dài khác nhau) rồi thực hiện tự ký phóng xạ hoặc kiểm tra huỳnh quang người ta xác định được trình tự nucleotide qua trình tự độ dài của các sản phẩm đặc hiệu các ddNTP đầu mút. Một lần phản ứng có thể xác định được khoảng 300 base. Gần đây, nhờ kỹ thuật đánh dấu huỳnh quang tiến bộ người ta đánh dấu trực tiếp lên mỗi loại ddNTP với chỉ một loại hợp chất phát màu huỳnh quang, bốn loại ddNTP nhuộm bốn loại hợp chất phát màu khác nhau, nên với chỉ một ống phản ứng cũng có thể phát hiện được chủng loại base cuối các đoạn bổ sung đối ứng với loại ddNTP xác định. Phương pháp này được sử dụng phổ biến thay thế hầu như hoàn toàn phương pháp sử dụng phóng xạ.

Các plasmid thường được sử dụng để xác định trình tự nucleotide của các đoạn DNA đã tổ hợp vào vị trí đa clone hóa (MCS: multi-cloning site) của vector phage hệ M 13mp hoặc vector plasmid hệ pUC... Ngày

nay, nhiều loại plasmid vector được sáng tạo, áp dụng và thương mại hóa, trong đó có những loại vector đầu bằng như pGEMT Vector và pGEMT Easy Vector (Promega Co.) áp dụng trong cloning DNA rất hữu hiệu bên cạnh những vector plasmid đầu dính.

Dưới đây giới thiệu một số chủng loại vector và kỹ thuật tương ứng được sử dụng khá lâu, những sáng tạo mới gần đây trong lĩnh vực này có nguyên tắc tương tự nhưng với những cải tiến để áp dụng hơn.

## 1.1. Điều chế DNA khuôn

### 1.1.1. Phage hệ M 13mp

#### **\*Tái tạo dòng trong phage hệ M 13mp:**

- 1) Bằng T4 DNA ligase ta kết nối (ligate) đoạn DNA cần xác định trình tự nucleotide với vài chục nanogram DNA vector được điều chế nhờ phân cắt DNA dạng tái tạo (RF - replicative form) của phage hệ M 13mp bằng enzyme hạn chế thích hợp.
- 2) Trộn dịch kết nối với 100 - 200  $\mu$ l *E. coli* chịu di nạp JM 105, để trên nước đá 40 phút.
- 3) Xử lý nhiệt 2 phút ở 42 °C hoặc ở 50 °C trong 50 giây (gây sốc nhiệt).
- 4) Để lại trong nước đá (khoảng 5 phút).
- 5) Rót agarose (0,6 - 0,7%) trong TY 2 $\times$  vào ống có nắp đã tiệt trùng rồi bảo ôn ở 42 °C. Trộn vào 3,0 ml agarose (0,6 - 0,7% trong TY 2 $\times$ ) lần lượt các thành phần gồm 25  $\mu$ l IPTG (100 mM), 100  $\mu$ l dịch vi khuẩn JM 105 đã bồi dưỡng 1 đêm, 100 - 200  $\mu$ l vi khuẩn đã di nạp (phage) và 50  $\mu$ l dung dịch X-Gal (2%) trong dimethyl formamide rồi trải trên môi trường đĩa LB. Hong ráo mặt thạch.

**Môi trường TY 2 $\times$**  chứa 16 g tryptone, 10 g cao nấm men, 5 g NaCl và nước cất q.s. 1.000 ml.

**X-Gal** (5-bromo-4-chloro-3-indoline- $\beta$ -galactoside) được pha 2% trong dimethyl formamide trước khi dùng, nhưng cũng có thể pha rồi cất ở -20 °C trong ống với lượng nhỏ đủ dùng hết một lần.

- 6) Để cho mặt thạch rắn, ủ ở nhiệt độ phòng trên mặt phẳng.
- 7) Lật đĩa, ủ ở 37 °C trong 1 đêm.

Những thể đã tổ hợp hình thành những plaque đục (turbid plaque), các thể không tổ hợp hình thành những plaque màu lục (blue plaque), các

thể khuyết tròn cũng hình thành plaque đục nhưng rất hiếm.

**\*Điều chế DNA một sợi:**

1) Cho 2 ml môi trường TY 2× vào ống nghiệm có nắp đã tiệt trùng.

**Môi trường TY 2×** 16 g chứa tryptone, 10 g cao nấm men (yeast extract), 5 g NaCl, hòa trong 1 lít nước cất, hấp cao áp tiệt trùng.

2) Cấy 20 µl lúa cấy JM 105 đã qua đêm vào mỗi ống TY 2×.

3) Dùng que tăm đã tiệt trùng cấy plaque đục vào các ống. Cần *chú ý* để cấy các plaque độc lập.

4) Ủ 5 - 6 giờ ở 37 °C trên máy lắc, cần lắc mạnh, nếu lắc không đủ sẽ phát triển kém, lượng thu được của phage sẽ ít. Quay li tâm ống nghiệm nuôi cấy 3.000 v/ph trong 2 phút.

5) Thu nước mặt chuyển sang ống Eppendorf 1,5 ml. Quay li tâm 12.000 v/ph trong 5 phút.

6) Chuyển 1,3 ml dịch mặt sang ống Eppendorf mới, *chú ý* để dịch không lẫn tế bào vi khuẩn.

7) Thêm 20 µl dung dịch PEG 6000 20% - NaCl 2,5M, trộn đều, để 15 phút.

8) Quay li tâm 12.000 v/ph trong 5 phút, loại bỏ nước mặt. Khi này có thể nhìn thấy tua phage, đặc biệt nếu dùng rotor cố định góc (angle rotor) thì dễ nhận thấy tua phage hơn.

9) Quay li tâm thêm 2 - 3 phút ở 12.000 v/ph, loại bỏ nước mặt, có thể hút bằng pipet hoặc dốc ống đổ đi.

10) Hòa tua phage trong 100 µl TE 10mM. Thêm 50 µl phenol hoặc 100 µl phenol-chloroform (1:1), trộn đều, để nhiệt độ phòng 15 phút.

11) Trộn lẫn nữa rồi quay li tâm ở nhiệt độ phòng trong 3 phút, dùng rotor doãng góc (swing-out rotor) thì tốt hơn.

12) Hút nước mặt sang ống Eppendorf mới, thêm 10 µl sodium citrate 3M (pH 6,0), 250 µl ethanol, trộn đều.

13) Để kết tua ở -20 °C trong 1 đêm.

14) Quay li tâm 10 phút ở 12.000 - 16.000 v/ph ở 4 °C trong 10 phút.

15) Loại bỏ nước mặt, tráng bằng ethanol 70%.

- 16) Lại li tâm, loại bỏ hết nước mặt.
- 17) Làm khô tua DNA bằng máy làm khô bằng chân không, hoặc để khô tự nhiên.
- 18) Hòa tan DNA vào TE, tùy lượng DNA nhiều hay ít mà thêm lượng TE thích hợp. Bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 1.1.2. Plasmid hệ pUC

- 1) Clone hóa đoạn DNA cần xác định trình tự nucleotide vào plasmid hệ pUC, điều chế DNA plasmid bằng phương pháp kiềm (phương pháp Birnboim).
- 2) Thêm 2  $\mu\text{l}$  NaOH 2N vào 18  $\mu\text{l}$  dung dịch DNA (trên 0,5 pmol), để ở nhiệt độ phòng 5 phút.
- 3) Thêm 8  $\mu\text{l}$  ammonium citrate 5M, sau đó 100  $\mu\text{l}$  ethanol để kết tủa.
- 4) Để trên đá khô (dry ice) 5 phút hoặc ở  $-20^{\circ}\text{C}$  30 phút cho tạo kết tủa.
- 5) Quay li tâm 12.000 - 16.000 v/ph trong 5 phút ở  $4^{\circ}\text{C}$ , loại bỏ nước mặt.
- 6) Tráng bằng ethanol 70%.
- 7) Quay li tâm lần nữa, loại bỏ nước mặt.
- 8) Để khô hay hút khô bằng máy làm khô bằng chân không (buồng chân không), bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 1.2. Điều chế dung dịch nucleotide cho phản ứng dideoxy

Để điều chế dung dịch nucleotide phải sử dụng nước cất hoặc nước lọc siêu sạch đã hấp cao áp tiệt trùng còn bảo quản thì phải ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- 1) Điều chế dung dịch 10 mM mỗi loại nucleotide dNTP trong nước cũng như dung dịch ddNTP làm dung dịch tồn trữ, bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Pha dịch hỗn hợp dNTP (các dịch nucleotide có giảm lượng từng loại): pha loãng 20 lần dịch tồn trữ đậm đặc các loại (thành dung dịch 0,5mM các loại), sau đó pha bốn hỗn hợp trong bốn ống ( $G^0$ ,  $A^0$ ,  $T^0$  và  $C^0$ ) với lượng các loại theo bảng sau.

Nếu sử dụng  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  hoặc  $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dCTP}\alpha\text{S}$  thì

Dung dịch	$G^0$	$A^0$	$T^0$	$C^0$
dGTP 0,5mM	<b>1 <math>\mu\text{l}</math></b>	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	<b>20 <math>\mu\text{l}</math></b>
dATP 0,5mM	20 $\mu\text{l}$	<b>1 <math>\mu\text{l}</math></b>	20 $\mu\text{l}$	<b>20 <math>\mu\text{l}</math></b>
dTTP 0,5mM	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	<b>1 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>20 <math>\mu\text{l}</math></b>
TE	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	<b>20 <math>\mu\text{l}</math></b>

Nếu sử dụng [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP hoặc [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP $\alpha$ S thì

Dung dịch	G <sup>0</sup>	A <sup>0</sup>	T <sup>0</sup>	C <sup>0</sup>
dGTP 0,5mM	1 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
dATP 0,5mM	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
dTTP 0,5mM	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
TE	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$

3) Các dịch phản ứng ddNTP được điều chế từ dung dịch tồn trữ (ở mục 1.) nêu ở trên):

- 0,15mM ddGTP: 3,0  $\mu\text{l}$  ddGTP tồn trữ + 197  $\mu\text{l}$  nước;
- 0,3mM ddATP: 6,0  $\mu\text{l}$  ddATP tồn trữ + 194  $\mu\text{l}$  nước;
- 0,4mM ddTTP: 8,0  $\mu\text{l}$  ddTTP tồn trữ + 192  $\mu\text{l}$  nước;
- 0,1mM ddCTP: 2,0  $\mu\text{l}$  ddCTP tồn trữ + 198  $\mu\text{l}$  nước.

4) Dịch hỗn hợp dNTP/ddNTP:

- G/G<sup>0</sup>: 17  $\mu\text{l}$  G<sup>0</sup> + 10  $\mu\text{l}$  dịch phản ứng ddGTP;
- A/A<sup>0</sup>: 13  $\mu\text{l}$  A<sup>0</sup> + 10  $\mu\text{l}$  dịch phản ứng ddATP;
- T/T<sup>0</sup>: 19,1  $\mu\text{l}$  T<sup>0</sup> + 10  $\mu\text{l}$  dịch phản ứng ddTTP;
- C/C<sup>0</sup>: 36  $\mu\text{l}$  C<sup>0</sup> + 10  $\mu\text{l}$  dịch phản ứng ddTTP.

*Chú ý:* Dịch hỗn hợp dNTP/ddNTP là dịch được đưa vào bốn ống phản ứng khác nhau. Trong mỗi ống nếu nồng độ ddNTP quá cao thì phản ứng sẽ nhanh chóng dừng lại và ta không thể xác định được trình tự khá dài, khi đó cần phải chỉnh giảm lượng ddNTP để có phản ứng tối ưu.

5) Dịch bỏ khuyết (chase solution): pha 5  $\mu\text{l}$  *mỗi loại* dNTP tồn trữ với 80  $\mu\text{l}$  nước cất (mỗi loại trong một ống).

6) Với [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP, thường cần pha thêm dCTP không đánh dấu. Nếu hoạt tính phóng xạ tương đối của [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP cao (3.000 Ci/mmol) thì có thể tăng tỷ lệ dCTP không đánh dấu pha thêm. Còn nếu hoạt tính phóng xạ tương đối của [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP thấp (khoảng 400 Ci/mmol) thì không cần phải làm giảm hoạt tính phóng xạ bằng dCTP phi phóng xạ.

### 1.3. Gắn kết DNA khuôn với môi

1) Điều chế môi 0,5 pmol/ml đáp ứng mục đích đặt ra (bổ sung với khuôn). Có thể sử dụng primer chế sẵn cho phage hệ M 13mp và plasmid hệ pUC có trình tự GTA AAA CGA CGG CCA GT (17 base). Nếu dùng

mỗi CAG GAA ACA GCT ATG AC (17 base) thì có thể giải trình tự nucleotide theo chuỗi ngược lại (dựa vào khuôn là sợi bổ sung).

*Chú ý:* Hai primer này bắt cặp được với các vector hai sợi nêu trên ở vị trí gần điểm kết nối vector với DNA clone hóa. Sau khi xác định được một đoạn trình tự DNA clone hóa thì dựa vào trình tự đó mà thiết kế và tổng hợp các môi oligonucleotide mới để có thể giải trình các đoạn tiếp theo của DNA clone hóa.

2) Trộn các hóa chất: 5,0  $\mu$ l dịch DNA khuôn (trên 0,5 pmol), 1,0  $\mu$ l primer (0,5 pmol/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l *dung dịch đệm Klenow 10 $\times$* , 2,5  $\mu$ l nước. Li tâm nhẹ.

**Dung dịch đệm Klenow 10 $\times$**  chứa Tris-HCl (pH 8,0) 100mM và MgCl<sub>2</sub> 50mM.

3) Để 1 giờ ở 55 - 60 °C cho gắn kết.

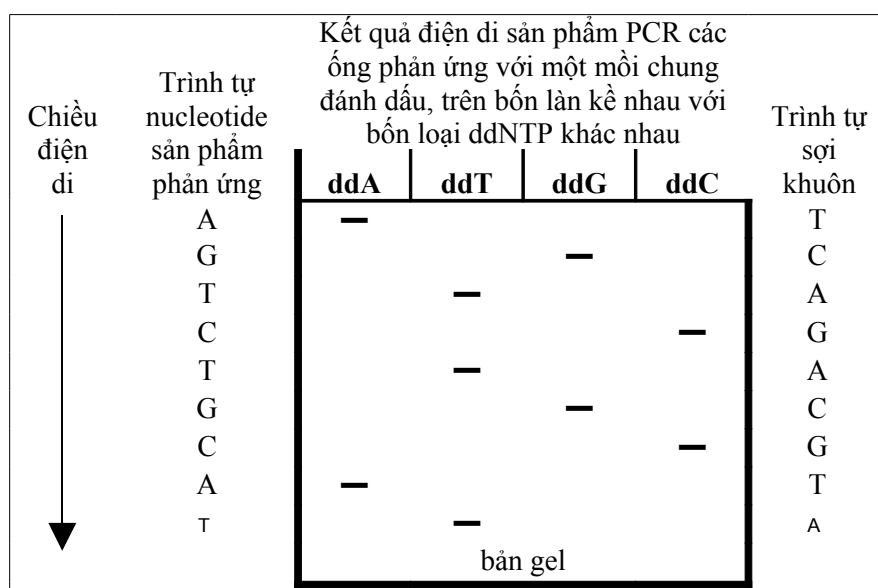
#### 1.4. Phản ứng dideoxy

Nguyên lý phương pháp như sau. Giả sử ta có đoạn DNA sau vị trí gắn môi ta có trình tự nucleotide 5'-TCA GAC GTA-3', vậy trình tự bổ sung với nó là 5'-AGT CTG CAT-3'. Nếu ta cho phản ứng tổng hợp DNA trên khuôn DNA này bằng enzyme Klenow hoặc bằng phản ứng luân nhiệt với DNA-polymerase chịu nhiệt như *Taq* polymerase, *rTaq* polymerase trong hỗn hợp có môi nêu trên và bốn loại dNTP trong đó mỗi loại dNTP được thay thế một phần bằng một ddNTP cùng loại. Khi đó, sau phản ứng PCR (*xem mục XIV: PCR*), từ khuôn DNA một sợi nêu trên, ta có thể có các sản phẩm rất khác nhau do các ddNTP bổ sung ngẫu nhiên tham gia phản ứng và sau đó làm phản ứng dừng lại do không cung cấp đuôi 3'-OH cần thiết cho phản ứng. Như vậy ta sẽ có các sản phẩm sau:

1. ~A\*
2. ~AG\*
3. ~AGT\*
4. ~AGTC\*
5. ~AGTCT\*
6. ~AGTCTG\*
7. ~AGTCTGC\*
8. ~AGTCTGCA\*
9. ~AGTCTGCAT\*

trong đó ~ là vị trí của môi (primer), còn A\*, T\*, G\* và C\* là các dideoxyribonucleotide tương ứng.

Nếu với một DNA khuôn duy nhất nêu trên, có bốn ống phản ứng khác nhau mỗi ống có bổ sung chỉ một loại ddNTP và với một môi trường thì sau khi phản ứng và điện di trên bốn lần gel khác nhau (ddA, ddT, ddG và ddC), ta có thể có các sản phẩm đánh dấu có điểm kết thúc với một nucleotide tương ứng. Nếu điện di trong môi trường có thể phân tách các đoạn này theo độ lớn của khối lượng phân tử (sản phẩm ngắn dịch chuyển nhanh hơn sản phẩm dài) và sau đó xử lý để phát hiện kết quả điện di ta sẽ xác định được trình tự các loại điểm kết thúc theo mức độ tăng dần của đoạn đường dịch chuyển của các băng ở trong gel. Kết quả có thể trình bày như hình dưới đây.



**Hình 9: Nguyên lý phản ứng phương pháp dideoxy đọc trình tự nucleotide với bốn ống phản ứng bổ sung bốn ddNTP khác nhau**

#### **\*Phản ứng dideoxy:**

- 1) Cho vào 4 ống Eppendorf mỗi ống 2  $\mu$ l một trong các dịch hỗn hợp dNTP/ddNTP các loại G, A, T, C.
- 2) Cho hỗn hợp gồm 1,0  $\mu$ l dCTP (16,7  $\mu$ M), 1,0  $\mu$ l enzyme Klenow và 1,0  $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (3.000 Ci/mol) vào dịch DNA khuôn gắn kết với môi. Trộn đều rồi li tâm nhẹ.
- 3) Cho hỗn hợp thu được vào các ống A, T, G và C, mỗi ống 2,0  $\mu$ l.
- 4) Để 37 °C cho phản ứng xảy ra.



- 5) Thêm 2  $\mu$ l chase solution, để 15 phút ở 37 °C cho phản ứng xảy ra.
- 6) Thêm 4  $\mu$ l dịch màu trộn formamide, trộn đều.

**Dịch màu trộn formamide** chứa 10  $\mu$ l formamide, XC 0,05%, BPB 0,05% và EDTA 1mM. Formamide có tác dụng làm ngăn cản sự phục hồi sợi đôi DNA.

- 7) Biến tính bằng nhiệt ở 90 - 95 °C trong 3 phút. Tải 2  $\mu$ l vào mỗi lỗ của gel. Sau khi biến tính bằng nhiệt có thể bảo quản ở -20 °C.

## 1.5. Sequencing gel (gel giải trình)

### 1.5.1. Điều chế dung dịch acrylamide (để chế gel polyacrylamide)

- 1) Trộn các hóa chất theo bảng dưới đây để có dung dịch acrylamide phù hợp với nồng độ gel cần chọn.

Nồng độ gel (%)	5	6	8	12	20
Urea (g)	50	50	50	50	50
TBE 20 $\times$ (ml)	5	5	5	5	5
Dịch polyacrylamide 40% (ml)*	12,5	15	20	30	50
Nước, pha cho đủ (qs) (ml)	qs 100	qs 100	qs 100	qs 100	qs 100

\*Dịch polyacrylamide 40% được chế bằng cách trộn 190 g acrylamide với 10 g *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (bis-acrylamide) trong 500 ml nước, bọc chắn ánh sáng và bảo quản ở 4 °C. *Chú ý* acrylamide là chất độc thần kinh, cần dùng bao tay và tránh hít phải bụi.

- 2) Ngay trước khi chế tác gel pha thêm 1/10 APS (ammonium persulfate) 10% và 20 TEMED.

### 1.5.2. Chế tác gel

- 1) Rửa sạch các tấm thủy tinh bản gel, sau đó lau bằng ethanol và để khô.
- 2) Sau khi bản thủy tinh khô xử lý mặt trong của tấm có tai (do cắt bột) bằng silicone để khi bóc thủy tinh dễ dàng tách rời khỏi gel và không làm gel bị hư. Tuy nhiên, *có thể không nhất thiết phải bôi silicone*. Kẹp thanh ngăn (spacer) vào giữa các bản thủy tinh, chắn ba cạnh bảo đảm gel lỏng không chảy lọt, kẹp chặt bằng kẹp rồi đặt nằm ngang.
- 3) Sau khi thêm 10% APS và TEMED và trộn đều dịch acrylamide, dùng syringe hoặc pipet (cỡ lớn để hút một lần hoặc chỉ ít lần) lấy dịch acrylamide cho vào khe hở giữa hai tấm thủy tinh khuôn gel sao cho giữa hai tấm không có bọt khí. Sau khi đầy dịch gel ráp lược sâu khoảng 7 mm. Nếu lược răng nhọn thì ráp lưng của lược (như một tấm cách - spacer) chú ý đừng quá sâu vượt quá đường vạch đánh dấu trên tấm kính không tai.

Sau khi gel cứng hay trước khi điện di thì rút (lưng) lược ra và cắm phía răng lược nhọn thay vào vị trí đó (chú ý, ráp răng lược không quá sâu để tránh làm biến dạng gel (mặt đáy lõ gel cầu vồng) nhưng không quá nông để đủ làm ngăn cách các khoảng răng lược. Khe hở giữa hai răng lược liền kề là nơi tải mẫu cần điện di.

### 1.5.3. Điện di

1) Ráp thiết bị điện di theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Có loại cần rút (một cách cẩn thận) lược khỏi gel, có loại rút lưng lược khỏi gel rồi cắm phía răng lược vào vị trí đã rút đó để tạo những khoảng hở giữa các răng làm khe tải mẫu. Kiểm tra độ kín giữa bản gel với thiết bị điện di, đổ đầy TBE vào chậu điện di. Dùng syringe lớn kèm kim tiêm (uốn cong) hút TBE này rồi phun vào dưới đáy bản gel để loại trừ bọt khí mắc kẹt ở đáy gel. Tải dịch màu trộn formamide vào gel và điện di tiền khởi (điện di chuẩn bị).

2) Trước khi tải mẫu dùng pipet hút hết urea tan từ gel khỏi khe tải mẫu (slot), nếu dùng lược răng nhọn thì sau khi rửa urea cắm răng lược vào đầu trên của gel. Mẫu được tải vào đáy lỗ bằng pipet có đầu nhỏ (Gilson...) hoặc ống thủy tinh đầu nhỏ tạo thành lớp mỏng ở đáy lỗ.

3) Điện di phát nhiệt nhưng cần tiến hành dưới điện áp cao trong chừng mực các tấm thủy tinh không bị vỡ. Dưới 1.500 - 3.000 V cần điều chỉnh để cường độ dòng điện trong phạm vi không quá lớn. Lấy mức di động của dịch màu làm tiêu chuẩn để dừng điện di. Tốc độ di động phụ thuộc vào nồng độ của gel nhưng với gel polyacrylamide 6% thì BPB tương ứng với khoảng 23 nucleotide còn XC với 110 nucleotide. (Với các máy giải trình tự động thì việc theo dõi bằng màu này là không cần thiết nhờ khả năng đọc và lưu thông tin thực thời).

### 1.5.4. Tự ký phóng xạ (autoradiography)

Sau khi kết thúc điện di, lấy bản gel khỏi thiết bị, lấy tấm thủy tinh có tai khỏi gel (nhờ silicone mà việc lấy ra khá dễ dàng), thực hiện tự ký phóng xạ bằng một trong những phương pháp sau đây.

1) Cho gel lên bề mặt một tấm film X-quang đã sử dụng (film cũ), đặt gel bằng một tấm Saran wrap, đưa vào buồng tối và đặt lên đó một tấm film X-quang mới để thực hiện tự ký phóng xạ ở  $-70^{\circ}\text{C}$ .

2) Để nguyên bản gel trên tấm thủy tinh, thấm gel bằng acetic acid 10% rồi methanol 10%, để yên 15 - 20 phút, chuyển gel sang giấy thấm 3MM, làm khô trong máy sấy gel, sau đó tiến hành tự ký phóng xạ (trong buồng tối, ép sát gel lên tấm film X-quang, để 0,5 đến 1 giờ rồi rửa film hiện ảnh).

*Chú ý:* Phản ứng trên đây nhằm trình bày lại *bước sơ khai của phản ứng giải trình nucleotide* đã từng được thực hiện trước đây. Ngày nay với phát kiến ra enzyme DNA-polymerase chịu nhiệt có nguồn gốc từ vi khuẩn chịu nhiệt *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerase, *rTaq* polymerase), ddNTP nhuộm phi phóng xạ (non-RF-dyed ddNTPs như ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit của Perkin Elmer Co.), máy luân nhiệt tự động hóa (thermocycler, programmed incubator) và thiết bị quang học nhận biết bức xạ huỳnh quang đọc bản gel trong suốt quá trình điện di (như Model 307A DNA Sequencer của Applied Biosystems kết nối computer hệ Macintosh, hoặc DSQ-1000L Automated Fluorescent DNA Sequencer của Shimadzu Co. kết nối computer hệ Windows...), tính phiền tạp của việc giải trình DNA giảm đi nhiều và với hiệu suất cao hơn hẳn.

Nguyên lý của phương pháp như sau. Nếu bốn loại ddNTP được đánh dấu bằng bốn loại chất phát huỳnh quang khác biệt thì ta với một ống phản ứng ta có thể thu được các sản phẩm khác nhau và nếu điện di và nhận diện được bức xạ huỳnh quang khác biệt ta có thể xác định được trình tự phản ứng.

### 1.6. Sequencing DNA với máy luân nhiệt và DNA-Sequencer tự động

Với **kỹ thuật mới** những bước cần thực hiện hầu như không thay đổi nhiều là chế tác gel polyacrylamide-urea và xử lý nhiệt kết hợp dịch màu trộn formamide sản phẩm sau phản ứng tổng hợp nối dài mỗi (PCR với một mỗi) và tải mẫu vào bản gel. Với việc sử dụng hỗn hợp phản ứng đánh dấu điểm cuối (terminator ready reaction mix) để có dịch tải vào gel chỉ cần trộn trong một ống đánh dấu hỗn hợp dưới đây rồi thực hiện **phản ứng tổng hợp DNA trên máy luân nhiệt** và xử lý như nêu ở các bước tiếp theo.

- 9,0 µl Terminator Ready Reaction Mix,
- 3 - 6 µl Template DNA,
- 3,2 pmol Primer và
- nước cất q.s. 20 µl.

Trong đó, Template DNA có thể là ssDNA 0,1 µg hoặc dsDNA 0,3 - 0,5 µg, hay sản phẩm PCR (10 - 30 ng/µl) 3 - 6 µl.

Kết quả điện di sản phẩm một ống phản ứng với bốn loại dNTP nguyên liệu đánh dấu huỳnh quang khác nhau			
Chiều điện di	gel	Trình tự màu phát quang khi gặp bức xạ kích thích	Trình tự sợi khuôn
↓	—	xanh lục	A
	—	tím xanh	G
	—	đỏ	T
	—	xanh lam	C
	—	đỏ	T
	—	tím xanh	G
	—	xanh lam	C
	—	xanh lục	A
	—	đỏ	T
	—	đỏ	A

**Hình 10: Nguyên lý phản ứng phương pháp dideoxy đọc trình tự nucleotide với hỗn hợp bốn ddNTP đánh dấu huỳnh quang khác nhau.**

Các ddNTP gắn chất phát bức xạ cảm ứng khác nhau khi kích thích bởi UV: ddATP gắn chất huỳnh quang phát sáng lục, ddGTP gắn chất huỳnh quang phát sáng tím xanh, ddTTP gắn chất huỳnh quang phát sáng đỏ và ddCTP gắn chất huỳnh quang phát sáng xanh lam), các mảnh DNA mang đầu huỳnh quang sẽ được lần lượt ghi lại khi dịch chuyển (nhờ điện di) qua đầu đọc (bố trí ở khoảng cách cố định so với độ dài bản gel) của máy sequencer tự động và tín hiệu tương ứng được ghi lại trong file tương ứng trong computer.

- 1) Thực hiện phản ứng luân nhiệt (tương tự PCR, xem mục XV chương 3) như sau: 95 °C trong 10 giây, hạ nhanh xuống 50 °C và duy trì trong 5 giây, nâng nhiệt nhanh lên 60 °C và duy trì trong 3 - 4 phút, lặp lại 25 chu kỳ luân nhiệt, cuối cùng duy trì mẫu ở 4 °C cho đến khi lấy ra và kết tủa sản phẩm bằng ethanol.
- 2) Chuẩn bị một ống Eppendorf 1,5 ml và cho sẵn vào đó 2,0 µl sodium acetate 3M (pH 4,6) và 50 µl 95% ethanol.
- 3) Chuyển cả 20 µl sản phẩm phản ứng qua ống 1,5 ml, trộn đều và đặt trên băng (nước đá) 10 phút.
- 4) Quay li tâm 10 - 15 phút ở 13.000 v/ph, loại bỏ hết lớp ethanol (bằng

pipet hoặc đổ bỏ cũng được), tráng nhẹ rửa bằng 250  $\mu$ l ethanol 75% rồi loại bỏ hoàn toàn lớp ethanol (tránh quấy vào tua không thể nhìn thấy), làm khô.



**Hình 11: Kết quả giải trình gen trên máy tự động.**

Thông tin được ghi và lưu lại dưới dạng các băng DNA có màu huỳnh quang khác nhau, dưới dạng sóng và trình tự nucleotide.

5) Sau khi chuẩn bị gel, kiểm tra kết nối máy điện di với máy vi tính, thiết định protocol và thư mục về mẫu rồi điện di tiền khởi để kiểm tra độ sạch của bản gel (chủ yếu là bề ngoài tấm thủy tinh vùng quỹ đạo của đầu dò đọc huỳnh quang, nếu chưa sạch phải lau lại bằng isopropyl alcohol).

6) Xử lý dịch màu trộn formamide (chuẩn bị trước **dung dịch loading**

**buffer** bằng cách trộn formamide khử ion và EDTE (pH 8,0) 25mM chứa với tỷ lệ formamide:EDTA-Blue dextran là 5:1). Cho vào ống chứa sản phẩm phản ứng sạch nêu trên 4 - 6  $\mu$ l dịch màu formamide, trộn xoáy và li tâm tập trung.

7) Xử lý nhiệt (đưa vào nước sôi 1 phút rồi đưa nhanh về nước đá đang tan cho đến khi tải mẫu).

8) Tải vào gel polyacrylamide-urea đã ráp trong máy Sequencer tự động như trình bày ở trên. Thể tích mẫu cần tải thường là 4 - 6  $\mu$ l. Kiểm tra chế độ đọc và lưu thông tin trên máy tính kết nối với máy Sequencer. *Chú ý*, trong nhiều trường hợp tải mẫu ở các giếng gel kế tiếp nhau có thể dẫn đến hiện tượng nhiễu thông tin do có sự giao thoa giữa các làn kề nhau, khi đó tải gel cách giếng làm giảm hiện tượng này. Nếu cần tải tất cả các giếng thì nên tải hai lần. Lần đầu tải dịch phản ứng vào các lỗ giếng cách khoảng, điện di 10 phút rồi tắt máy (mở nắp thì máy tự động dừng) và tải mẫu vào các giếng xen kẽ còn lại.

9) Cho máy chạy 10 giờ (qua đêm). Các thiết bị Sequencer tự động sẽ tự động dò đọc sự dịch chuyển của các đoạn DNA trong gel một cách định kỳ (một số lần trong 1 phút, tùy thiết kế) trên một lộ tuyến cắt ngang đường dịch chuyển của DNA và lưu giữ thông tin cho việc phân tích kết quả (cũng như biên tập (edit) kết quả) trên máy vi tính. Với cách kiểm tra thực thời này thì các mảnh DNA có khối lượng phân tử càng nhỏ thì càng phát hiện sớm và lần lượt đến phát hiện phân tử có khối lượng lớn hơn.

## **2. Phương pháp Maxam-Gilbert**

Phương pháp Maxam-Gilbert thực hiện đánh dấu hóa học từng phần đặc hiệu với bốn loại nucleotide (A, T, G và C). Sau đó, cắt phân tử DNA này một cách đặc hiệu tại vị trí đã đánh dấu. Cuối cùng, điện di sản phẩm phân giải DNA thu được trong gel polyacrylamide. Di động của các đoạn DNA trong điện trường phụ thuộc vào độ dài của chúng, nhờ đó xác định được trình tự nucleotide. Phương pháp này hầu như không còn được sử dụng mô tả ở đây với mục đích tham khảo.

1) Dùng polynucleotide kinase đánh dấu đầu 5' hoặc dùng enzyme Klenow đánh dấu đầu 3' của DNA bằng [ $^{32}$ P], sau đó dùng enzyme hạn chế để cắt hoặc phân li bằng cách tách sợi (strand separation), điều chế các đoạn DNA đánh dấu một sợi.

2) Hòa tan [ $^{32}$ P]DNA trong 20  $\mu$ l nước cất, thêm 5  $\mu$ l DNA (1 mg/ml) tinh dịch cá hồi.

- 3) Chia dịch DNA nêu trên ra 5 ống Eppendorf mỗi ống 5  $\mu$ l.
- 4) Các mẫu được tiến hành đánh dấu hóa học của 5 loại base như nêu dưới đây.

## 2.1. Đánh dấu hóa học

### 2.1.1. G

- 1) Thêm 200  $\mu$ l *dung dịch đệm DMS*, làm lạnh ở trong nước đá.

**Dung dịch đệm DMS** (DMS buffer solution) chứa 50 M sodium cacodylate (pH 8,0) và 1 mM EDTA.

- 2) Thêm 1  $\mu$ l DMS (dimethylsulfate), cho phản ứng 1 phút ở 20 °C.
- 3) Thêm 50  $\mu$ l *dịch dừng DMS* và 70  $\mu$ l ethanol đã làm lạnh, trộn xoáy mạnh, để ở -70 °C trong 15 phút.

**Dịch dừng DMS** (DMS stop solution) chứa sodium citrate 1,5M (pH 7,5), 2-mercaptoethanol 1,0M và tRNA 100  $\mu$ g/ml.

- 4) Quay li tâm 10 phút, lấy tủa, hòa tan tủa trong 250  $\mu$ l sodium citrate 0,3M.
- 5) Thêm 750  $\mu$ l ethanol đã làm lạnh, trộn đều và để 15 phút ở -70 °C.
- 6) Quay li tâm 10 phút, tráng tủa 2 lần trong ethanol 70%.
- 7) Làm khô bằng máy hút chân không.

### 2.1.2. A>C

- 1) Thêm 100  $\mu$ l dung dịch NaOH 1,2N - EDTA 1mM, cho phản ứng trong 4 phút ở 90 °C.
- 2) Thêm 150  $\mu$ l acetic acid, 5  $\mu$ l tRNA (1 mg/ml) và 750  $\mu$ l ethanol 70% đã làm lạnh, trộn kỹ, để ở -70 °C trong 15 phút.
- 3) Quay li tâm 10 phút, lấy tủa, hòa tan tủa trong 250  $\mu$ l sodium citrate 0,3M.
- 4) Thêm 750  $\mu$ l ethanol đã làm lạnh, trộn đều và để 15 phút ở -70 °C.
- 5) Quay li tâm 10 phút, tráng tủa 2 lần trong ethanol 70%.
- 6) Làm khô bằng máy hút chân không.

### 2.1.3. G+A

- 1) Thêm 15  $\mu$ l nước cất và 2  $\mu$ l formic acid pH 2,0 (điều chỉnh pH bằng

piperidine, một dung môi hữu cơ có tính kiềm), phản ứng 1 giờ ở 20 °C.

- 2) Làm đông khô.
- 3) Hòa tan DNA trong 20 µl nước cất.
- 4) Lại làm đông khô.

#### 2.1.4. T+C

- 1) Thêm 20 µl nước cất, làm lạnh ở 0 °C.
- 2) Thêm 25 µl hydrazine (HZ), phản ứng 6 phút ở 20 °C.
- 3) Thêm 200 µl *dung dịch dừng HZ* (HZ stop solution) và 750 µl ethanol, để 15 phút ở -70 °C.

**Dung dịch dừng HZ** chứa sodium acetate 0,3M, EDTA 0,1M và tRNA 25 µg/ml.

- 4) Quay li tâm 10 phút, lấy tủa, hòa tan tủa trong 250 µl sodium citrate 0,3M.
- 5) Thêm 750 µl ethanol đã làm lạnh, trộn đều và để 15 phút ở -70 °C.
- 6) Quay li tâm 10 phút, tráng tủa 2 lần trong ethanol 70%.
- 7) Làm khô bằng máy hút chân không.

#### 2.1.5. C

- 1) Thêm 5 µl nước cất và 15 µl NaCl 5M.
- 2) Thực hiện tiếp các thao tác như ở bước 2) đến 7) mục 2.1.4.

### 2.2. Phân giải bằng piperidine và điện di trong gel

- 1) Thêm 30 µl piperidine 1M vào mỗi ống DNA đã đánh dấu hóa học của cả 5 loại. Cho phản ứng ở 90 °C trong 30 phút.

*Chú ý rằng dung dịch piperidine cần chuẩn bị ngay trước khi sử dụng.*

- 2) Đông khô.
- 3) Hòa tan DNA trong 20 µl nước cất, đông khô.
- 4) Lại hòa tan DNA trong 20 µl nước cất, đông khô.
- 5) Hòa tan DNA vào 10 µl dịch màu.
- 6) Xử lý ở 90 °C trong 1 phút rồi đưa nhanh vào nước đá để làm lạnh cấp.



tốc. Điện di trong gel.

### **3. Phương pháp xác định trình tự nucleotide nằm kề đoạn ADN đã biết**

Phương pháp này là những vận dụng sáng tạo phản ứng PCR, clone hóa DNA là sản phẩm của PCR trong việc giải đọc trình tự nucleotide nằm ngoài đoạn DNA có trình tự đã biết. Có một số phương pháp khác nhau (có tên chung là "DNA walking", "DNA jumping") và tùy thuộc vào từng đoạn DNA nhất định mà quyết định sử dụng phương pháp thích hợp. Các phương pháp inverse PCR (PCR đảo ngược) thường được sử dụng để chuẩn bị clone hóa đoạn DNA ngoài phạm vi vùng đã biết. Đề nghị tham khảo thêm tài liệu khác, nhìn chung kỹ thuật này có thể là:

- Cắt đoạn DNA một cách ngẫu nhiên rồi kết nối lại để giảm độ dài của đoạn DNA để có thể nhân lên bằng PCR với cặp mồi ngược hướng với mồi thông thường, rồi clone hóa vào vector plasmid và giải trình đoạn đã đảo đó (xem mục "PCR đảo ngược").

- Lợi dụng các vùng có trình tự đặc biệt để nhân lên bằng PCR với mồi bắt cặp với vùng đó, sau đó clone hóa và giải trình đoạn đó.

- Khi kết nối các đoạn cần dựa vào trình tự chồng lặp (đoạn lặp) của các chúng.

## IV. Phương pháp mapping và nối dài mồi (primer)

Đây là phương pháp xác định vị trí các đầu (điểm đầu và điểm kết thúc của phiên mã) và vị trí cắt xén (splicing) của RNA cũng như dùng để định lượng RNA chứa các đầu mút đặc hiệu. Trong phần này giới thiệu phương pháp S1 mapping sử dụng S1 nuclease, phương pháp nối dài mồi thực hiện phiên ngược sử dụng mồi và sau đó là phương pháp ribomapping sử dụng RNA làm mẫu dò.

### 1. S1 mapping

S1 nuclease là một enzyme phân giải chuỗi đơn DNA mà không làm ảnh hưởng đến chuỗi DNA hai sợi hoặc DNA đã lai với RNA. Nhờ vậy, sau khi thực hiện lai RNA với DNA một sợi bổ sung chứa đầu mút của RNA cần xác định, rồi xử lý bằng S1 phân giải chuỗi đơn một cách đặc hiệu và sau đó xác định độ dài DNA được bảo hộ (đoạn DNA còn lại) ta có thể xác định được các vị trí đầu mút của RNA. Tuy phương pháp này có độ nhạy không cao, nếu sử dụng khoảng nửa triệu tế bào động vật thì giới hạn phát hiện là mỗi tế bào có trên 10 phân tử. Tuy vậy, trong trường hợp muốn kiểm xuất lượng RNA rất nhỏ nếu sử dụng poly(A)RNA thu được từ số tế bào nhiều hơn thì cũng có thể thực hiện được.

1) Dùng DNA hai sợi nguyên dạng có thể đánh dấu và điều chế mẫu dò nhưng nếu sử dụng DNA một sợi đã được điều chế bằng phương pháp strand separation thì không cần phải xác định nhiệt độ lai một cách nghiêm ngặt.

2) Trộn 5 - 30  $\mu\text{g}$  RNA với khoảng  $10^4$  cpm ( $10^6$  -  $10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$ ) DNA mẫu dò trong một ống Eppendorf rồi thực hiện kết tủa bằng ethanol (nếu quá ít RNA thường khó gây kết tủa vì vậy nên cho thêm carrier RNA như RNA tinh dịch cá hồi...), sau đó rửa kết tủa bằng ethanol 99%. Li tâm lấy cặn rồi làm khô.

3) Cho 20  $\mu\text{l}$  *dung dịch lai* vào tủa đang ở trạng thái ẩm, để 10 phút, rồi dùng pipet hút nhả một số lần để làm tan hoàn toàn.

**Dung dịch lai** chứa 80% formamide, 0,4 M NaCl, 0,05 M piperazine-*N,N'*-bis-2-ethanesulfonic acid (PIPES) (pH 6,4) và 1 mM EDTA.

4) Làm nóng ở 80 - 90 °C trong 3 - 5 phút, chuyển nhanh về điều kiện *nhiệt độ lai* đã xác định trước và lai trong khoảng 3 giờ.

**Nhiệt độ lai** DNA-DNA có thể tính theo công thức  $T_m = 22 + 0,5 \times (G+C) - 500/n$ . Chẳng hạn đoạn DNA dài hơn 1 kb với hàm lượng G+C = 40, 50 và 60% sẽ có nhiệt độ lai là 42, 47 và 52 °C, tương ứng. Để có thể lai DNA-RNA nhiều hơn cần nâng nhiệt độ lai lên cao hơn khoảng 3 - 5 °C.

5) Thêm 200 µl dung dịch S1 đã được làm lạnh trên băng, chuyển vào chậu nước đá. Li tâm nhẹ trong khoảng 30 giây (để tập trung các thành phần trong ống), ủ ở 30 hoặc 37 °C cho phản ứng xảy ra.

**Dung dịch S1** chứa NaCl 0,29M, sodium acetate (pH 4,6) 0,03M, kẽm citrate 4mM, DNA tinh dịch cá hồi đã biến tính 100 µg/ml và S1 nuclease 200 đơn vị/ml.

6) Thêm vào ống 2,5 lần ethanol để kết tủa.

7) Rửa bằng ethanol 80%, trộn tủa vào *dung dịch màu formamide tải mẫu*, xử lý nhiệt ở 90 °C trong 3 phút rồi thực hiện điện di trong gel polyacrylamide chứa urea.

**Dung dịch màu formamide tải mẫu** chứa formamide 90%, EDTA 5mM, BPB 0,05% và XC 0,05%.

## 2. Phương pháp nối dài môi

Dùng DNA một sợi có tính bổ sung với RNA từ sau điểm mở đầu phiên mã đang trong quá trình phiên mã để làm môi. Môi có thể chế từ đoạn DNA đã tái tổ hợp trong plasmid được cắt ra bởi enzyme hạn chế nhưng cũng có phương pháp sử dụng DNA tổng hợp. Trong trường hợp dùng DNA 2 sợi làm môi thì cần điều tiết nồng độ formamide và nhiệt độ phản ứng để hình thành điều kiện lai RNA-DNA và DNA-DNA. Tuy nhiên, trong trường hợp sử dụng DNA tổng hợp (oligonucleotide) để làm môi do DNA một sợi này không dẫn đến hiện tượng lai DNA-DNA nên với thao tác đơn giản có thể thực hiện nối dài môi.

Sau khi đánh dấu đầu 5' của DNA, cho hình thành hybrid (thể lai) với RNA rồi sử dụng enzyme phiên ngược tổng hợp nối dài cho đến đầu 5' của RNA. Nhờ xác định độ dài của đoạn thu được có thể thực hiện phân tích RNA. Trong trường hợp xác định RNA phiên mã *in vivo* đã di nạp gen vào tế bào, thì nếu chọn vị trí có trình tự nucleotide đặc hiệu gen di nạp làm môi thì cũng có thể phân biệt được với RNA nội tại.

### 2.1. Phương pháp sử dụng DNA hai sợi

1) Trộn kỹ RNA (hàng chục µg) với primer đã được đánh dấu (hàng chục

ngàn cpm) sau đó gây kết tủa bằng ethanol trong một ống Eppendorf 0,5 ml, để khô trong không khí. Sau đó, hòa tan vào 20 µl dung dịch lai (hybridization solution). Đồng thời thiết lập các phản ứng âm tính với chỉ DNA môi và chỉ sản phẩm kết tủa.

2) Xử lý nhiệt ở 80 °C trong 5 phút, sau đó bảo ôn ở 45 °C trong 1 đêm, rồi kết tủa lại bằng ethanol.

3) hong khô rồi hòa tan trong 30 µl *dung dịch đệm phiên ngược*. *Chú ý* có thể có trường hợp khó hòa tan.

**Dung dịch đệm phiên ngược** chứa dNTP mỗi loại 1mM, Tris-HCl (pH 8,0) 50mM, KCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM và 2-mercaptoethanol 20mM.

4) Thêm vào 5 đơn vị enzyme reverse transcriptase (RT), cho phản ứng trong 30 phút ở 40 °C.

5) Xử lý phenol-chloroform, kết tủa bằng ethanol.

6) Làm khô, kết tủa, hòa vào dịch màu, xử lý nhiệt (90 °C trong 3 phút) rồi thực hiện điện di trong gel polyacrylamide-urea như đối với S1 mapping.

## 2.2. Phương pháp sử dụng primer tổng hợp

1) Chế 20 µl hỗn hợp chứa 10 - 20 µg RNA, 2 - 4×10<sup>4</sup> cpm primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), và 0,25 M KCl.

2) Để ở 60 °C trong 1 giờ rồi ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ để lai.

3) Pha sẵn (cho 10 phản ứng) 600 µl hỗn hợp chứa 10 µl KCl 1M, 8 µl MgCl<sub>2</sub> 1mM, 7 µl Tris-HCl (pH 8,3) 2M, 16 µl DTT 0,5M, 2 µl *mỗi loại* của 4 loại dNTP 100mM, 80 µl actinomycin 1 mg/ml và 471 µl nước cất. Lấy 60 µl dung dịch này thêm vào dịch phản ứng trên, sau đó cho thêm 1 µl (15 đơn vị/µl) enzyme RT, trộn đều, tập trung (spin-down) và cho phản ứng xảy ra ở 37 °C trong 1 giờ.

**Dịch phản ứng như vậy** có thành phần sau: 75 mM KCl, 0,25 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 10 mM DTT, 0,25 µg/ml mỗi loại dNTP, 100 đơn vị actinomycin và 100 đơn vị/ml RT.

4) Thêm 180 µl ethanol để kết tủa.

5) Rửa tủa nucleic acid trong ethanol 80%, hong khô, thêm vào tủa dung dịch màu tải mẫu, đun 3 phút ở 90 °C cho biến tính, điện di trong gel polyacrylamide-urea bên cạnh DNA MW marker. Sản phẩm phương pháp

nổi dài mỗi được nhận thấy trong gel là DNA sợi đơn, vì vậy cần lưu ý khi so sánh phân tử lượng sản phẩm này với DNA MW marker sợi đôi.

### 3. Mapping bằng riboprobe (*riboprobe mapping*)

Đây là một phương pháp biến thể của S1 mapping, có điều probe trong trường hợp này không phải là DNA mà là RNA được tổng hợp trong ống nghiệm (*in vitro*). Để tác chế riboprobe (RNA mẫu dò) này người ta thường sử dụng RNA polymerase và promoter của phage SP 6 của *Salmonella*, hai phage T3 hoặc T7. Ở sau vị trí của promoter này trở đi nếu một RNA mẫu dò được tổng hợp trên khuôn DNA đã được tổ hợp ngược hướng thì mẫu dò này mang tính bổ sung với mRNA. Nếu mRNA và mẫu dò hình thành một thể lai (hybrid) thì sau đó nếu dùng RNase T1 và RNase A cắt RNA một sợi rồi bằng cách xác định độ lớn của đoạn được bảo tồn (đoạn còn lại) thì ta có thể thực hiện phân tích được RNA.

Trong S1 mapping mẫu dò DNA chỉ được đánh dấu ở đầu mút, nhưng trong trường hợp riboprobe mapping thì RNA mẫu dò được đánh dấu suốt chiều dài phân tử trong quá trình tổng hợp nên độ phát phóng xạ cao, độ nhạy của phương pháp vượt hẳn. Cho nên chỉ cần hình thành hybrid ở bộ phận nhỏ cũng có thể kiểm xuất được và thu được nhiều thông tin. Tuy nhiên, do RNA có cấu trúc bậc hai nên nhiều khi phát hiện những trường hợp các băng có trình tự bổ sung không thực chất.

1) Chế tác plasmid cho việc sản xuất riboprobe: di nhập đoạn DNA đích một cách ngược hướng vào vị trí clone hóa của DNA plasmid SP 6, T3 hoặc T7 (Boehringer, BRL, Promega Biotec...). Nếu cần phân biệt RNA vì khuẩn ký chủ với sản phẩm của gen di nhập cần đưa trình tự di nhập đủ dài thích đáng.

2) Chế tác riboprobe (với trường hợp SP 6 RNA polymerase) thực hiện qua các bước sau:

-Cắt DNA đã di nhập (tái tổ hợp) trong plasmid ở một vị trí sau vị trí di nhập làm DNA plasmid trở nên chuỗi thẳng. Từ vị trí promoter, DNA chuỗi thẳng này trở thành khuôn tổng hợp probe.

-Thêm vào mỗi  $\mu\text{g}$  DNA khuôn hỗn hợp sau: 2  $\mu\text{l}$  *dung dịch TMD* 10 $\times$ , 2  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (từ nhau thai) 25 đơn vị/ $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  mỗi loại ATP, GTP và CTP (10 mM các loại), 10  $\mu\text{l}$  (100  $\mu\text{Ci}$ ) [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]UTP (~3.000 Ci/mM), 1  $\mu\text{l}$  (4 - 15 đơn vị) SP6 RNA polymerase, thêm nước cho đủ 20  $\mu\text{l}$  tổng số, ủ 1 giờ ở 37  $^{\circ}\text{C}$  cho phản ứng xảy ra.

**Dung dịch TMD 10 $\times$**  chứa 400 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60

mM  $\text{MgCl}_2$  và 100 mM DTT.

**SP 6 RNA polymerase** có thể mua từ hãng Promega Biotec...

-Thêm 1  $\mu\text{l}$  UTP 10mM, ủ 5 phút ở 37 °C cho phản ứng xảy ra. Sau đó, thêm 1  $\mu\text{l}$  DNase 1 đơn vị/ $\mu\text{l}$ , ủ ở 37 °C trong 10 phút.

-Thêm 4  $\mu\text{l}$  carrier RNA (5 mg/ml), xử lý phenol-chloroform (1:1), lấy phần nước chứa nucleic acid.

-Tải vào cột Sephadex G-100 (trong đầu pipet loại 1 ml) đã được cân bằng bởi dung dịch chứa 0,3 M NaCl và 20 mM Tris-HCl (pH 7,5). Sau đó *dùng xuất* bằng dung dịch đó.

3) Trộn RNA (khoảng 10 - 30  $\mu\text{g}$ ) với riboprobe (hàng trăm nghìn cpm), sau đó kết tủa bằng ethanol.

4) hong khô, hòa tan đều trong 30  $\mu\text{l}$  dung dịch lai (hybridization solution, như với phương pháp S1 mapping).

5) Xử lý ở 80 °C trong 5 phút, sau đó cho phản ứng ở 45 °C trong 1 giờ. Thêm 350  $\mu\text{l}$  *dung dịch RNA mapping* đã làm lạnh.

**Dung dịch RNA mapping** chứa 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA và 300 mM NaCl.

6) Thêm RNase A cho đạt nồng độ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , RNase T1 cho đạt 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

(Thông thường hai enzyme này được pha sẵn trong glycerol 10% có thêm 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) và bảo quản ở -20 °C, khi đó có thể pha vào hỗn hợp phản ứng nêu trên 4  $\mu\text{l}$  dung dịch chứa 1 mg/ml RNase A, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase T1, 10 mM Tris-HCl và 10% glycerol).

7) Cho phản ứng xảy ra ở 30 °C trong 30 phút.

8) Thêm 5  $\mu\text{l}$  proteinase K 10 mg/ml, 20  $\mu\text{l}$  SDS 10%, cho phản ứng xảy ra ở 37 °C trong 15 phút.

9) Thêm 2  $\mu\text{l}$  carrier RNA (5 mg/ml) hoặc tương đương khi khó gây kết tủa do ít RNA.

10) Xử lý phenol-chloroform, kết tủa bằng ethanol.

11) hong khô. Sau đó hòa vào 20  $\mu\text{l}$  dịch màu pha formamide 90%. Xử lý nhiệt rồi điện di trong gel polyacrylamide-urea như với S1 mapping.

## V. Hệ phiên mã *in vitro*

Nghiên cứu phiên mã "trong ống nghiệm" (phiên mã *in vitro*) còn gọi là "run-off assay" là hệ thống các phương pháp điều chế dịch chiết xuất tế bào và nghiên cứu hoạt tính phiên mã chính xác của gen trong tế bào tổ chức sống hay lúu cấy tế bào. Dịch chiết xuất tế bào được thu từ việc "nghiên" tế bào rồi quay li tâm 100.000 ×g gọi là S-100. Ngoài ra, còn có thể chiết xuất dịch từ nhân tế bào.

### 1. Phương pháp điều chế dịch chiết thô tế bào HeLa

#### 1.1. Dịch chiết xuất toàn tế bào

1) Nuôi cấy tế bào HeLa đạt đến kỳ phát triển theo cấp số nhân ( $0,3 \times 10^5$ ) rồi quay li tâm 3.000 v/ph trong 5 - 6 phút để tập trung tế bào. Lại huyền dịch hóa tế bào (cặn) trong PBS rồi quay li tâm loại bỏ nước mặt. Lặp lại việc rửa tế bào như vậy 2 - 3 lần. Ở trạng thái này nếu muốn bảo quản tế bào thì đưa vào điều kiện  $-80^\circ\text{C}$  có thể bảo quản lâu gần như vĩnh cửu.

2) Huyền dịch hóa tế bào trong 4 lần *dung dịch đệm I*. Để ở nhiệt độ phòng 20 phút.

**Dung dịch đệm I** chứa Tris-HCl (pH 7,9) 10mM, EDTA 1mM và DTT 5mM (DTT thêm vào trước khi dùng).

3) Nghiền đều bằng Dounce homogenizer (chày B) 10 - 15 lần.

4) Thêm *dung dịch đệm II* bằng 4 lần lượng cặn trước khi nghiền, lắc đều nhẹ nhàng.

**Dung dịch đệm II** chứa Tris-HCl (pH 7,9) 50mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM, saccharose 25%, glycerol 50% và DTT 2mM.

5) Đặt dịch lên máy khuấy từ rồi cho khuấy nhẹ nhàng, trong khi đó dùng pipet cho từng giọt ammonium sulfate bão hòa cho đến khi lượng ammonium sulfate đạt đến 1/2 - 2/3 dung dịch thì độ nhớt tăng máy chạy khó, khi đó cần tăng tốc độ khuấy.

*Chú ý* cho ammonium sulfate vào từ từ từng lượng rất nhỏ vì nếu ngay từ đầu mà cho nhiều thì tăng độ nhớt nhanh chóng nhưng dịch không được trộn đều.

6) Khuấy từ từ cho dịch được trộn đều trong 20 - 30 phút.

7) Quay li tâm siêu tốc 40.000 - 45.000 v/ph trong 3 giờ, khi đó cần chọn

ống li tâm và rotor li tâm thích hợp (chẳng hạn, rotor Hitachi RP 42, rotor Hitachi RP 65 T, với ống 94 PA).

8) Chuyển lớp nước mặt sang ống khác, *chú ý* không làm trộn lớp dưới. Khi đó cần chú ý đừng hút theo lớp DNA nằm sát lớp tua ở đáy ống.

9) Khuấy trên máy khuấy từ tĩnh, khi đó thêm từ từ một lượng ammonium sulfate bột cho đạt đến 0,33 g/ml so với lượng nước mặt. Sau khi ammonium sulfate tan hết thì thêm NaOH 1 N ở mức 10 ml cho mỗi gam ammonium sulfate, lại trộn đều trong 30 phút.

10) Quay li tâm 16.000 v/ph trong 20 phút. Có thể dùng rotor RPR Hitachi hoặc rotor Sorvall...

11) Loại bỏ nước mặt (đổ ống đổ ra cũng được), hòa tan tua trong *dung dịch đệm III* với lượng bằng 1/10 lượng dịch mặt thu được từ bước 8) nêu trên.

**Dung dịch đệm III** chứa HEPES-KOH (pH 7,9) 20mM, EDTA 0,2mM, KCl 0,1mM, glycerol 17%, DTT 1mM và  $MgCl_2$  12,5mM.

12) Thẩm tích đối dung dịch đệm III trong 10 - 12 giờ, ngoại dịch có thể khoảng 100 lần lớn hơn dịch trong túi thẩm tích, thay dịch giữa chừng thì tốt vì nồng độ muối trong sản phẩm là khá cao.

13) Quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 phút để loại bỏ những vật không hòa tan.

14) Chia ra nhiều ống nhỏ cho tiện bảo quản và sử dụng, đưa vào nitơ lỏng để đông kết nhanh rồi bảo quản ở  $-80^{\circ}C$ . Thời gian bảo quản được biết là một năm hoặc lâu hơn.

## 1.2. Dịch chiết xuất S-100

1) Sau khi nuôi cấy tế bào (HeLa), thu hoạch và rửa trong PBS(-), sau đó đưa vào trong khay nước đá hoặc ở  $0 - 4^{\circ}C$  mà thao tác điều chế nhằm hạn chế tác động phân hủy của các enzyme tế bào đối với sản phẩm.

2) Cân áng chừng khối lượng tế bào rồi thêm vào đó 5 lần lượng đó *dung dịch đệm A* rồi khuấy đều để tạo huyền phù.

**Dung dịch đệm A** chứa HEPES-KOH (pH 7,9) 10mM, KCl 10mM, DTT 1mM và  $MgCl_2$  1,5mM.

3) Nghiền với Dounce homogenizer (chày B) 10 - 20 lần, lấy mẫu phết lên phiến kính rồi nhuộm Giemsa hoặc bằng trypan blue và hiển vi để xác



định rằng tế bào đã bị phá hủy chỉ còn nhân.

4) Thêm *dung dịch đệm B* bằng 1/10 toàn bộ thể tích.

**Dung dịch đệm B** chứa HEPES-KOH (pH 7,9) 0,3M, MgCl<sub>2</sub> 30mM và KCl 1,4M.

5) Đông kết bằng nitơ lỏng và giải đông lặp lại hai lần.

6) Li tâm 40.000 đến 45.000 v/ph trong 60 phút. Thu nước mặt chuyển sang ống thẩm tích.

7) Thẩm tích đôi *dung dịch C* trong 6 - 8 giờ với khoảng 20 lần ngoại dịch so với sản phẩm cần loại bỏ muối.

**Dung dịch C** chứa glycerol 20%, HEPES-KOH (pH 7,9) 20mM, EDTA 0,2mM, KCl 0,1M và DTT 1mM.

8) Quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 phút để loại bỏ những vật không hòa tan.

9) Chia ra nhiều ống nhỏ cho tiện bảo quản và sử dụng, đưa vào nitơ lỏng để đông kết nhanh rồi bảo quản ở -80 °C.

### 1.3. Dịch chiết xuất nhân

1) Thực hiện các bước tương tự các bước từ 1) đến 3) của 1.1. và 1.2. nêu trên để nghiền nát tế bào.

2) Chuyển sang ống li tâm 50 PA (Hitachi) quay li tâm 2.000 v/ph trong 10 phút, loại bỏ nước mặt.

3) Quay li tâm 16.000 v/ph (rotor RT 20 Hitachi, Sorvall...) trong 20 phút, lấy phần cặn là phân đoạn nhân tế bào.

4) Hòa phân đoạn nhân tế bào trong *dung dịch D* thành huyền dịch sao cho nhân của khoảng 10<sup>9</sup> tế bào được pha trong 3 ml dung dịch. Khi đó phân đoạn nhân tế bào kết thành một khối khá chắc và khó huyền dịch hóa, cho nên cần dùng pipet hút nhả lặp đi lặp lại nhiều lần cho đến khi hòa đều dịch hoàn toàn.

**Dung dịch D** chứa glycerol 25%, HEPES-KOH (pH 7,9) 20mM, EDTA 0,2mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, NaCl 0,42M, DTT 1mM và PMSF 0,5mM.

**PMSF (phenylmethane sulfonyl fluoride)** là chất ức chế serine protease.

5) Nghiền bằng Dounce homogenizer (chày B) khoảng 10 - 15 lần.

- 6) Khuấy bằng máy khuấy từ khoảng 30 phút một cách chậm rãi.
- 7) Quay li tâm 10 phút ở 10.000 v/ph (rotor RPR 20 Hitachi hoặc tương đương) để loại bỏ cặn là chất không hòa tan.
- 8) Thăm tích trong 50 lần thể tích *dung dịch đệm E* trong 4 - 8 giờ.

**Dung dịch đệm E** chứa glycerol 20%, HEPES-KOH (pH 7,9) 20mM, EDTA 0,2mM, KCl 0,1M, DTT 1mM và PMSF 0,25mM.

- 9) Lại quay li tâm 10 phút ở 10.000 v/ph để loại bỏ cặn là chất không hòa tan, phân chia từng lượng nhỏ cho tiện bảo quản và sử dụng khi cần. Làm đông kết nhanh trong nitơ lỏng và bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Phiên mã *in vitro* (run-off assay)

Dịch chiết xuất từ tế bào nêu trên chứa nhiều loại RNA thông tin có thể được phiên mã một cách chính xác nhờ một số hệ thống enzyme và promoter khác nhau. Đối với tế bào HeLa như đã dùng để chiết xuất dịch ba loại nêu trên, người ta có thể sử dụng promoter major late của chủng *Adenovirus 2* với pol II hoặc promoter của rDNA của người với pol I để thực hiện việc phiên mã *in vitro*. Các loại promoter khác nhau có những tính chất khác nhau nên nồng độ các muối cần phải thiết định trước khi thí nghiệm.

### 2.1. Sử dụng promoter của rDNA của người với pol I

- 1) Điều chế dịch hỗn hợp phản ứng bằng cách trộn các thành phần sau đây trong một ống nghiệm (đang để trong nước đá hoặc trên băng):

- 10  $\mu\text{l}$  dịch chiết xuất (toàn tế bào, S 100 hoặc dịch nhân),
- 2,5  $\mu\text{l}$  *dung dịch đệm phản ứng*,
- $\alpha$ -amanitin (1mg/ml) 2,5  $\mu\text{l}$ ,
- 2,5  $\mu\text{l}$  10 $\times$  NTPs,
- 1,5  $\mu\text{l}$  rDNA mạch thẳng (0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ),
- 0,5  $\mu\text{l}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]UTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ),
- 5,5  $\mu\text{l}$  nước cất.

**Dung dịch đệm phản ứng** chứa HEPES-KOH (pH 7,9) 100mM, KCl 500mM,  $\text{MgCl}_2$  50mM và DTT 5mM.

**NTPs 10 $\times$**  chứa ATP, CTP và GTP mỗi loại 5 mM và UTP

0,25 mM.

2) Ủ dịch trên ở 30 °C trong 60 phút cho phản ứng xảy ra.

3) Thêm 200 µl *dung dịch dừng phản ứng*, chiết xuất bằng phenol-chloroform rồi bằng chloroform, sau đó thêm 200 µl ammonium citrate 4M và 1 ml ethanol để thực hiện kết tủa bằng ethanol, tráng tủa bằng ethanol, hong khô. Cuối cùng pha TE vào để hòa tan tủa và điện di một phần nhỏ kiểm tra kết quả hệ phiên mã.

**Dung dịch dừng phản ứng** chứa urea 7M, SDS 0,1%, Tris-HCl (pH 7,9) 10mM, EDTA 10mM và tRNA 100 µg/ml.

## 2.2. Sử dụng hệ pol II với promoter major late Ad 2

1) Pha dịch phản ứng như sau:

- 10 µl dịch chiết xuất (toàn tế bào, S-100 hoặc dịch nhân),
- 2,5 µl dung dịch đệm phản ứng,
- 2,5 µl NTPs 10×,
- 1,5 µl DNA major late của Ad 2 mạch thẳng (0,25 µg/µl),
- 5µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (10 µCi/µl),
- 7,5 µl Nước cất.

**DNA major late của Ad 2 mạch thẳng** có promoter ở đoạn từ base -500 đến +700, ở base +700 có vị trí nhận biết của *Sal* I và cắt bằng *Sal* I có thể được sản phẩm phiên mã khoảng trên 700 base.

2) Xử lý tương tự như các bước tiếp theo của mục 2.1. (ủ ở 30 °C trong 60 phút cho phản ứng xảy ra).

3) Thêm 200 µl *dung dịch dừng phản ứng* (nêu trên), chiết xuất bằng phenol-chloroform, chloroform, kết tủa bằng ethanol, tráng bằng ethanol 70% rồi điện di kiểm tra sản phẩm.

## 2.3. Điện di trong gel agarose

1) Hòa tan sản phẩm thu được của hệ phiên mã pol II với promoter major late Ad 2 hoặc của hệ sử dụng promoter của rDNA của người với pol I nêu trên (2.1 và 2.2.) trong 5 µl dung dịch chứa 40 µM sodium phosphate (pH 7,0) và 2 mM EDTA. Thêm vào đó 15 µl *dịch nhuộm màu pha glyoxal*, trộn đều.

**Dịch nhuộm màu pha glyoxal** chứa 4,5 ml glyoxal 40%,

13,3 ml DMSO, 1 ml XC 1%, 1 ml BPB 1%. (40% là dịch có nồng độ glyoxal thương mại, tương đương nồng độ 6M).

2) Ủ ở 50 °C trong 60 phút.

3) Điện di trong gel chế theo công thức sau (pha trong nước): agarose 2%, glycerol 5%, sodium phosphate (pH 7,0) 10mM và EDTA 0,5mM.

4) Sử dụng sodium phosphate 10mM (pH 7,0) và EDTA 0,5mM làm dịch tuần hoàn trong quá trình điện di, dịch tuần hoàn này được bơm bởi một bơm nhu động (peristaltic pump) qua hai cực của bản điện di chống nóng cho gel.

5) Kết thúc điện di, hong khô bản gel rồi thực hiện tự ký phóng xạ.

*Chú ý:* ngoài gel agarose còn có thể sử dụng gel polyacrylamide-urea. Khi đó sản phẩm được pha thêm dịch nhuộm màu pha formamide 90% rồi điện di trong dung dịch đệm TBE.

## VI. Thử nghiệm run-on nhân (run-on assay)

Đây là phương pháp xác định lượng gen được phiên mã trong thời khắc nhất định. Những thực nghiệm về phiên mã sử dụng nhân tế bào đã được phân li thường là kết quả của sự tiếp tục phiên mã của các gen đã bắt đầu quá trình phiên thành RNA thông tin từ trước và khi thử nghiệm quá trình đó được tiếp tục cho đến hoàn thành mà có thể không có gen mới được phiên mã. Như vậy, nếu sử dụng một yếu tố cảm ứng nào đó để kích thích phiên mã thì kết quả nghiên cứu sẽ bị che lấp hoặc hiểu sai. Nếu sử dụng [ $^{32}\text{P}$ ] đánh dấu sản phẩm phiên mã của nhân đã phân li và kiểm tra RNA đã được đánh dấu bằng gen xác định thì có thể biết được gen được phiên mã đến mức nào vào thời điểm phân li.

### 1. Phân li nhân

1) Thực hiện các bước trong thí nghiệm này ở 0 - 4 °C (để các ống thí nghiệm trong nước đá). Rửa tế bào nuôi cấy trong đĩa các petri bằng dung dịch đệm PBS(-) hai lần, sau đó cạo tế bào vào trong dung dịch SSC 1× (ở ống nghiệm 15 ml), quay li tâm 1.500 v/ph trong 5 phút rồi đổ hết hoàn toàn nước mặt thu tế bào.

2) Thêm 0,5 ml *dung dịch đệm TNM-NP40*, trộn đều để tạo huyền dịch bằng cách đưa đầu ống pipet loại 1 ml xuống tận đáy ống và hút nhả khoảng 10 - 15 lần. Chú ý để ở nhiệt độ dưới 4 °C.

**Dung dịch đệm TNM-NP40** chứa Tris-HCl (pH 7,4) 10mM, NaCl 10mM,  $\text{MgCl}_2$  3mM và nonident P-40 0,5%.

3) Để yên trên nước đá 10 phút sau đó chuyển sang ống Eppendorf, quay li tâm 3.000 v/ph trong 5 phút. Thu nước mặt bảo quản riêng vì đây là phân đoạn RNA tế bào chết. Còn cặn là phân đoạn nhân tế bào. Rửa cặn hai lần trong 1 ml dung dịch đệm TNM-NP40 nêu trên (kết hợp quay li tâm).

4) Huyền dịch hóa phân đoạn nhân vào 100  $\mu\text{l}$  *dung dịch đệm huyền dịch hóa* bằng cách dùng pipet hút nhả một số lần.

**Dung dịch đệm huyền dịch hóa** chứa Tris-HCl (pH 8,3) 50mM, glycerol 40%,  $\text{MgCl}_2$  5mM và EDTA 0,1mM.

### 2. Thẩm đóm lên màng

1) Hòa tan khoảng 5 - 10  $\mu\text{g}$  DNA plasmid (tái tổ hợp mang gen và đã clone hóa trong *E. coli*) đã bị cắt bởi ít nhất hai vị trí trong 50  $\mu\text{l}$  NaOH

0,2N trong 30 phút ở nhiệt độ phòng.

2) Thêm 500  $\mu$ l (lượng gấp 10 lần) dung dịch SSC 6 $\times$ , trộn đều. Thấm đốm dung dịch DNA này lên màng nitrocellulose hoặc nylon đã cân bằng cũng bằng dung dịch SSC 6 $\times$  đã lắp trong thiết bị thấm đốm (blotting apparatus). Liều lượng khoảng 1 ml/đốm. Cho hút để thấm đốm nhanh. Để khô trong không khí rồi sấy khô ở 80 °C trong khoảng 2 giờ.

### 3. Điều chế ARN tổ chức

1) Thêm 100  $\mu$ l *dịch phản ứng* vào dịch nhân (đã được điều chế theo 1.) và cho phản ứng tổng hợp RNA xảy ra trong 30 phút ở 30 °C. (RNA-polymerase có trong dịch nhân tiếp tục xúc tác phản ứng tổng hợp RNA).

**Dịch phản ứng** chứa Tris-HCl (pH 8,0) 10mM,  $MgCl_2$  5mM, KCl 300mM, các ATP, CTP và GTP 0,5mM mỗi loại và [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]UTP 100 $\mu$ Ci (3.000 Ci/mM).

2) Thêm DNase I cho đạt 20  $\mu$ g/ml rồi để 10 phút ở 30 °C cho phản ứng (phân giải DNA) xảy ra.

3) Thêm 200  $\mu$ l (lượng tương đương) *dung dịch dừng phản ứng*, ủ 30 phút ở 42 °C.

**Dung dịch dừng phản ứng** chứa Tris-HCl (pH 7,4) 20mM, SDS 2%, EDTA 10mM và proteinase K 200 $\mu$ g/ml.

4) Xử lý phenol-chloroform (1:1), hút nước mặt sang ống mới (ống Falcon 2059...).

5) Thêm 50  $\mu$ g carrier RNA, rồi thêm 5  $\mu$ l *dung dịch TCA 5%* đã được làm lạnh ở trong nước đá.

**Dung dịch TCA 5%** là dung dịch  $Na_4P_2O_4$  30mM.

6) Để yên trong nước đá 30 phút sau đó lọc qua màng lọc nitrocellulose (hoặc nylon) đường kính 2,5 cm và tráng màng bằng 10 ml dung dịch TCA 5% ba lần.

7) Chuyển màng lọc sang chai scintillation, thêm 0,9 ml *dung dịch ủ*. Để 37 °C trong 30 phút cho phản ứng xảy ra. (Thực hiện trong chai scintillation để dễ kiểm tra nồng độ phóng xạ, nếu cần).

**Dung dịch ủ** chứa HEPES (pH 7,5) 20mM,  $MgCl_2$  5mM,  $CaCl_2$  1mM và DNase I 25 $\mu$ g/ml.

8) Thêm 30  $\mu$ l EDTA 0,5M và 100  $\mu$ l SDS 10% (nồng độ cuối cùng tương

ứng là 15mM và 1%). Để cho phản ứng ở 60 °C trong 10 phút.

9) Sau phản ứng, chuyển dịch phản ứng (khoảng 1 ml) sang ống loại 10 ml. Thêm vào chai scintillation 0,5 ml *dung dịch rửa*, xử lý 10 phút ở 65 °C. Sau đó hút dung dịch rửa trộn với dịch phản ứng đã hút ra trước khi xử lý dung dịch rửa. Dịch hỗn hợp thu được khoảng 1,5 ml.

**Dung dịch rửa** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, SDS 1% và EDTA 5mM.

10) Thêm 40 µg proteinase K (nồng độ cuối cùng 25 µg/ml), cho phản ứng xảy ra ở 37 °C trong 30 phút.

11) Thêm dung dịch NaCl vào dịch phản ứng cho đạt nồng độ 0,1M và 2,5 lần thể tích ethanol, để 10 phút ở -80 °C cho kết tủa. Quay li tâm 10.000 v/ph trong 10 phút thu tủa sản phẩm. Hòa tủa này trong 50 µl *TE*.

**TE** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM và EDTA 2mM.

#### 4. Hybridization

1) Ngâm màng đã thấm đốm DNA plasmid (bước 2.) vào *dung dịch run-on assay prehybridization* (1 ml cho một màng có diện tích khoảng 20 cm<sup>2</sup>) trong 4 - 16 giờ ở 42 °C.

**Dung dịch run-on assay prehybridization** (dịch lai tiền khởi cho run-on assay) chứa formamide ở nồng độ 50%, sodium phosphate (pH 6,5) 50mM, SSC 5× (25 ml SSC 20× trong 100 ml), DNA tinh dịch cá hồi biến tính 250 µg/ml và Denhardt 1× (10 ml dung dịch Denhardt 10× trong 100 ml).

2) Thay bằng *dung dịch run-on assay hybridization* (dịch lai). Tiến hành lai trong 48 giờ ở 42 °C.

**Dung dịch run-on assay hybridization** (dịch lai cho run-on assay) chứa 4 phần dịch run-on assay prehybridization và 1 phần dung dịch dextran sulfate 50%.

3) Rửa màng bằng 100 ml dung dịch chứa SSC 2× và SDS 0,1% ba lần ở nhiệt độ phòng mỗi lần 5 phút.

4) Rửa màng bằng 100 ml dung dịch chứa SSC 2× và SDS 0,1% hai lần ở nhiệt độ 65 °C mỗi lần 15 phút.

5) hong khô, gói trong giấy nhựa mỏng (Saran wrap), thực hiện tự ký phóng xạ.

6) Đọc kết quả dựa vào độ đậm nhạt trên film X-quang. Quá trình phiên

mã của một hệ phiên mã *in vitro* (sau khi phá tế bào) nếu tiếp tục diễn ra sẽ tổng hợp RNA có chứa [ $\alpha$ - $^{32}$ P]UTP, vì vậy đốm (blot) tương ứng sẽ cho kết quả phóng xạ dương tính. Run-on assay như vậy chỉ cho ta thấy hệ nào được cảm ứng phiên mã (bởi hóa chất cảm ứng nào đó, chẳng hạn) tại thời điểm đình chỉ nuôi cấy tế bào.



## VII. Phân tích xê dịch gel (gel shift analysis)

DNA có cấu trúc chuỗi thẳng đơn điệu. Tuy vậy, thành phần đơn điệu đó cũng có những vùng đặc biệt có cấu trúc không gian xác định nên có những thuộc tính riêng. Những cấu trúc đó thường kết hợp một cách đặc hiệu với các protein nhất định dẫn đến những cơ cấu chức phận nhất định. Để tìm hiểu những cấu trúc đặc biệt đó của DNA người ta phân tích protein kết hợp DNA.

Một trong những phương pháp phân tích protein kết hợp DNA hữu hiệu là phân tích xê dịch gel (gel shift analysis). Phương pháp này dựa trên hiện tượng nếu trộn DNA với protein thì khi điện di trong gel polyacrylamide dưới điều kiện cường độ ion thấp thì các đoạn DNA kết hợp protein sẽ dịch chuyển trong gel chậm hơn so với những đoạn DNA không kết hợp protein. Nhờ phương pháp này người ta có thể thực hiện phân tích được các protein liên quan đến điều tiết thể hiện gen.

1) Chế tác gel: Pha 5 ml *dung dịch acrylamide 40%*, 0,5 ml ammonium persulfate 10% với 5 ml *dung dịch đệm gel shift 10×*, thêm nước cất cho đủ tổng lượng là 50 ml. Sau khi chuẩn bị xong khuôn gel, thêm 10  $\mu$ l TEMED, trộn đều (đừng để tạo bọt) rồi rót khuôn để chế tác bản gel.

**Dung dịch acrylamide 40%** chứa 39 g acrylamide và 1 g *N,N'*-methylene-bis-acrylamide hòa tan trong 100 ml nước cất.

**Dung dịch đệm gel shift 10×** chứa Tris-HCl (pH 7,9) 67mM, EDTA 10mM và sodium acetate 33mM.

2) Thực hiện điện di chuẩn bị trong dung dịch đệm gel shift 10 $\times$  (20 mA, 2 giờ). Trong quá trình điện di cần dùng bơm nhu động để tuần hoàn dung dịch điện di cho hai điện cực để làm hạn chế sự thay đổi pH dung dịch và tránh làm nóng bản gel.

3) Chế tác dịch DNA-protein theo cách sau:

-Cho 1 - 4  $\mu$ l dịch chiết xuất nhân (khoảng 5 mg/ml) (xem tiết trước) vào một ống Eppendorf.

-Thêm vào chiết xuất nhân một lượng *dung dịch đệm D* cho đủ tổng lượng là 12  $\mu$ l.

**Dung dịch đệm D** chứa HEPES-KOH (pH 7,9) 20mM, KCl 100mM, glycerol 20%, DTT 0,5mM và PMSF 0,5mM.

-Thêm  $\text{MgCl}_2$  10mM và spermidine 125mM mỗi loại 2  $\mu\text{l}$ .

-Thêm 3  $\mu\text{l}$  poly(dI-dC).poly(dI-dC) (1mg/ml) trộn đều, để 2 - 3 phút ở nhiệt độ phòng.

-Thêm 1  $\mu\text{l}$  (1 ng/ml) đoạn DNA đã đánh dấu [ $^{32}\text{P}$ ] (khoảng 5.000 - 10.000 cpm) (đánh dấu đầu 5' hay đầu 3' đều được).

4) Ủ dịch phản ứng ở 30 °C trong 30 phút, sau đó tải dịch phản ứng vào gel đã qua bước điện di chuẩn bị, điện di với dòng điện 30 mA. *Chú ý chỉ áp dụng dung dịch màu tải mẫu đối với mẫu không áp dụng phản ứng DNA-protein.*

5) Điện di kết thúc khi DNA tiến gần mép cuối của bản gel (BPB của dịch màu chỉ vị trí của đoạn DNA dài khoảng 60 base trong bản gel điện di).

6) Sau khi điện di, chuyển gel sang giấy thấm Whatman 3MM, làm khô bằng chân không có kết hợp gia nhiệt (đến 80 °C).

7) Thực hiện tự ký phóng xạ.

## VIII. Thí nghiệm cản trở kết hợp methyl hóa dimethyl sulfate (DMS)

Thí nghiệm cản trở kết hợp methyl hóa dimethyl sulfate (DMS) là phương pháp xác định guanine nucleotide liên quan trực tiếp đến sự kết hợp của DNA với protein. Phương pháp này sử dụng mẫu dò (probe) methyl hóa từng phần trong phân tích gel shift, nhưng những mẫu dò có vị trí kết hợp protein đã methyl hóa thì không thể hình thành thể phức hợp với protein cho nên đối với những mẫu dò đã chuyển dịch thì phản ứng cắt nucleotide ở vị trí đó không diễn ra.

- 1) Xử lý đoạn DNA đã đánh dấu [ $^{32}\text{P}$ ] bằng DMS để methyl hóa một phần các gốc guanine.
- 2) Sử dụng mẫu dò đã methyl hóa một phần thực hiện phân tích chuyển dịch gel (với mức độ 5 - 10 lần nhiều hơn).
- 3) Sau khi điện di, thực hiện tự ký phóng xạ xác định vị trí của mẫu dò tự do và của mẫu dò kết hợp protein.
- 4) Cắt các mẫu gel chứa các đoạn DNA từ các vị trí nêu trên, làm nát gel rồi ủ trong 4 ml *dung dịch chiết xuất* ở 37 °C trong 1 ngày đêm.

**Dung dịch chiết xuất** chứa ammonium citrate 500mM, SDS 0,1%, EDTA 1mM, methanol 10% và proteinase K 50µg/ml.

- 5) Quay li tâm 3.000 v/ph trong 10 phút, thu nước mặt. Thêm vào gel đã lắng cạn 2 ml nước và trộn kỹ, quay li tâm như trên để thu nước mặt, hòa hai lần dịch DNA thu hồi được với nhau.
- 6) Chiết xuất bằng phenol-chloroform rồi bằng chloroform, sau đó kết tủa bằng ethanol.
- 7) Hòa tan tủa trong 1 ml TE sau đó tinh chế DNA qua cột DE 52.
- 8) Xử lý DNA đã tinh chế bằng piperidine, điện di trong gel giải trình (sequencing gel) theo Maxam-Gilbert. Khi đó nếu điện di đồng thời DNA đã đánh dấu G+A như dấu phân tử lượng của DNA thì tốt.

## IX. Phương pháp "vết chân" (foot print) nhờ DNase I

Đây là những thực nghiệm xác định sự tồn tại của các protein nhận biết và kết hợp với trình tự nucleotide của DNA đặc hiệu để xác định vị trí gen gây sự kết hợp đó. Sau khi ủ đoạn DNA đã đánh dấu bằng [ $^{32}\text{P}$ ] ở đầu mút để lai với dịch chiết xuất tế bào hoặc các phân đoạn khác của tế bào sau đó bằng DNase I phân giải DNA từng phần dưới điều kiện ở mỗi phân tử một vị trí. Dịch sản phẩm được điện di bằng gel polyacrylamide-urea dùng cho giải trình DNA và thực hiện tự ký phóng xạ. Các băng thu được có dạng bậc thang hơn kém nhau một base nhưng vùng DNA đã kết hợp protein nhờ được bảo vệ khỏi quá trình tiêu hóa của DNase I nên băng tương ứng với vị trí này trở nên yếu. So sánh hình ảnh (kiểu dạng - pattern) này với kiểu dạng DNA thông thường (không kết hợp protein) cũng tiêu hóa bởi DNase I sẽ xác định được vị trí của vùng kết hợp protein.

Phương pháp "vết chân" (foot print) nhờ DNase I chịu ảnh hưởng rất lớn từ các điều kiện thích hợp nhất như đoạn DNA, dịch chiết xuất tế bào... cho nên cần phải kiểm tra điều kiện thích hợp nhất đối với mỗi hệ nhất định. Cũng vì vậy, khi thực hiện đối với một hệ nào đó cần áp dụng nhiều nồng độ DNase I khác nhau. Dưới đây là một ví dụ về phân tích "vết chân" sử dụng gen ribosome (ribosomal DNA).

- 1) Sử dụng DNA có vị trí khởi đầu phiên mã gen ribosome chế tác đoạn DNA đánh dấu một phía bằng [ $^{32}\text{P}$ ] ở vị trí *Ava* I (vị trí +150).
- 2) Thực hiện với lượng dịch phản ứng toàn bộ là 100  $\mu\text{l}$ . Trong đó đoạn DNA đánh dấu phóng xạ nêu trên được trộn với 20  $\mu\text{l}$  dung dịch protein *phân đoạn* từ dịch toàn tế bào nhờ cột phosphocellulose trao đổi ion bằng dung dịch KCl 0,6 - 1,0M và sau đó nhờ cột DEAE cellulose trao đổi ion bằng dung dịch KCl 0,1 - 0,35M.

Cụ thể là trong 100  $\mu\text{l}$  dịch phản ứng chứa khoảng 1 ng dịch phân đoạn DNA đánh dấu ( $5 - 20 \times 10^3$  cpm) (bước 1.), 0,03 mg protein chiết xuất từ dịch toàn tế bào của tế bào FM 3A (pha trong dung dịch đệm gồm HEPES-KOH (pH 7,9 ở 4 °C) 20mM, EDTA 0,2mM, KCl 0,1M và DTT 1mM), 10  $\mu\text{l}$  *dung dịch đệm*  $10\times$  và 7,5  $\mu\text{g}$  poly(dA-dT).poly(dA-dT) và ủ ở 30 °C trong 30 phút.

**Dung dịch đệm  $10\times$**  chứa HEPES-KOH (pH 7,9 ở 4 °C) 100mM,  $\text{MgCl}_2$  50mM, DTT 5mM và KCl 0,4M.

- 3) Cho phản ứng với 10 đơn vị DNase I trong 30 giây (*DNase I sẽ phân giải DNA đánh dấu, trừ miền DNA liên kết protein của dịch tế bào*).
- 4) Để dừng phản ứng, thêm 20 mM EDTA hoặc dung dịch dừng phản ứng phiên mã *in vitro* (tiết trước) với lượng tương đương dịch phản ứng.
- 5) Chiết xuất bằng phenol-chloroform một lần và bằng chloroform một lần nữa, sau đó kết tủa bằng ethanol để thu hồi DNA. Tráng rửa DNA bằng ethanol 70% để loại bỏ muối, *chú ý* sau đó thấm hết ethanol nhanh chóng nhằm tránh muối đọng trong DNA.
- 6) Sau khi làm khô DNA hoàn toàn, thêm 2 - 6  $\mu$ l *dung dịch màu trộn formamide* (như trong trường hợp pha DNA để giải trình nucleotide (sequencing). Xử lý nhiệt ở 90 °C trong 1 phút, điện di trong gel polyacrylamide-urea như trong trường hợp DNA sequencing. *Chú ý* rằng loại bỏ hoàn toàn protein và muối khi thu hồi DNA thì điện di mới có băng đẹp.

**Dung dịch màu trộn formamide:** 10  $\mu$ l formamide, XC 0,05%, BPB 0,05% và EDTA 1mM.

## X. Phân tích protein

Kể cả trong các thí nghiệm DNA tái tổ hợp cũng thường dẫn đến sự cần thiết phải phân tích protein. Những công việc phải tiếp cận thường là kỹ thuật tinh chế protein, xác định phân tử lượng protein, phân tích sự thể hiện gen tổng hợp protein trong *E. coli* và xác nhận protein được tổng hợp *in vitro*. Phần này chỉ giới hạn trong phương pháp định lượng, điện di protein trong gel SDS-polyacrylamide và Western blotting.

### 1. Định lượng protein (phương pháp Bradford)

Để xác định nồng độ protein có phương pháp Lowry là phương pháp cổ điển, chính xác, có độ tin cậy cao được sử dụng bên cạnh phương pháp chuẩn Kjeldahl. Tuy nhiên, cũng còn có phương pháp giản tiện hơn và có thể giúp xác định khá nhanh chóng nồng độ protein được ưa dùng gần đây là phương pháp Bradford được giới thiệu dưới đây.

#### 1.1. Điều chế các hóa chất

- 1) Hòa tan hoàn toàn 100 mg thuốc nhuộm Coomassie brilliant blue G-250 (CBB-G250, Merck, Sigma, Eastmann Kodak...) vào 50 ml ethanol 95%.
- 2) Thêm vào 100 ml phosphoric acid 85%, trộn đều rồi cho thêm nước cho đủ 1 lít, cho vào lọ có bọc chắn sáng để bảo quản.

#### 1.2. Định lượng

- 1) Cho 100  $\mu$ l dung dịch protein vào 5 ml dung dịch Bradford, trộn đều. Đồng thời pha tương tự đối với 100  $\mu$ l dịch đối chứng không chứa protein. Trong vòng 2 phút cho đến 1 giờ đo độ hấp thụ ánh sáng bức xạ ở bước sóng 595 nm. Dùng dung dịch protein (như albumin...) có nồng độ đã biết pha dãy có nồng độ loãng dần, làm tương tự để thiết lập đường cong chuẩn, trong khoảng 100  $\mu$ g/ml đến 1 mg/ml ta có đồ thị tuyến tính. Do glycerol, 2-mercaptoethanol, SDS, ammonium sulfate, Tris... cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả đo, vì vậy nên sử dụng các dung dịch này (không chứa protein) để làm đối chứng.
- 2) Nếu muốn tăng độ nhạy của phương pháp thì làm tương tự với nồng độ protein thấp hơn thì thêm 100  $\mu$ l vào 1 ml dung dịch Bradford rồi thực hiện trắc định tương tự cũng ở bước sóng 595 nm. Khi đó có thể đo protein với nồng độ từ 20  $\mu$ g đến 200  $\mu$ g.

## 2. Điện di SDS-polyacrylamide

Điện di mẫu trong gel SDS-polyacrylamide có thể phân tách được các protein theo độ lớn phân tử nhờ làm biến tính bởi SDS. Trong môi trường có SDS các protein khác nhau đều đồng nhất về điện tích bề mặt nên chúng đều dịch chuyển trong điện trường về phía anode nhưng với tốc độ khác nhau phụ thuộc vào độ lớn của phân tử (phân tử lượng). Gel SDS-polyacrylamide cấu tạo từ hai phần: gel tập trung và gel phân tách. Sau khi gel phân tách đã hóa rắn thì thực hiện đổ gel tập trung. Nồng độ của gel phân tách phụ thuộc vào độ lớn của protein cần phân tách. Nồng độ acrylamide càng cao thì phân tách được các phân tử protein càng nhỏ. Gel 5% acrylamide phân tách được protein có phân tử lượng 60 - 200 kDa, 10% thì 16 đến 70 kDa, 15% thì 12 đến 45 kDa. Ngoài ra, gel có nồng độ cao hơn có thể phân tách các protein nhỏ với chất lượng cao hơn.

### 2.1. Chế tác gel SDS-polyacrylamide

1) Lắp khuôn gel (có thể dùng loại như đối với phân li DNA). Thường sử dụng bản gel có độ dày 1 mm, rộng và dài 15 cm. Loại bản gel này cần khoảng 20 ml dịch nguyên liệu. Có thể dựa theo bảng dưới đây để chế tác gel phân tách (seperating gel) có nồng độ theo yêu cầu.

Thành phần (ml)	Nồng độ của gel				
	5%	8%	10%	12%	15%
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Dung dịch acrylamide 30%	3,3	5,3	6,7	8,0	10,0
SDS 10%	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ammonium persulfate (AP)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Nước	11,3	9,3	7,9	6,6	4,6

2) Thêm 10 µl TEMED, rót dịch vào khuôn gel đến 8/10 độ cao. Sau đó cho thêm nước cất hoặc ethanol một cách nhẹ nhàng lên lớp *dung dịch acrylamide*. Chờ gel cứng.

**Dung dịch acrylamide 30%** gồm acrylamide 29% và *bis*-acrylamide 1%.

3) Chế tác gel tập trung (stacking gel): Hòa 2,5 ml Tris-HCl 0,5M (pH 6,5), 1,5 ml dung dịch acrylamide 30%, 0,1 ml SDS 10%, 0,1 ml AP 10% và 5,8 ml nước cất.

4) Loại bỏ lớp nước hoặc ethanol trên lớp gel phân tách đã cứng. Thêm vào dung dịch gel tập trung 10 µl TEMED rồi rót trên gel phân tách đã cứng (thay thế nước hoặc ethanol). Ráp lược trên gel và chờ đến khi gel cứng (khoảng 1 - 2 giờ).

## 2.2. Điều chế mẫu, điện di và nhuộm

Lượng mẫu cần phân tích nếu nhuộm bằng Coomassie brilliant blue thì cần 0,5 - 1,0 µg/băng, còn nếu nhuộm bạc thì độ nhạy cao gấp khoảng 100 lần. Lượng tối đa có thể phân tích đương nhiên phụ thuộc vào số lượng băng nhưng có thể phân li được hàng trăm µg mỗi làn (với độ cao lỗ mẫu khoảng 1 cm và gel dày 1 mm).

1) Trộn khoảng 10 µl mẫu có nồng độ thích hợp với 10 µl *dung dịch đậm* 2×, xử lý ở 100 °C trong 3 phút. Size marker protein (protein dấu phân tử lượng) cũng được xử lý tương tự và điện di bên cạnh.

**Dung dịch đậm 2×** chứa Tris-HCl (pH 6,5) 50mM, glycerol 10%, SDS 2%, BPB 0,1% và 2-mercaptoethanol 2% (*thêm* mercaptoethanol ngay trước khi sử dụng).

2) Sau khi gel đã cứng, rút lược khỏi bản gel, loại bỏ hết khí nếu có trong gel, ráp vào thiết bị điện di, đổ đầy chậu trên và dưới của thiết bị điện di. Tải 5 - 20 µl mẫu vào lỗ tải mẫu, điện di 100 - 105 V cho đến khi BPB tiến sát đến mép dưới của bản gel thì dừng (khoảng 2 - 3 giờ).

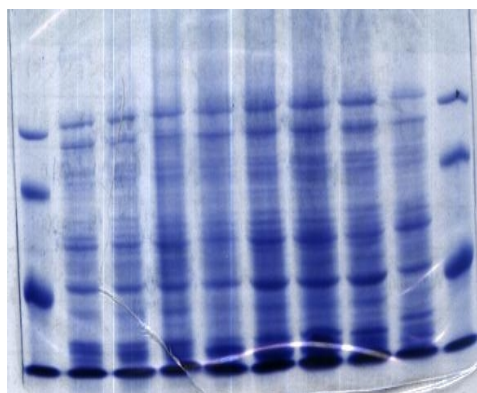
3) Nhuộm bằng CBB: Lấy gel ra khỏi thiết bị điện di, ngâm vào *dung dịch thuốc nhuộm CBB*, đảo lắc nhẹ nhàng khoảng 2 giờ đến qua đêm.

**Dung dịch thuốc nhuộm CBB** chứa Coomassie brilliant blue (CBB) R-250 0,1%, methanol 50% và acetic acid 10%.

4) Ngâm gel vào dịch tẩy màu (*chứa* 10% methanol, 7% acetic acid). Cho vào đó ít tấm giấy thấm Kimwipe để hấp thụ chất màu, đảo lắc nhẹ nhàng để tẩy màu.

5) Có thể chụp ảnh tồn trữ tư liệu hoặc là đặt lên giấy thấm 3MM rồi làm khô bằng máy sấy gel. Tương tự, cũng có thể bảo quản tốt hơn nếu kẹp gel ướt vào giữa hai tấm màng celophan sao cho không còn không khí giữa hai tấm màng rồi đưa vào sấy khô trong máy sấy (80 °C trong khoảng 2 giờ).





**Hình 12: Kết quả điện di protein toàn tế bào một số chủng vi khuẩn trong gel SDS-PAGE.**

Bản gel được nhuộm bằng CBB R-250, kẹp giữa hai tấm cellophan và sấy khô có thể lưu giữ được lâu. Chú ý các làn ở biên thường biến dạng.

### **3. Phương pháp thấm Western (Western blot)**

Sau khi điện di, protein được chuyển sang màng nylon hay nitrocellulose rồi thao tác kiểm xuất protein đặc hiệu bằng kháng thể. Tuy nhiên, phương pháp có thể biến đổi tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu và loại mẫu. Phổ biến nhất là dùng phương pháp kháng thể gián tiếp đánh dấu peroxidase (conjugate gián tiếp HRPO). Dưới đây trình bày phương pháp này. Những phương pháp sử dụng conjugate đánh dấu enzyme khác như phosphatase kiềm cũng tiến hành tương tự nhưng với cơ chất màu khác loại.

#### **3.1. Blotting**

1) Tháo gel khỏi thiết bị điện di. Ngâm gel vào *dung dịch đệm chuyển mẫu* hai lần mỗi lần khoảng 5 phút để trung hòa.

**Dung dịch đệm chuyển mẫu** chứa Tris 25mM, glycine 192mM và methanol 20%.

2) Cắt màng (nylon, nitrocellulose) theo kích thước của gel, đặt gel và màng vào thiết bị chuyển mẫu sao cho có trình tự như sau: cực âm (cathode) - giấy thấm 3MM - gel - màng - 3MM - cực dương (anode). Ráp thiết bị và cho chạy trong 1 đêm ở 30 V hoặc 5 giờ ở 60 V. Khi cần, để nhiệt độ không tăng cao cần bố trí chuyển gel trong phòng lạnh.

Gần đây phương pháp chuyển mẫu từ gel sang màng được cải tiến.

Thiết bị chuyển gel semi-dry tăng tốc độ chuyển mẫu rất nhiều. Thiết bị này cũng cấu tạo từ hai bản cực có diện tích lớn và tương đương nhau và thường lớn hơn gel, một tấm trên và một tấm dưới. Đặt lên tấm bản cực dưới (anode) một tấm 3MM, lại đặt lên đó một màng lọc có kích thước bằng bản gel, sau đó là bản gel rồi một tấm 3MM và cuối cùng đặt bản cực thứ hai (cathode) ép lên sao cho không khí không tồn tại ở khoảng giữa gel và màng. Bật điện để điện di nhờ độ ẩm từ gel thấm ra giấy trong khoảng 3 giờ dưới 60 V (nên thực hiện trong buồng lạnh).

### 3.2. Nhuộm bằng kháng thể

1) Blocking (phong bế) có tác dụng ngăn trở kháng thể thấm và cố định không đặc hiệu vào phần còn lại (chưa được gắn protein). Tháo màng khỏi thiết bị chuyển, ngâm màng vào *dung dịch phong bế màng* (membrane blocking solution) khoảng 20 ml/màng trong một ống chất dẻo hoặc túi chất dẻo trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Lắc đều, nhẹ nhàng.

**Dung dịch phong bế màng** gồm 10% huyết thanh bê, hoặc là 1% albumin huyết thanh bò và 3% gelatin, 1% sữa loại bơ (skim milk) pha trong PBS hoặc  $T_{10}N_{50}$ -NP40. Huyết thanh bê là dịch phong bế thường sử dụng nhất. Đương nhiên, nếu nghiên cứu protein huyết thanh thì không được sử dụng các thành phần của huyết thanh. Gelatin nếu gặp lạnh sẽ keo cứng lại nên cần nâng nhiệt độ lên trong quá trình ủ.

$T_{10}N_{50}$ -NP40 chứa Tris-HCl (pH 7,5) 10mM, NaCl 50mM và nonident P-40 0,05%.

2) Kết hợp kháng thể: Pha loãng kháng thể (thường pha loãng 1.000 - 3.000 lần bằng dung dịch phong bế màng), cho màng vào túi chất dẻo, thêm vào đó 5 - 10 ml dung dịch kháng thể, ủ trong 1 - 3 giờ, lắc đảo nhẹ nhàng thường xuyên.

3) Ngâm mỗi màng trong 10 ml  $T_{10}N_{50}$ -NP40 ba lần liên tiếp mỗi lần 10 phút trên máy lắc. Cuối cùng rửa màng thêm 10 phút bằng dung dịch này lần nữa.

4) Kết hợp kháng thể thứ hai (conjugate): Pha loãng kháng thể gắn peroxidase trong dung dịch phong bế, ngâm màng tương tự như bước thứ hai nêu trên trong khoảng 1 giờ.

5) Rửa màng tương tự bước thứ ba nêu trên.

6) Phản ứng phát màu: pha sẵn 15 mg 4-chloro-1-naphtol trong 5 ml methanol và 15  $\mu$ l  $H_2O_2$  30% trong 25 ml  $T_{10}N_{50}$ -NP40. Trước khi sử dụng

pha hai dung dịch này để có dung dịch cơ chất màu của peroxidase. Ngâm màng trong dung dịch này trong 10 - 20 phút để phát màu. Để phát màu xong đem màng rửa nước và sấy khô. Kết quả phát màu phản ánh sự hiện diện của kháng nguyên đặc hiệu với kháng thể dùng cho phản ứng tức là kháng nguyên protein đích.

*Chú ý:* Ngoài cơ chất màu trên đây với trường hợp kháng thể kết hợp peroxidase còn có thể sử dụng cơ chất màu 3,3'-diamino-benzidine tetrachloride (DAB) hoặc 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)... với màu phát ra khác biệt.

Bên cạnh kháng thể kết hợp peroxidase ta còn sử dụng kháng thể kết hợp phosphotase kiềm hoặc kháng thể kết hợp protein A, hay đánh dấu phóng xạ bằng nguyên tố  $^{125}\text{I}$  với những phương pháp kiểm tra riêng.

## **XI. Tinh chế protein kết hợp DNA nhờ sử dụng trình tự DNA đặc hiệu**

Đây là phương pháp cho kết hợp protein với trình tự DNA đặc hiệu để xác định và phân lập các protein liên quan quá trình phiên mã gen, quá trình tự sao (phục chế DNA) cũng như liên quan quá trình ức chế tái tổ hợp... Đây là phương pháp lợi dụng lực kết hợp mạnh giữa protein với đoạn DNA chứa trình tự nucleotide đặc hiệu mà protein đó nhận biết và kết hợp với. Phương pháp này được thử khá sớm nhưng kể từ khi một số nhà nghiên cứu áp dụng để tinh chế yếu tố phiên mã SP1 nhờ kết hợp oligonucleotide tổng hợp thì phương pháp nghiên cứu này trở nên ứng dụng rộng rãi.

### **1. Điều chế DNA**

Nhìn chung, phương pháp sử dụng oligonucleotide tổng hợp được sử dụng rộng rãi hơn phương pháp sử dụng đoạn DNA đặc hiệu đã biến tính. Nhờ phương pháp này có thể tinh chế protein với hiệu suất cao, tỷ suất thu hồi protein đích lớn và giảm được lượng protein tạp nhiễm đến mức tối thiểu nên không cần áp dụng các biện pháp sơ chế hay loại bỏ bớt. Để làm được điều đó, cần sử dụng những cột sắc ký được chế tác trong đó đảm thể (vật mang hay cơ chất mang) được gắn trực tiếp với DNA chứa chỉ trình tự nucleotide thiết yếu nhất có lực kết hợp cao với protein mục tiêu. Cần chế tác những đoạn DNA chứa trình tự nucleotide như thế và tạo đầu lồi (đầu dính) bổ sung chứa 2 - 4 nucleotide và từ đầu dính đó thiết kế nucleotide tổng hợp được kéo dài thêm còn các gốc amino của nucleotide (của gốc purine và pyrimidine) dùng để kết hợp với sepharose được hoạt hóa bằng CNBr. Dưới đây mô tả trường hợp oligonucleotide tổng hợp được sử dụng trong quá trình tinh chế SP1. Khi đó đoạn nucleotide tổng hợp bổ sung trong trường hợp này là:



1) Hòa tan oligonucleotide tổng hợp mỗi đầu khoảng 200 µg trong 10 µl *dung dịch đệm kinase 10×* và 65 µl nước cất. Sau đó xử lý nhiệt ở các mức giảm dần 90 °C 2 phút, 65 °C 10 phút, 37 °C 10 phút, nhiệt độ phòng 5 phút để cho bắt cặp (anneal).

**Dung dịch đệm kinase 10×** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 0,5M, MgCl<sub>2</sub> 0,1M, DTT 0,05M, spermidine 0,01M và EDTA 0,01M.

2) Để có đầu 5' được phosphoryl hóa, thêm 10  $\mu$ l ATP 200mM, 0,5  $\mu$ l [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (với mục đích kiểm tra tỷ suất DNA gắn kết đảm thể cột sắc ký), 10  $\mu$ l T4 polynucleotide kinase (100 đơn vị/ $\mu$ l) và 4,5  $\mu$ l nước cất, ủ ở 37 °C trong 2 giờ.

3) Ủ ở 65 °C trong 15 phút để dừng phản ứng, sau đó thêm 10  $\mu$ l sodium citrate 5M, 25  $\mu$ l  $MgCl_2$  100mM và 25  $\mu$ l nước, kết tủa bằng ethanol.

4) Tráng tủa bằng ethanol 70%, sau khi để khô thêm vào tủa DNA 10  $\mu$ l dung dịch đệm kết nối (ligation buffer solution) và 85  $\mu$ l nước, hòa trộn kỹ rồi thêm vào đó 5  $\mu$ l T4 DNA ligase, cho phản ứng xảy ra ở 4 - 16 °C trong 4 giờ.

5) Chiết xuất bằng phenol, sau đó kết tủa bằng ethanol. Sau khi tráng bằng ethanol 75%, để khô rồi hòa tan trong 100  $\mu$ l nước. Lặp đi lặp lại mấy lần thao tác kết tủa bằng ethanol để loại bỏ hết Tris (vì nhóm amino trong dung dịch có chất Tris ngăn trở sự kết hợp (coupling) DNA với sepharose).

6) Hòa tan trong 100  $\mu$ l nước.

## **2. Kết hợp DNA với sepharose đã được hoạt hóa bởi CNBr**

Sử dụng sepharose 4 B đã hoạt hóa bởi CNBr (hãng Pharmacia... sản xuất) có thể là phương pháp tốt để chế cột sắc ký gắn kết DNA với đảm thể (vật mang).

1) Cho 1,2 g Sepharose 4 B (sao su hấp phụ) đã hoạt hóa bằng CNBr trong 35 ml dung dịch HCl 1mM trong một ống nghiệm 50 ml (Corning...), trộn đều cho đến khi đồng nhất (làm trong phòng lạnh).

2) Sử dụng một phễu lọc kết nối một bơm chân không hoặc một máy hút để hút dịch cho đến khi Sepharose vừa ráo nước (không được làm khô). Sau đó vừa hút vừa cho thêm 150 ml HCl 1mM để rửa thêm (làm trong phòng lạnh).

3) Cho 15 ml sodium phosphate 10mM (pH 8,2 ở 4 °C) đi qua lọc (làm trong phòng lạnh).

4) Rửa ba lần mỗi lần 15 ml sodium phosphate 10mM (pH 8,2 ở 4 °C) (làm trong phòng lạnh).

5) Huyền dịch hóa Sepharose trong 6 ml dung dịch đệm phosphate, cho vào ống (làm trong phòng lạnh).

6) Thêm vào đó dung dịch DNA đã được chuẩn bị ở trên (mục 1.) (làm trong phòng lạnh).

- 7) Đảo trộn trong 16 - 18 giờ ở nhiệt độ phòng (dùng máy đảo trộn).
- 8) Thêm 0,5 ml Tris-HCl 2M (pH 8,0), đảo trộn 2 giờ để phong bế các gốc chưa phản ứng.
- 9) Dùng phễu lọc thủy tinh lọc 3 lần bằng 10 ml Tris-HCl 0,1M (pH 8,0), 3 lần bằng 10 ml sodium phosphate (pH 8,2) 0,1M, 3 lần bằng 10 ml hỗn hợp NaCl 1,5M và Tris-HCl (pH 8,0) 10mM và cuối cùng 3 lần bằng 10 ml hỗn hợp NaCl 0,1M, Tris-HCl (pH 8,0) 10mM và EDTA 1mM.

Với cách xử lý này có khoảng 60% DNA kết hợp vào cột sắc ký.

### ***3. Tinh chế protein bằng cột Sepharose đã kết hợp DNA có trình tự base đặc hiệu***

Người ta đã sử dụng phương pháp này để tinh chế các protein SP1, AP1, HSTF, NF1... Cột Sepharose đã kết hợp DNA đặc hiệu có thể sử dụng để tinh chế protein trong dịch chiết xuất toàn tế bào, dịch chiết xuất nhân ở dạng nguyên sơ hoặc các loại dịch đó đã sơ chế qua các cột sắc ký có thể tinh chế nhờ kết hợp mạnh DNA đặc hiệu đó. Tuy nhiên thực tế không đơn giản như vậy. Vì vậy cần loại bỏ bớt những protein khác trong đó có những hợp chất hấp phụ không đặc hiệu với DNA cũng như kiểm tra hàng loạt điều kiện như sử dụng chất tăng hoạt tính bề mặt, tính chất và lượng DNA... Dưới đây là ví dụ về quy trình tinh chế protein SP1 nhờ cột DNA đặc hiệu nêu trên.

Lấy dịch chiết xuất nhân tế bào từ 60 g tế bào HeLa đem lọc qua cột Sephacryl S-300, DEAE Sepharose, Heparin agarose và cột FPLC Mono S để thu mẫu protein sơ chế (khoảng 1,5 mg). Dung dịch protein pha trong dung dịch đệm Tris-HCl (pH 7,9) 50mM,  $MgCl_2$  12,5mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, glycerol 20% và KCl 0,25M. Trộn với 220  $\mu$ g DNA tuyến ức của bò đã cắt nhỏ và dung dịch đệm A để hạ nồng độ KCl đến 0,1M. để dung dịch này ở 4 °C trong 10 phút, sau đó tải lên cột sắc ký hấp phụ. Sau khi rửa bằng dung dịch đệm A, nâng dần nồng độ KCl lên để dung xuất protein. Thu hồi được SP 1 khi nồng độ KCl khoảng 0,4M đến 0,6M.

**Dung dịch đệm A** chứa HEPES-KOH (pH 7,6) 25mM,  $MgCl_2$  12,5mM, DTT 1mM, glycerol 20% và Nonident P-40 0,1%.

## XII. South-Western hybridization

Nhờ những nghiên cứu protein kết hợp đặc hiệu DNA người ta biết được sự tồn tại của các nhân tố kết hợp các miền điều tiết phiên mã như miền operator, enhancer... South-Western hybridization được thực hiện bằng cách điện di trong SDS-polyacrylamide gel các protein có trong dịch chiết xuất tế bào sau đó chuyển lên màng lọc (nitrocellulose, nylon) rồi dùng DNA đã đánh dấu nhận biết các protein kết hợp đặc hiệu. Có thể suy định được phân tử lượng của protein cũng như lợi dụng để kiểm định khi tinh chế protein. Nhìn chung, phương pháp này rất khó ứng dụng trong thực tế nhưng nếu được thì protein kiểm xuất được có tính đặc hiệu rất cao.

### 1. Điều chế dịch chiết xuất tế bào

Có thể sử dụng dịch chiết xuất toàn tế bào cũng như dịch chiết xuất nhân (tiết trước) với nồng độ KCl (hoặc NaCl) thấp hơn 0,2M. Nhưng cũng có thể điều chế dịch chiết xuất tế bào theo phương pháp dưới đây (thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 0 - 4 °C).

- 1) Rửa tế bào nuôi thu được bằng dung dịch PBS, quay li tâm 5 phút ở 1.200 - 2.000 v/ph, thu cặn (tế bào).
- 2) Huyền dịch hóa tế bào trong *dung dịch dung xuất* sao cho nồng độ tế bào vào khoảng  $35 \times 10^6$  tế bào/ml, hút nhả bằng pipet nhiều lần để huyền dịch hóa. Để trong nước đá 10 phút.

**Dung dịch dung xuất** chứa HEPES (pH 8,0) 10mM, NaCl 50mM, saccharose 0,5M, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, Triton X-100 0,5% và  $MgCl_2$  5mM.

- 3) Chuyển sang ống Eppendorf, quay li tâm 3.000 v/ph trong 5 phút.
- 4) Thu cặn (nhân tế bào), huyền dịch hóa cặn bằng dịch dung xuất với lượng để có khoảng  $70 \times 10^6$  tế bào/ml. Thêm 5 mM spermidine, 0,5 mM NaCl, trộn đều rồi để yên ống trong nước đá 30 - 60 phút. Li tâm 10 phút ở 12.000 v/ph.
- 5) Thu lấy nước mặt, thẩm tích đổi *dung dịch đệm thẩm tích* trong 1 đêm.

**Dung dịch đệm thẩm tích** chứa 10 mM HEPES (pH 8,0), 50 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT và 50% (v/v) glycerol.

- 6) Chia ra từng lượng nhỏ vừa sử dụng. Đông kết trong nitơ lỏng rồi bảo

quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Phương pháp South-Western blot (thẩm South-Western)

1) Thêm vào dịch chiết xuất (10  $\mu\text{g}$ /làn) một lượng tương đương *dung dịch mẫu nghiệm*. Để ở nhiệt độ phòng 5 phút sau đó điện di SDS-PAGE trong 7 - 15% acrylamide (thường 100 - 150 V, chú ý duy trì nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$  nhờ bơm đối lưu).

**Dung dịch mẫu nghiệm** chứa Sarcosyl 5%, Tris-HCl (pH 6,6) 5mM, DTT 200mM, pyronin Y 0,05% và glycerol 20% (v/v). (Sarcosyl (tức sodium *N*-lauryl sarcosynate) là chất tẩy rửa không kết tủa khi nhiệt độ thấp cũng như khi trong dung dịch có ethanol).

2) Ngâm gel hai lần trong dung dịch chuyển thẩm mỗi lần 5 phút để cân bằng. Chuyển thẩm protein sang màng nitrocellulose (hoặc nylon) nhờ thiết bị chuyển thẩm dùng dòng điện một chiều. Sử dụng điện thế 60 V trong 5 - 6 giờ hoặc 30 V trong 1 đêm.

3) Lau nhẹ để loại bỏ dung dịch chuyển thẩm còn sót lại trên màng, ngâm màng trong dịch chứa sữa không kem 5% và HEPES (pH 8,0) 10mM trong 30 phút ở nhiệt độ phòng.

4) Rửa màng lọc bằng dịch kết hợp. Sau đó ủ màng trong dịch kết hợp có pha DNA đặc hiệu (dài khoảng 100 - 500 bp) đã đánh dấu [ $^{32}\text{P}$ ] có cường độ phóng xạ khoảng  $1 - 5 \times 10^5$  cpm/ml. Điều kiện ủ là 1 giờ ở  $30^{\circ}\text{C}$ , trong túi lai có chứa 1 - 2 ml dung dịch lai/100  $\text{cm}^2$  màng.

**Dịch kết hợp** chứa HEPES (pH 8,0) 10mM, NaCl 50mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM và sữa bột không kem 0,25 %.

5) Sau đó rửa màng vài ba lần trong dịch kết hợp có pha thêm 0,2 M KCl, khoảng 1 giờ rửa tất cả, tự ký phóng xạ.

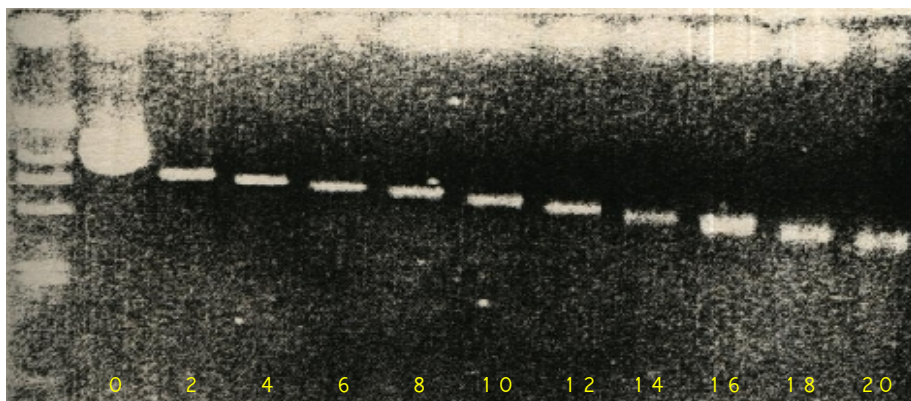


### XIII. Phương pháp tạo thể đột biến nhân tạo

Để phân tích và xác định các miền cơ năng trong phân tử DNA như promoter, enhancer... cũng như các miền cơ năng trong phân tử protein (trung tâm hoạt động của enzyme...) người ta phải chế tác một cách có chủ định và di nhập các biến dị nhân tạo vào các DNA đã được clone hóa. Phương pháp tạo thể biến dị nhân tạo có thể bao gồm việc chế tác thể đột biến khuyết tổn (deletion mutant) và chế tác thể đột biến điểm (point mutant).

#### 1. Chế tác thể đột biến khuyết tổn

Có thể dùng exonuclease *Bal* 31 trong chế tác một loạt thể biến dị khuyết tổn có phương hướng từ đầu phân tử DNA. Enzyme này tiêu hóa dần DNA với vận tốc khoảng 50 bp/phút. Vì vậy tùy thời gian ủ mà ta có sản phẩm thu được dài hay ngắn.



**Hình 13: Một trường hợp xử lý DNA bằng enzyme *Bal* 31.**

DNA bị cắt ngắn dần phụ thuộc thời gian xử lý, lần lượt các làn từ trái sang phải: sau xử lý 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 và 20 phút.

Vấn đề quan trọng là ở chỗ làm thế nào để có thể tiêu hóa đoạn DNA xác định từ *một hướng*. Để thực hiện được việc này người ta clone hóa DNA xác định vào plasmid bằng hai enzyme hạn chế khác nhau, chẳng hạn A và B, (ta có plasmid mạch vòng), sau đó dùng một trong hai enzyme hạn chế này (chẳng hạn enzyme A) cắt plasmid tại điểm nối (làm plasmid tổ hợp có mạch thẳng). Từ điểm nối này nếu cho DNA phản ứng với *Bal* 31 thì một đầu của DNA đã định đó và một đầu tự do của plasmid

bị cắt đứt dần. Sau khi cắt bằng *Bal* 31, người ta dùng enzyme Klenow làm bằng đầu DNA rồi dùng linker kết nối các đầu để có chỗ cho enzyme hạn chế hoạt động, khi đó xử lý lại bằng enzyme hạn chế A sẽ tạo được đầu dính. Đến đây dùng enzyme B cắt tiếp để đoạn còn lại của DNA đích đứt khỏi đoạn DNA còn lại của plasmid. Sau khi phân li (bằng điện di trong gel) và tinh chế, người ta thu lại được đoạn DNA đích đã bị cắt đứt một phần và có hai đầu dính, trong đó một đầu đặc hiệu enzyme A còn đầu khác đặc hiệu enzyme B. Dùng enzyme ligase (T4) kết nối với plasmid có cặp đầu dính tương tự ta sẽ lại tổ hợp được đoạn DNA đích đã bị cắt đứt từ phía enzyme A (nhưng phía enzyme B vẫn nguyên vẹn). Di nạp tổ hợp này vào tế bào khả biến ta có thể kiểm tra được vai trò của phần đã bị cắt đứt của DNA đích. Đương nhiên, việc kiểm soát độ dài bị cắt đứt đi của DNA đích là khó khăn, cho nên người ta phải thực hiện với nhiều clone khuyết tổn khác nhau từ những sản phẩm ủ trong thời gian dài ngắn khác nhau với *Bal* 31, sau khi phân tích sự biểu hiện của gen trong các clone người ta tiến hành kiểm tra lại trình tự nucleotide của đoạn còn lại của các clone. Nhờ vậy, vai trò của đoạn cắt đứt cũng như độ dài của trình tự đoạn bị cắt đứt được xác định.

### 1.1. Tiêu hóa từng phần bằng *Bal* 31

1) Từ clone đã tìm hiểu vai trò DNA tái tổ hợp ta tinh chế DNA plasmid và lấy khoảng 30  $\mu$ g cho xử lý *Bal* 31, sau đó chiết xuất bằng phenol và kết tủa bằng ethanol, tráng tủa DNA bằng ethanol 70% và hòa tan trong 30  $\mu$ l TE.

2) Thêm vào DNA 150  $\mu$ l *dung dịch đệm Bal 31 2 $\times$*  và 70  $\mu$ l nước cất (tổng lượng 250  $\mu$ l), ủ tiền khởi 10 phút ở 30 °C.

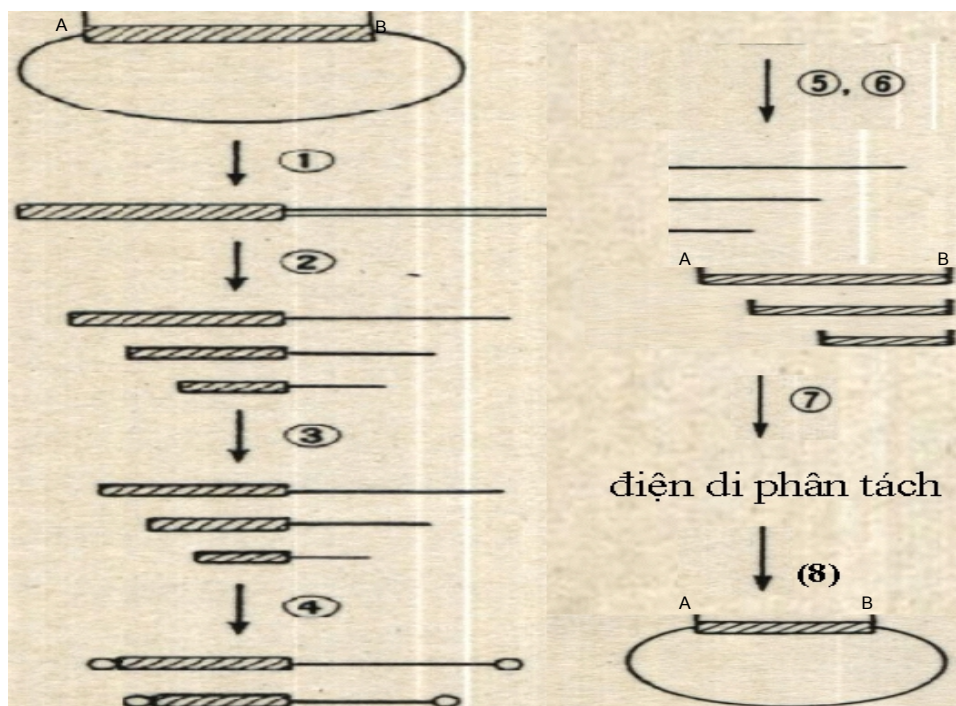
**Dung dịch đệm *Bal* 31 2 $\times$**  chứa Tris-HCl (pH 8,0) ở nồng độ 40mM, MgCl<sub>2</sub> 24mM, CaCl<sub>2</sub> 24mM, NaCl 1,2mM và EDTA 2mM.

3) Thêm 50  $\mu$ l (1 đơn vị/ml) *Bal* 31 F (thể F) cho phản ứng xảy ra ở 30 °C. Sau khoảng 2 phút (hay ngắn hơn) lấy từng 30  $\mu$ l một cho vào ống đã chứa sẵn 2  $\mu$ l EDTA 0,5M để dừng phản ứng. Kết cục ta có 10 ống dịch đã dừng phản ứng tất cả.

4) Từ các ống lấy mỗi ống khoảng 0,2  $\mu$ l để thực hiện điện di trong gel agarose để xác nhận kết quả tiêu hóa. Trong gel chứa ethidium bromide, dưới đèn UV ta có thể quan sát các làn với các băng DNA có phân tử lượng nhỏ dần (phụ thuộc vào thời gian xử lý *Bal* 31).

5) Chọn DNA trong những ống có kết quả tiêu hóa thích hợp (ước chừng

nên cần chọn nhiều ống). Thực hiện chiết xuất bằng phenol-chloroform rồi kết tủa bằng ethanol. Có thể chiết xuất và tinh chế trước rồi thực hiện điện di kiểm tra từ bước này (thay cho bước 4) ở trên) cũng được.



**Hình 13: Sơ đồ quy trình thực hiện tạo thể đột biến đoạn sử dụng *Bal 31*.**

DNA nguyên bản được clone hóa trong plasmid nhờ hai enzyme hạn chế (A và B) bị cắt ở một trong hai vị trí đó (A); 2) cắt dần DNA bởi *Sal 31*; 3) Làm bằng đầu các DNA bằng Klenow; 4) nối linker tạo vị trí nhận biết của enzyme A; 5) và 6) Cắt bằng cả hai enzyme A và enzyme B; 7) Điện di phân tách; 8) Di nạp DNA đích vào plasmid mới.

## 1.2. Tạo dòng phụ (subcloning) đoạn khuyết tổn

1) Hòa tan DNA khuyết tổn trong 10  $\mu$ l TE, xử lý bằng enzyme Klenow và dNTP để tạo đầu bằng của DNA (như đã mô tả trên đây). Vô hoạt enzyme bằng cách đun nóng 70  $^{\circ}$ C trong 5 phút, rồi để nguyên như vậy thực hiện phản ứng gắn linker.

2) Thực hiện phản ứng kết nối linker (như mô tả trước đây). Tiêu hóa bằng enzyme hạn chế A và B (cùng lúc cũng được).

3) Điện di sản phẩm trong gel agarose để thu hồi các đoạn DNA khuyết

tôn (đã gắn linker) có độ dài thích hợp.

4) Tổ hợp DNA đích vào khoảng A và B của plasmid vector.

*Chú ý:* Ngoài *Bal* 31 còn có thể sử dụng exonuclease khác, như exonuclease III chỉ cắt DNA từ đầu dính 5' mà không cắt đầu dính 3' nên có thể thực hiện biến dị khuyết tôn từ một phía. Kit biến dị khuyết tôn có thể đặt mua từ công ty Takara...

## **2. Chế tác thể đột biến vị trí chỉ định**

Việc chế tác thể đột biến có thể là phương pháp sử dụng DNA đã đột biến một cách ngẫu nhiên do cho tác động hóa chất gây biến dị đến DNA và phương pháp tổng hợp và sử dụng DNA có đột biến một cách đặc hiệu. Gần đây cùng với việc phổ cập máy tổng hợp DNA phương pháp sau thường được sử dụng rộng rãi hơn.

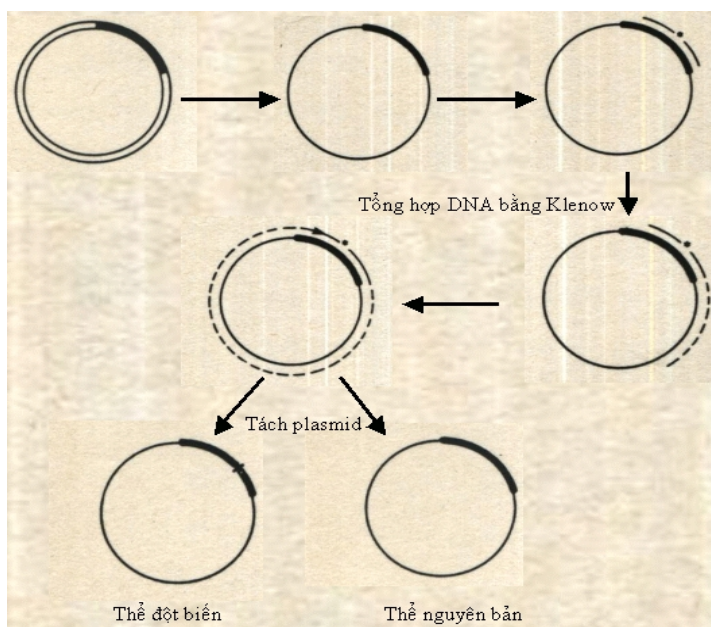
### **2.1. Phương pháp sử dụng DNA tổng hợp làm mẫu**

Tổ hợp đoạn DNA đã di nhập biến dị vào dạng tái tạo (RF - replicative form) của phage M 13, rồi điều chế DNA một sợi và dùng DNA tái tổ hợp một sợi này làm khuôn. Mặt khác, thực hiện chế tác DNA tổng hợp (dài khoảng 20 nucleotide) mang biến dị (do chủ ý thay đổi chủng loại dNTP trong quá trình tổng hợp oligonucleotide). Phần biến dị có thể ở trung tâm hoặc là gần về phía đầu 5'. Lai DNA này với DNA khuôn, sau đó dùng enzyme Klenow kéo dài chuỗi từ đầu 3' của sợi oligonucleotide, cuối cùng kết nối với đầu 5', như vậy hình thành DNA hai sợi đầy đủ nhưng có chỗ không bổ sung (mismatch) là vị trí đoạn DNA được lai vào một cách cố ý. Di nạp phage này vào vi khuẩn *E. coli*, thực hiện plaque hybridization để phát hiện và chọn plaque mang biến dị.

#### **2.1.1. Điều chế DNA khuôn**

1) Tổ hợp đoạn DNA muốn di nhập đột biến điểm vào phage M 13 (hoặc pUC 118 cũng được).

2) Di nạp vào *E. coli*, phân li plaque màu trắng của thể tổ hợp phage M 13. Điều chế DNA một sợi (xem mục Xác định trình tự nucleotide sử dụng M 13).



**Hình 8: Sơ đồ tiến trình tạo thể đột biến điểm với mỗi DNA tổng hợp.**  
 Một oligonucleotide được tổng hợp dựa vào trình tự điểm mục tiêu cần biến dị nhưng có một base khác biệt làm môi cho việc tổng hợp sợi bổ sung.

### 2.1.2. Tinh chế DNA tổng hợp

Việc tinh chế DNA tổng hợp từ máy tổng hợp DNA được thực hiện nhờ phương pháp điện di trong gel polyacrylamide và nhờ HPLC (high performance (pressure) liquid chromatography - sắc ký lỏng cao áp (cao tốc)). Trong mục này trình bày phương pháp tinh chế bằng điện di trong gel.

- 1) Cho dịch DNA tổng hợp được hòa tan trong nước ammonia, ủ 55 °C qua đêm để loại bỏ giá thể.
- 2) Chuyển sang ống Eppendorf 1,5 ml, làm khô bằng máy cô đặc bằng chân không.
- 3) Hòa tan trong 40 µl TE, quay li tâm để loại bỏ cặn.
- 4) Thêm 1/10 thể tích dịch màu pha formamide, để ở 90 °C trong 5 phút sau đó làm lạnh nhanh bằng cách nhúng ống vào nước đá.

5) Điện di trong gel polyacrylamide 16% chứa urea 8M trong 2 - 3 giờ dưới điện áp 200 V.

6) Xác nhận bằng DNA chính bằng UV, khi điện di DNA tổng hợp dài 20 - 30 bp sẽ di động ở khoảng giữa BPB và XC (nếu có nhiều băng thì không nên sử dụng vì chất lượng quá trình tổng hợp DNA thấp).

7) Nghiền nát gel trong *dung dịch dung xuất*, ủ 3 - 4 giờ ở 37 °C, để đoạn DNA hòa tan vào dung dịch.

**Dung dịch dung xuất** chứa ammonium acetate ở nồng độ 0,5M, magnesium acetate 10mM, EDTA 1mM và SDS 0,1%.

8) Pha loãng dịch dung xuất này 4 - 5 lần, cho hấp phụ lên cột DE 52, sau đó dung xuất bằng TE chứa NaCl 1,5M mà thu hồi DNA tổng hợp.

### 2.1.3. Kiểm tra sự gắn môi (*priming*)

Trước khi thực hiện chế tác thể biến dị cần phải xác nhận xem DNA tổng hợp đã tinh chế có lai đúng với DNA khuôn hay không và từ đó với enzyme Klenow có thể tổng hợp nối dài hay không. Khi đó cần thu nhận nhiệt độ lai ở mức nào, và quyết định những điều kiện thích hợp nhất. Thông thường nhiệt độ lai phụ thuộc vào độ dài của DNA tổng hợp, như là tiêu chuẩn, lai 17-mer ở 30 - 35 °C, 23-mer ở 37 - 42 °C.

1) Sử dụng [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP và polynucleotide kinase đánh dấu đầu 5' của 100 pmol DNA tổng hợp (khoảng 1  $\mu$ g đối với 20-mer).

2) Hòa tan 2,5 - 5,0 pmol tổng hợp đó với 0,5 pmol DNA khuôn (khoảng 2  $\mu$ g) và 1  $\mu$ l *dung dịch TMND*, thêm nước cho đủ 10  $\mu$ l. Cứ mỗi mẫu làm nhắc lại trong ba ống.

**Dung dịch TMND** chứa Tris-HCl (pH 7,5) 0,2M, MgCl<sub>2</sub> 0,1M, NaCl 0,5M và DTT 10mM.

3) Xử lý cả ba ống trong 3 phút ở 80 °C, sau đó để các ống ở 33 °C (ô1), 37 °C (ô2) và 41 °C (ô3) trong 10 phút cho phản ứng lai xảy ra.

4) Thêm vào các ống mỗi ống 0,5  $\mu$ l TMND, 1  $\mu$ l của bốn loại dNTP 2mM (nồng độ mỗi loại 2mM trong dịch hỗn hợp dNTP), 5 đơn vị enzyme Klenow, tổng 12  $\mu$ l.

5) Ủ 37 °C trong 1 giờ cho phản ứng nối dài môi xảy ra.

6) Cắt DNA hai sợi (đã tổng hợp do nối dài môi) bằng enzyme hạn chế (có nơi nhận biết) khoảng 200 - 300 base về phía cuối dòng so với vị trí DNA tổng hợp đã lai.

7) Thêm dịch màu pha formamide 1/10 lượng, xử lý nhiệt 90 °C trong 5 phút.

8) Tự ký phóng xạ, xác nhận phản ứng nối dài mỗi xảy ra hoàn thiện hay không như đã trông đợi hay không.

#### 2.1.4. Di nhập biến dị

Do cần phải kiểm soát phản ứng nối dài nên trong phản ứng nối dài mỗi lần này phải sử dụng [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP để đánh dấu.

1) Phosphoryl hóa DNA tổng hợp để làm mỗi bằng ATP không đánh dấu. Phương pháp như đã trình bày trên mục 1.3. nhưng thay [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP bằng ATP phi phóng xạ.

2) Trộn mỗi này (~10 pmol) với DNA khuôn (1 pmol), kết tủa bằng ethanol rồi hòa tan vào dung dịch TMND pha loãng 10 lần để thực hiện lại. Điều kiện lai tuân theo điều kiện được chọn qua bước kiểm tra nêu trên.

3) Trộn hỗn hợp gồm 1  $\mu$ l dung dịch TMND, 2  $\mu$ l *dung dịch TP*, 5  $\mu$ Ci [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, 1  $\mu$ l T4 ligase (khoảng 300 đơn vị) và 1  $\mu$ l enzyme Klenow (khoảng 2 đơn vị) hòa với nước cho đủ 20  $\mu$ l.

**Dung dịch TP** gồm dATP, dGTP và dTTP 2mM mỗi loại, dCTP 50mM và ATP 10mM.

4) Cho phản ứng 5 phút ở 15 °C, bộ phận đầu tiên của chuỗi được đánh dấu.

5) Thêm 2  $\mu$ l dCTP 2mM, lại duy trì nhiệt độ 15 °C trong 2 - 3 giờ.

6) Thêm vào 1/10 lượng hỗn hợp đã pha sẵn ở trên (mục 3)) vào ống phản ứng (mục 5)).

7) Để ở 15 °C qua đêm.

8) Pha dung dịch có thành phần gồm 2  $\mu$ l EDTA (0,5 M), dung dịch PEG-NaCl, thêm nước cho đủ 30  $\mu$ l.

**Dung dịch PEG-NaCl** chứa polyethylene glycol 6000 ở nồng độ 13% và NaCl 1,6M.

9) Quay li tâm 3300 v/ph trong 5 phút, đổ bỏ nước mặt.

10) Thêm 50  $\mu$ l PEG-NaCl và 50  $\mu$ l nước cất (pha loãng hai lần), lại quay li tâm 3.300 v/ph trong 5 phút, đổ bỏ nước mặt.

- 11) Hòa tan kết tủa trong 200  $\mu$ l NaOH 0,2N.
- 12) Để ở nhiệt độ phòng 5 phút, sau đó để trên nước đá.
- 13) Tải mẫu lên *dung dịch chênh lệch mật độ đường kiềm hóa 5% đến 20%* để quay li tâm cao tốc để phân li sản phẩm. Khi đó cần cho dung dịch chênh lệch mật độ vào ống PA chứa lại khoảng 2 - 3 mm và tải mẫu phản ứng lên đó.

**Dung dịch chênh lệch mật độ đường kiềm hóa 5% đến 20%** chứa đường saccharose ở các mức nồng độ 5%, 10, 15 và 20%, NaOH 0,2M, NaCl 1M và EDTA 2mM, làm lạnh sẵn (4 °C) trước khi sử dụng.

- 14) Quay li tâm 32.000 v/ph trong 4 giờ ở 4 °C (trong rotor PRS 50 Hitachi chẳng hạn).
- 15) Sau khi kết thúc quay li tâm, lấy ống ra nhẹ nhàng tránh xáo động dịch, dùng pipet tự động hút lượng nhỏ (khoảng 6 giọt hay 1/4 ml) vào 30 ống nhỏ để phân đoạn sản phẩm. Đo phát xạ Cerenkov.
- 16) Thu các phân đoạn (gần ở giữa) có đỉnh phát xạ nhỏ là phân đoạn của DNA hai sợi hoàn toàn đã được kéo dài (elongated) và kết nối (ligated).
- 17) Trung hòa sản phẩm bằng Tris-citric acid (pH 7,5), kết tủa bằng ethanol.
- 18) Hòa tan trong TE, tải lên cột sắc ký Sephadex G-50 để loại bỏ đường saccharose.
- 19) Tập trung phân đoạn có phóng xạ (phát xạ Cerenkov), kết tủa bằng ethanol.
- 20) Nguyên liệu này dùng để di nạp vào *E. coli* JM 103.

#### 2.1.5. Sàng lọc (screening)

Để kiểm chứng phage M 13 đã được tổ hợp DNA biến dị hay không ta phải lai plaque với M 13 mang DNA tổ hợp không biến dị và M 13 không mang DNA di nhập để làm đối chứng.

- 1) Đánh dấu đầu 5' của DNA tổng hợp bằng [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP.
- 2) Chuyển plaque lên màng (nylon, nitrocellulose)
- 3) Lai với ở 42 °C 1 đêm.
- 4) Rửa màng 2 lần trong *dung dịch SSC 2×* và  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,0) 50mM ở nhiệt độ phòng.



**Dịch SSC 5×** chứa SDS 0,1%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,0) 50mM, dịch Denhardt 1× và carrier DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (là DNA của *E. coli* đã cắt ngắn và biến tính).

- 5) Rửa trong dịch SSC 1× và  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,0) 50 mM ở 37 °C trong 10 phút, sau đó tăng dần mỗi lần 5 độ. Khi đó trên màng lai phage nguyên lai (không có DNA biến nạp) sẽ không còn đo được phóng xạ (~100 cpm), có thể dùng GM monitor để kiểm tra và coi đây là bức xạ nền (background).
- 6) Rửa cho đến khi thấy có sự khác biệt về bức xạ (Cerenkov count) của phage mang DNA di nhập không biến dị với phage mang DNA di nhập biến dị (đến khoảng 60 °C).
- 7) Lặp lại screening cho đến khi thu được dòng thuần.
- 8) Giải trình nucleotide, xác nhận đoạn biến dị di nhập trong phage.

## **2.2. Phương pháp sử dụng DNA tổng hợp như đoạn ghép (phương pháp biến dị cassette)**

Chế tác DNA tổng hợp, hợp nối để chế plasmid mang biến dị có mục đích. Có thể điều chế nhiều biến chủng đa dạng một cách rất đơn giản.

- 1) Tìm biết các vị trí cắt của enzyme hạn chế phía trên và phía dưới đoạn DNA đích muốn kiểm tra. Khoảng cách giữa hai vị trí này khoảng 20 - 100 base thì tốt. Nếu không có những vị trí như vậy thì sử dụng phương pháp sử dụng DNA tổng hợp như môi di nhập biến dị (mục 2.1.) để tạo vị trí enzyme hạn chế thích hợp. Đây là điểm thiết yếu nhất.
- 2) Bằng enzyme hạn chế loại bỏ đoạn DNA muốn di nhập biến dị, phần còn lại của DNA với plasmid được phân li và sử dụng ở các bước sau như một vector.
- 3) Cả hai sợi dương và âm đều được tổng hợp nhưng sự tổng hợp của chúng khác nhau. Làm các đầu trên và dưới bổ sung với phía vector. Khoảng 20 - 30 base thêm thì tốt.
- 4) Sau khi phosphoryl hóa đầu 5' trộn từng 0,5 pmol (20-mer thì khoảng 100 pmol tương đương 1  $\mu\text{g}$ ), kết tủa bằng ethanol.
- 5) Hòa tan trong 9  $\mu\text{l}$  nước cất, thêm 1,2  $\mu\text{l}$  *dung dịch đệm A*, ủ 1 giờ ở 37 °C.

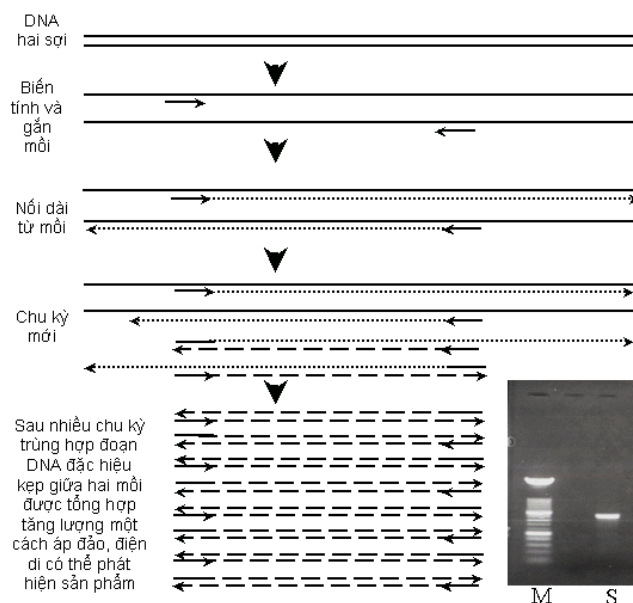
**Dung dịch đệm A** chứa Tris-HCl (pH 7,5) ở nồng độ 0,5M,  $\text{MgCl}_2$  0,1M, DTT 50mM và EDTA 1mM.

- 6) Thêm 0,02 pmol DNA vector ( $\sim 0,1 \mu\text{g}$ ), 1  $\mu\text{l}$  ATP 10mM và 1  $\mu\text{l}$  ligase, thực hiện kết nối (ligate) 1 đêm ở 15 °C.
- 7) Dùng sản phẩm di nạp vào *E. coli*.
- 8) Giải đọc trình tự nucleotide của DNA để xác định biến dị.

## XIV. PCR

### 1. PCR

PCR (polymerase chain reaction) là phương pháp có thể tăng lượng đoạn DNA đặc hiệu từ mẫu DNA vì lượng khoảng 200 - 500 nghìn lần sau 2 - 3 giờ xử lý. Do đó, đây là phương pháp làm thuận lợi những kỹ thuật DNA tái tổ hợp cũng như được vận dụng trong giải trình DNA, chẩn đoán bệnh cảm nhiễm... Phương pháp này thành công trên cơ sở phát kiến enzyme chịu nhiệt và sáng tạo máy luân nhiệt tự động hóa (programmed thermocycler). Lượng phản ứng có thể từ 5 - 100  $\mu$ l. Tùy loại máy luân nhiệt mà cần (thế hệ cũ) hoặc không cần sử dụng dầu khoáng chống bốc hơi của dịch phản ứng, các máy thế hệ mới có hệ thống cung cấp nhiệt ở nắp máy đặt trên các ống phản ứng nên không cần đến lớp dầu này. Sơ đồ nguyên lý phản ứng như sau:



**Hình 14: Sơ đồ Nguyên lý hoạt động của PCR.**

M, dầu thang phân tử lượng; S, sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose, nhuộm bằng ethidium bromide và kích thích bằng UV.

1) Tổng hợp 2 loại mẫu (primer). Kiểm tra trình tự nucleotide hai đầu đoạn DNA cần khuếch đại (tăng lượng) và trình tự tương đồng với chúng sao cho hướng của quá trình tổng hợp nối dài DNA từ một primer sẽ tổng hợp

được trình tự làm khuôn cho primer kia. Có thể tìm biết và đặt hàng oligonucleotide mỗi từ các hãng (công ty) dịch vụ công nghệ sinh học phân tử hay một số phòng thí nghiệm có máy tổng hợp DNA. Chú ý chọn trình tự dài khoảng 20 - 30 base sao cho thành phần G+C khoảng 50% và chúng không thể lai với nhau (và với đoạn nào khác của DNA).

2) Tạo 100  $\mu$ l dịch phản ứng (có thể chỉ cần 10  $\mu$ l, khi đó các thành phần giảm theo tỷ lệ tương ứng): 10  $\mu$ l dịch đệm PCR 10 $\times$ , 16  $\mu$ l dịch hỗn hợp dNTP (mỗi loại 1,25 mM), 58  $\mu$ l nước cất, 1  $\mu$ l (khoảng 2 đơn vị) *Taq* polymerase, 5  $\mu$ l (20  $\mu$ M) primer #1, 5  $\mu$ l (20  $\mu$ M) primer #2 và 5  $\mu$ l DNA khuôn (200  $\mu$ g/ml) (khoảng 1  $\mu$ g).

*Chú ý* bốn thành phần đầu là những yếu tố áp dụng cho mọi phản ứng PCR, còn ba yếu tố sau quyết định tính đặc hiệu của phản ứng nên khi cần phải thực hiện đồng thời PCR với nhiều loại DNA thì có thể pha chung bốn yếu tố đầu sau đó chia sang ống khác (thường ống chất dẻo 0,5 ml) cho các phản ứng với DNA khuôn và cặp mồi khác nhau. Làm như vậy sẽ nhanh hơn mà tránh được giao nhiễm giữa các mẫu DNA cũng như giữa các mồi.

3) Cho ống vào máy li tâm, quay một thời gian ngắn (spin-down) cho các thành phần còn dính thành ống tập trung lại trong phản ứng.

4) Đặt các ống phản ứng vào máy luân nhiệt (thermocycler), đặt chương trình chạy cho các chế độ nhiệt thích hợp để tổng hợp DNA. Ban đầu nhiệt độ 93 - 96 °C để cho DNA khuôn hai sợi biến tính thành dạng một sợi. Sau đó các chu kỳ nhiệt là 94 °C 0,5 - 1 phút (biến tính - denaturation), 55 °C 0,5 - 1 phút (gắn mồi - primer annealing) và 75 °C trong 0,5 - 1 phút ((tổng hợp) nối dài - (polymerization) elongation). Số chu kỳ luân nhiệt khoảng 25 - 40 là quy trình được áp dụng trong nhiều trường hợp. Trên thực tế do số lượng và chủng loại primer rất đa dạng và khác nhau, chu trình nêu trên chỉ là một trong số chu trình đã được nhiều người vận dụng. Trong số các mức nhiệt thì bước annealing thường phụ thuộc nhiều vào độ dài và thành phần của primer. Vì vậy bước thiết kế primer được quan tâm và đã được lập trình hóa. Khi đó các chế độ cho việc tổng hợp một đoạn DNA được thiết kế tự động tránh self-annealing, gắn kết phải bảo đảm tính đặc hiệu cao...

5) Để kiểm tra DNA được tổng hợp hay chưa người ta lấy từ ống phản ứng khoảng 0,5  $\mu$ l sản phẩm và điện di trong gel agarose có pha sẵn ethidium bromide (50  $\mu$ l/ml) hoặc ngâm gel trong dung dịch ethidium bromide sau khi điện di và kiểm tra bằng DNA đặc hiệu dưới UV. Thông thường để xác

định phân tử lượng của sản phẩm người ta điện di DNA MW marker trong một hoặc hai lần bên cạnh các sản phẩm PCR.

*Chú ý:* Thông thường các đoạn DNA được tổng hợp nên trong giới hạn 2 kb, tốt hơn là khoảng 1 kb. Tuy nhiên, một số biến thể PCR với một số loại DNA polymerase cải tiến cho phép tổng hợp đoạn DNA đến 3 - 4 kb. Hơn nữa, cần tránh tổng hợp đoạn DNA có thành phần C+G quá cao cũng như có nhiều đoạn trật tự lặp. Ngược lại, khả năng đoạn DNA tổng hợp được ngắn đến mức nào tuy còn chưa có thông tin nhưng có thông báo rằng PCR có thể tổng hợp được đoạn DNA ngắn chỉ 60 kb.

Đặc biệt phải chú ý tránh giao nhiễm, bởi vì PCR có thể tổng hợp khuếch đại được 500 nghìn lần lượng ban đầu nên trường hợp dương tính giả rất có thể xảy ra nếu thiếu thận trọng.

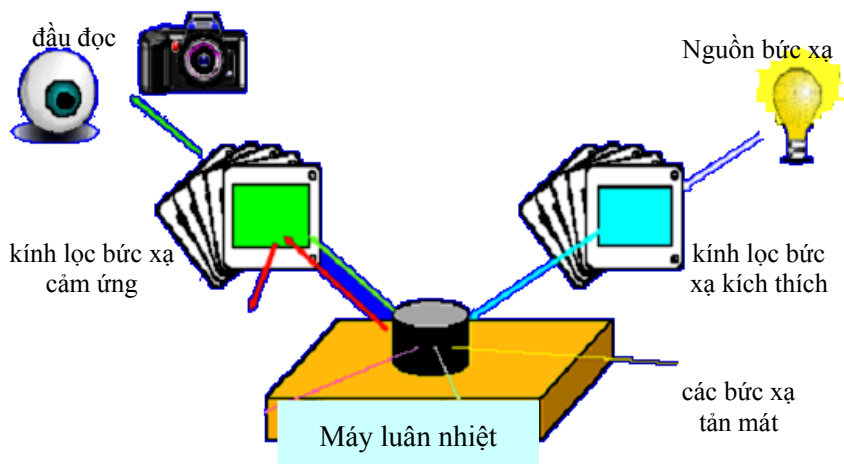
## **2. Một số kỹ thuật mở rộng áp dụng PCR**

Kỹ thuật PCR ngày càng được sử dụng rộng rãi do nguyên lý đơn giản, thao tác tự động hóa, cho kết quả có tính đặc hiệu và độ nhạy cao.

Về mặt kỹ thuật, PCR còn được phát triển thành dạng *mới* là real-time PCR, bên cạnh nhiều ứng dụng mở rộng của PCR truyền thống được sáng tạo và phát huy tác dụng.

**PCR thực thời** (real-time PCR) được phát triển trên cơ sở phản ứng PCR thông thường với cặp mồi đặc hiệu và một mẫu dò chỉ hấp thụ và phát xạ (bức xạ bước sóng đặc hiệu) khi gắn với ADN đoạn giữa hai mồi tổ hợp với thiết bị trắc định cường độ phát xạ của mẫu dò. Thiết bị nhân DNA được chế tạo đặc biệt để các phản ứng vừa có thể diễn ra nhưng đồng thời chất phát quang gắn trên mồi cũng phát quang sau khi gắn vào DNA được tổng hợp dưới tác động của bức xạ kích thích. Mồi cũng được thiết kế đặc biệt, gắn kết với hợp chất phát xạ huỳnh quang khi có bức xạ kích thích thích hợp nhưng do hợp chất khác (quencher) cũng được gắn trên mồi làm tắt bức xạ nên chỉ khi mồi tham gia phản ứng tổng hợp DNA mà tách khỏi ảnh hưởng của quencher thì bức xạ huỳnh quang đánh dấu mới xuất hiện. Bức xạ do mồi gắn trong chuỗi DNA phát ra được máy thu ghi lại truyền sang vi tính nên có thể phát hiện được sản phẩm DNA được hình thành trong suốt quá trình phản ứng. Nhờ vậy, PCR thực thời còn được vận dụng để định lượng DNA khuôn đưa vào phản ứng dựa vào nguyên tắc *lượng DNA khuôn càng cao thì thời gian phản ứng càng ngắn để cùng có lượng DNA tối đa từ thành phần tham gia phản ứng không đổi*. Kỹ thuật cụ thể liên quan real-time PCR không trình bày trong chương trình này. Các hướng dẫn thao tác (protocol) liên quan đến chuẩn bị hỗn

hợp phản ứng và thiết định chế độ luân nhiệt và đọc kết quả lưu trữ lại (protocol file và master file) được cung cấp kèm theo real-time PCR thermocycler và mỗi cần được đọc kỹ trước khi thực hiện.



**Hình 15: Sơ đồ nguyên lý hoạt động của Real-time PCR**

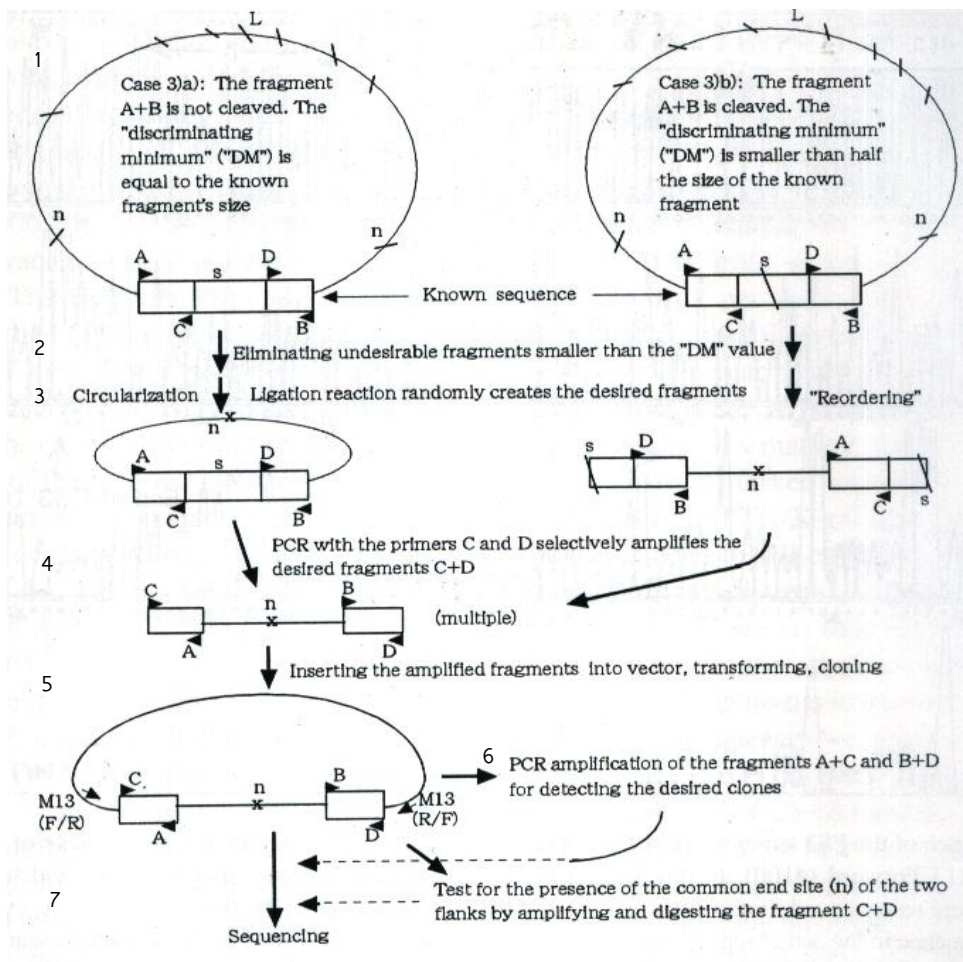
***In situ* PCR**, hay PCR tại chỗ, là thiết bị luân nhiệt được thiết kế để tổng hợp DNA trực tiếp từ tổ chức bệnh phẩm (lát cắt tổ chức...) đã được cố định trên phiến kính. Vì vậy, nếu có mặt trong tiêu bản DNA đặc hiệu sẽ được khuếch đại và sản phẩm, sau khi được nhuộm bằng phương pháp thích hợp, có thể được quan sát dưới kính hiển vi. Vì vậy vị trí phân bố của mầm bệnh trong tổ chức bệnh phẩm có thể được xác định.

**Hot start PCR** là kỹ thuật PCR thông thường được khởi động nóng là biện pháp làm tăng tính đặc hiệu của sự bắt cặp môi.

**Inverse PCR** là một biến tướng của PCR thông thường với những thủ thuật cắt nối hoặc môi ngẫu nhiên, hoặc môi chế theo trình tự nucleotide của gen nhảy để sao chép đoạn DNA nằm ngoài đoạn DNA có trình tự đã biết.

Có thể nói đây không chỉ là một kỹ thuật mà là một chiến lược tổng quát bao gồm việc vận dụng nhiều kỹ thuật cơ bản trong sinh học phân tử nhằm phân lập ra được đoạn DNA nằm kề đoạn DNA có trình tự đã biết dưới dạng đoạn được dòng hóa trong *E. coli* nhờ plasmid hoặc phage.

Hình 16 dưới đây trình bày khái quát các bước của một số kỹ thuật inverse PCR: 1) "tạo vòng" (circulation) và 2) "sắp xếp lại" (reordering).



**Hình 16: Sơ đồ hai chiến lược sử dụng inverse PCR để giải trình đoạn DNA chưa biết kề bên đoạn đã biết (Theo Phạm HS và CS, 1999).**

1) Cắt DNA nhiễm sắc thể bằng một enzyme hạn chế (RE): Hai chiến lược cắt khác nhau, bên phải cắt đoạn DNA đã biết, bên trái không cắt DNA đã biết (phù hợp chỉ khi đoạn DNA đã biết tương đối ngắn); 2) Kết nối bằng ligase: bên phải sắp xếp lại, bên trái tạo vòng; 3) Bằng PCR tổng hợp đoạn DNA chưa biết bằng một "hướng ra ngoài" từ vùng DNA đã biết; 4) Đưa ngẫu nhiên sản phẩm PCR vào vector plasmid pGEMT (đầu bằng); 5) Clone hóa trong *E. coli*; 6) Kiểm tra các clone (khuẩn lạc trắng) có đoạn DNA đích bằng hai cặp môi lộ xuất hai "trình tự ngữ cảnh (contextual sequences)" đặc hiệu; và kiểm tra điểm nối 7) Giải trình đoạn DNA chưa biết kề bên đoạn DNA đã biết.

cần bị cắt đứt một (hoặc một vài chỗ) sao cho sản phẩm cắt đủ dài để có thể thu hồi lại từ agarose gel sau khi điện di sản phẩm cắt.

Trong bước tiếp theo các sản phẩm cắt bằng RE được kết nối bằng enzyme phage T4 ligase (ở 16 °C) rồi tái tổ hợp vào vector plasmid và biến nạp vào *E. coli*. Chọn những dòng (clone) biến nạp (khuẩn lạc trắng) và tìm clone chứa DNA mong muốn. Với bước này ta hoặc cần lai với hai mẫu dò đặc hiệu hai đầu mút đoạn DNA đã biết, hoặc bằng PCR với cặp môi đặc hiệu (hướng ra ngoài đã trở thành hướng vào trong) đã được thiết kế trước dựa trên trình tự đã biết để xác nhận có sản phẩm đích. Sau khi đã chọn được clone mong muốn ta có thể thực hiện kỹ thuật sequencing thông thường xác định trình tự nucleotide đoạn DNA đã dòng hóa.

Ngoài hai kỹ thuật trên đây ta còn có thể sử dụng một số chiến lược khác như thực hiện PCR với một môi đặc hiệu được thiết kế trên cơ sở trình tự DNA đã biết và một primer ngẫu nhiên, hoặc là trình tự đặc hiệu transposon (gen nhảy) hoặc là một hexamer... Cuối cùng, tương tự các chiến lược trên, biện pháp tiếp theo là dòng hóa vào tế bào khả nạp và thực hiện sequencing.



## **XV. Phương pháp "vân tay DNA" (DNA finger print)**

Các kỹ thuật sinh vật học phân tử cũng ảnh hưởng nhiều đến lĩnh vực y học, chúng được trông đợi ứng dụng vào việc chẩn đoán bệnh được coi là bệnh di truyền. Phương pháp "vân tay DNA" (DNA finger print) là một trong những biến thể của Southern hybridization. Đúng hơn, DNA finger print chính là phương pháp Southern sử dụng minisatellite. Phương pháp này ban đầu sử dụng các mẫu dò đánh dấu phóng xạ để xác định sản phẩm (mục 1.) nhưng với sự phát triển các loại mẫu dò không sử dụng đồng vị phóng xạ (thường gọi là "mẫu dò lạnh" - "cold probe") (mục 2.). Cũng có thể thực hiện với mẫu dò lạnh gắn DIG như trình bày ở mục 4. chương 2.

### ***1. Phương pháp DNA finger print***

Yếu tố quy định đặc tính của sinh vật là vật chất di truyền (hay các gen), chúng kết hợp với nhau thành một hợp thể DNA nhiễm sắc thể gọi là genome (hay bộ gen). Genome quy định enzyme và cấu tạo các chất protein cấu thành nên cơ thể, có thành phần genome được gọi là DNA gen và cũng có DNA không phải gen. Sự biến dị DNA gen ảnh hưởng đến sự tồn tại của cá thể trong môi trường nhất định nên khi có biến dị ảnh hưởng mạnh thì cá thể không thể tồn tại do chức năng enzyme và chức năng cấu trúc bị biến đổi. Chính những DNA (miền DNA) không phải gen này nếu có sự biến dị thì cũng không ảnh hưởng đến sự sống còn của cá thể, nên nó có thể là mẫu dò (probe) của các cá thể. Sự khác biệt có tính cá thể quan sát được trong trình tự (base của) DNA được gọi là tính đa hình (đa hình di truyền) (polymorphism), và các minisatellite trong DNA biểu hiện tính đa hình.

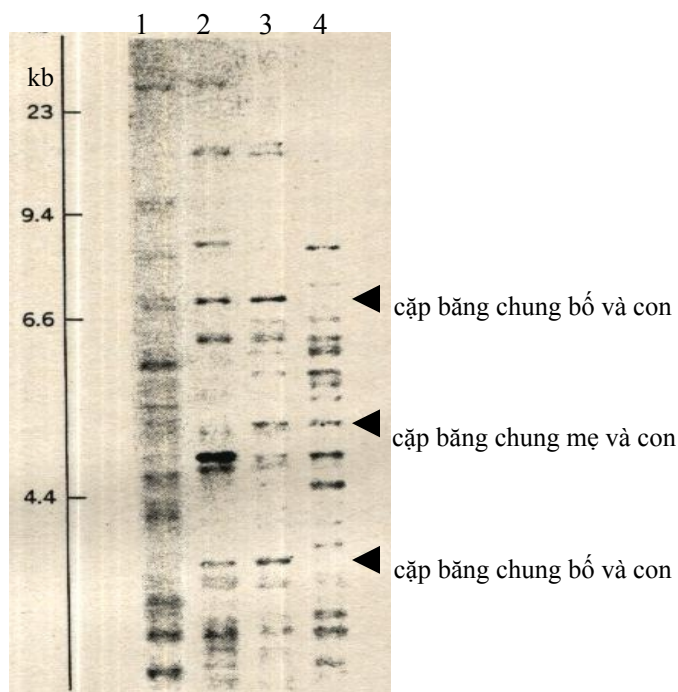
Các minisatellite mang ba đặc điểm. *Thứ nhất*, mang tính đa hình cao, nghĩa là trong một miền gen có nhiều gen đối lập tồn tại (2 đến hàng chục loại), và sự khác biệt của chúng được phát hiện bằng phương pháp lai thẫm Southern gọi là tính đa hình độ dài đoạn hạn chế (RFLP - restriction fragment length polymorphism). *Thứ hai*, nếu thực hiện Southern blot hybridization một loại minisatellite tồn tại phân tán trong nhiễm sắc thể thì đồng thời có thể kiểm tra được 20 - 50 miền nhiễm sắc thể. *Thứ ba*, những miền gen này di truyền theo Mendel.

1) Để phân li tốt đoạn DNA cần sử dụng DNA đã được tinh chế. Sau khi tinh chế kỹ (tỷ lệ thu hồi DNA thường thấp) cần xử lý protease K. Sau khi cắt DNA bằng enzyme hạn chế cũng phải xử lý phenol.

- 2) Điện di sản phẩm. *Chú ý* tránh DNA bị nóng bởi dòng điện. Cho nên, một mặt cần phải cho dung dịch đệm tuần hoàn qua cathode và anode (cho ống dẫn đi qua buồng lạnh của thiết bị làm lạnh thì tốt), đồng thời điện áp phải thấp (khoảng 3 V/cm đối với gel 15 cm chiều ngang). Vì vậy có thể phải thực hiện điện di một ngày đêm.
- 3) Khi đặt lược tạo lỗ tải mẫu cần chọn loại lược mỏng (mỏng hơn 1 mm thì tốt) để các băng sản phẩm được tập trung.
- 4) Lượng DNA khoảng 3  $\mu$ g, dung tích 5  $\mu$ l.
- 5) Thông thường sử dụng bản gel 30 cm, nồng độ agarose khoảng 1,2 - 2%. Khi BPB tiến đến gần mép cuối của bản gel thì ngừng điện di.
- 6) Nhiệt độ lai phụ thuộc vào loại mẫu dò, nhưng nhiệt độ lai cũng như nhiệt độ rửa là rất quan trọng. Thông thường với mẫu dò *myo* thì nhiệt độ lai là 55 °C, còn rửa thì tiến hành ở nhiệt độ thông thường. Còn các mẫu dò tự chế tác thì có thể tính toán trên cơ sở độ dài và thành phần nucleotide của mẫu dò cụ thể.
- 7) Đánh dấu mẫu dò bằng phương pháp multiprimer là tốt.
- 8) Nên chọn những enzyme nhận biết bốn base như *Hae* III, *Hinf* I... và nhiều khi nên phối hợp hai enzyme để có kết quả phân li tốt. Lựa những phối hợp phân li tốt để sử dụng.

## **2. Phương pháp mẩu dò lạnh (cold probe)**

Trước đây các phương pháp lai đều sử dụng mẩu dò đánh dấu phóng xạ. Về sau thay vì chế tác và sử dụng những mẩu dò phóng xạ người ta kết hợp kháng thể với enzyme và lợi dụng hoạt tính của enzyme để phát màu cơ chất giúp phát hiện bằng đặc hiệu, được gọi là phương pháp mẩu dò lạnh. Nhìn chung phương pháp sử dụng mẩu dò lạnh có độ phức tạp và mất thời gian tương tự phương pháp sử dụng mẩu dò phóng xạ. Trong trường hợp này tính bổ sung giữa mẩu dò với DNA tế bào trở nên giảm nên các bước rửa cần phải nhẹ nhàng. Nếu sử dụng các mẩu dò phóng xạ thì việc kiểm tra chất lượng nền trong quá trình rửa thực hiện được nhờ máy đo phóng xạ rất dễ dàng, và nếu rửa chưa đủ nên nền còn độ phóng xạ cao thì tiếp tục rửa cho đến khi nền giảm xạ. Phương pháp mẩu dò lạnh không có ưu điểm này, phải thực hiện chọn đến khi phát màu. Ví dụ dưới đây mô tả phương pháp mẩu dò lạnh với probe của hãng Amersham Life Science gọi là phương pháp ECL.



**Hình 17: Kết quả xét nghiệm DNA finger print xác nhận huyết thống (tìm bố sinh học cho con)**

Làn 1: DNA bố hộ tịch, làn 2: DNA bố sinh học, làn 3: DNA của con và 4: DNA của mẹ. Con và mẹ cũng như con và bố sinh học có các băng giống nhau.

Trong trường hợp này probe được kết hợp trực tiếp với enzyme và kiểm xuất trên film sự phát huỳnh quang của tổ hợp do phản ứng hóa học phát ra. Thời gian lộ quang khoảng 1 giờ (trong lúc này một tấm Hyperfilm được đặt ép lên màng Saran wrap phủ trên màng đang phản ứng, sau đó rửa film và đọc kết quả. Phương pháp này đơn giản, thực hiện và đọc thuyết minh một cách dễ dàng. Người ta cũng đã sử dụng vào việc giám biệt quan hệ huyết thống (tìm bố thực hay bố sinh học cho con...). Từ các làn DNA của hai người bố cũng như của người mẹ có khoảng 10 băng nhìn thấy rõ và 5 - 6 băng mờ hơn. Trong các băng đó có khá nhiều băng có sự khác biệt về độ lớn, nhờ vậy hình thành dấu "vân tay" DNA rất riêng biệt của cá thể. Có thể nhìn thấy đồng thời tính đa hình các đoạn hạn chế của nhiều đoạn DNA.

Tuy nhiên, nếu quan sát kỹ các băng trong dấu "vân tay" DNA thì nhất định thấy một số băng của làn DNA của người con có độ dài tương tự

với một số băng nhìn thấy được trong làn DNA của bố thực sự (bố sinh học) và một số khác thấy trong làn DNA của mẹ thực sự. Còn trong làn DNA của bố hộ tịch hoàn toàn không có những băng có độ dài tương tự các băng của làn DNA của con (cũng như của mẹ).

Phương pháp này áp dụng trong việc đồng định cá thể (xác định tội phạm...), giám biệt cha mẹ - con cái cũng như kiểm tra xác nhận sự kết hôn, khu trú của tế bào của người cho trong cơ thể của người nhận.

#### **\*Các bước kỹ thuật:**

- 1) Các mẫu DNA (của con, bố hộ tịch và bố sinh học cũng như của mẹ) phải được xử lý như nhau. Chiết xuất và tinh chế DNA, đo hàm lượng (khoảng 3 µg DNA trong 5 µl cho mỗi loại phản ứng cắt bằng enzyme hạn chế là vừa).
- 2) Ủ DNA tế bào với loại enzyme hạn chế đã chọn. Nên dùng các enzyme nhận biết và cắt 4 base. Nếu cần, sử dụng đồng thời hai enzyme cho một ống phản ứng.
- 3) Xử lý bằng phenol: cho thêm phenol vào ống rồi trộn đều để khoảng 5 phút ở nhiệt độ phòng hoặc trên băng (nước đá), quay li tâm 3 phút ở 2.000 - 3.000 v/ph để lớp phenol (cùng với tủa protein) tách khỏi lớp nước chứa DNA hòa tan. Hút lấy lớp nước này, trộn dịch màu.
- 4) Chuẩn bị gel agarose trong TBE như trình bày trước đây. Nồng độ agarose khá cao (1,2 - 2%) để tăng độ phân giải.
- 5) Điện di với dung dịch đệm TBE, không cần nhuộm ethidium bromide.
- 6) Làm biến tính (phương pháp kiểm, sau đó trung hòa).
- 7) Chuyển qua màng (nylon, nitrocellulose). Có thể tăng sự cố định DNA trên màng bằng cách để khoảng 4 - 5 cm dưới một đèn tử ngoại và chiếu tử ngoại 3 phút. Làm khô (với phương pháp làm khô nhanh thì tốt).
- 8) Lai tiền khởi (khoảng 1 - 3 giờ ở khoảng 35 °C, nhiệt độ cao hay thấp được tính tùy theo độ dài mẫu dò và tỷ lệ G+C trong đó).
- 9) Lai với mẫu dò minisatellite đánh dấu enzyme (khoảng 10 giờ hay qua đêm ở khoảng 35 °C).
- 10) Rửa màng bằng TBE, thay dịch rửa một số lần.
- 11) Không làm khô màng, cho màng vào túi polyethylene rồi thêm vào đó dịch cơ chất màu (ECL, cũng có thể CDP-Star, hãng Amersham) tương ứng với enzyme. Hàn kín các cạnh của túi bằng máy ép gia nhiệt.

12) Đưa vào buồng tối để hiện hình, ép một tấm Hyperfilm lên màng. Để tự ký qua đêm ở  $-20$  hay  $-70$  °C. Rửa hiện ảnh trên film. hong khô film. Đọc và phân tích kết quả.

*Chú ý:* Thuộc nhóm mẫu dò quang hóa học (Chemilluminescent probe) này còn có LumiGLO của hãng Cruachem Inc., CSPD của hãng ICN Pharmaceuticals...

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thành Hồ 2000. *Di truyền học*. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
2. Applied Biosystems, Inco. 1991. High-quality template DNA for Taq Cycle Sequencing Using Dyedeoxy<sup>TM</sup> Terminator: An improved preparation procedure. *DNA sequencing Model 373A User Bulletin* 18.1-4.
3. Birnboim H. C. & Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.* 7: 1513-1523.
4. Cann A. J. 2001. *Principles of molecular virology, 3rd ed.* Academic Press, London.
5. Matsumoto S. 1990. *Rabomanuaru idenshi kougaku (Cẩm nang di truyền tử công học)*. Maruzen Kabushiki Kaisha, Tokyo.
6. Pham H.-S., Kiuchi A. & Tabuchi K. 1999. Methods for rapid cloning and detection for sequencing of cloned inverse PCR-generated DNA fragments adjacent to known sequences in bacterial chromosome. *Microbiol. Immunol.* 43: 928-836.
7. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C. & White T. J. 1993. *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. American Association for Microbiology, Washington, DC.
8. Sambrook J., Russell D. T., & Russell D. W. 2000. *Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
9. Sanger F., Nicklen S. & Coulsen A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71: 1342-1346.
10. Surzycki S. 2000. *Basic techniques in molecular biology*. Springer, Berlin.
11. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. & Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.

# MỤC LỤC

<b>Lời mở đầu</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1. Những thao tác cơ bản</b>	<b>3</b>
<b>I. Dụng cụ và hóa chất</b>	<b>3</b>
1. Dụng cụ	3
2. Hóa chất	4
2.1. Những điều chú ý chung	4
2.2. Dung dịch gốc	5
<b>II. Điện di</b>	<b>8</b>
1. Điện di agarose	8
2. Điện di polyacrylamide	11
3. Thu hồi đoạn DNA từ gel điện di	15
<b>III. Chiết suất bằng phenol</b>	<b>19</b>
1. Chế phenol	19
2. Chiết xuất phenol và chlorform	20
<b>IV. Cô đặc và thẩm tích</b>	<b>21</b>
1. Cô đặc	21
2. Thẩm tích	22
<b>V. Phương pháp định lượng acid nucleic (DNA và RNA)</b>	<b>24</b>
1. Phương pháp quang học	24
2. Phương pháp định lượng bằng điện di	24
3. Phương pháp nhỏ giọt định lượng acid nucleic	25
<b>Chương 2. Kỹ thuật cơ bản trong tái tổ hợp DNA</b>	<b>26</b>
<b>I. Điều chế DNA plasmid</b>	<b>26</b>
1. Điều chế lượng nhỏ DNA plasmid	26
1.1. Phương pháp Birnboim	26
1.2. Phương pháp đun sôi	28
2. Điều chế lượng lớn DNA plasmid	28
2.1. Nuôi cấy vi khuẩn	28
2.2. Chiết xuất DNA	29
2.3. Điều chế plasmid bằng li tâm phân đoạn trong mật độ cesium chloride (CsCl)	29
<b>II. Điều chế DNA phage <math>\lambda</math></b>	<b>32</b>
1. Phương pháp xác định hiệu giá phage	32
2. Điều chế lượng nhỏ DNA phage	32



2.1. Phương pháp điều chế dịch phage dung khuẩn	33
2.2. Điều chế lượng nhỏ DNA phage	33
3. Điều chế lượng lớn DNA phage	34
3.1. Phương pháp chế dịch phage dung khuẩn	34
3.2. Điều chế DNA	35
<b>III. Điều chế DNA tế bào động vật</b>	<b>37</b>
<b>IV. Phương pháp đánh dấu DNA</b>	<b>39</b>
1. Phương pháp dịch khác (nick-translation method)	40
2. Phương pháp môi đúp (multiprime method)	40
3. Đánh dấu đầu mút	41
3.1. Đánh dấu đầu 5'	41
3.2. Đánh dấu đầu 3'	41
4. Lọc gel	41
4.1. Sephadex	41
4.2. Phương pháp spin column (cột li tâm) (bằng Bio-Gel P-60)	42
5. Phương pháp đánh dấu mẫu dò bằng digoxigenin	43
5.1. Đánh dấu bằng digoxigenin nhờ phương pháp nhiều môi	43
5.2. Đánh dấu bằng digoxigenin nhờ PCR	44
<b>V. Điều chế RNA</b>	<b>46</b>
1. Phương pháp guanidine thiocyanate	46
2. Phương pháp phenol nóng	47
<b>VI. Chế thư viện DNA bổ sung (cDNA library)</b>	<b>49</b>
1. Điều chế RNA-polyA nhờ cột cellulose gắn d(T)	49
2. Phân đoạn nhờ li tâm chênh lệch nồng độ saccharose	51
3. Tổng hợp cDNA	52
4. Sàng lọc (screening) thư viện cDNA trong $\lambda$ gt 10 nhờ mẫu dò DNA tổng hợp	57
5. Sàng lọc (screening) thư viện cDNA trong $\lambda$ gt 10 nhờ mẫu dò (probe) DNA đã dòng hóa	62
6. Sàng lọc thư viện cDNA trong $\lambda$ gt 11 nhờ mẫu dò kháng thể	63
<b>VII. Tạo dòng thuần DNA bộ gen (DNA genome cloning)</b>	<b>66</b>
1. Vector phage	67
2. Vector plasmid và cosmid	71
<b>VIII. Tạo tế bào khả biến hay chịu di nạp (competent cell)</b>	<b>75</b>
1. Phương pháp $\text{CaCl}_2$	75
2. Phương pháp Hanahan	76
3. Sử dụng tế bào khả biến	77
<b>IX. Subcloning (tái tạo dòng thuần)</b>	<b>78</b>
1. Điều chế vector plasmid	78
2. Điều chế DNA cần gắn	78

<b>X. Phân tích điều tiết phiên mã nhờ thử nghiệm CAT (CAT assay)</b>	<b>81</b>
1. Thử nghiệm chính: di nạp gen vào tế bào eukaryota	81
2. CAT assay	82
<b>Chương 3. Kỹ thuật phân tích xác nhận phân tử</b>	<b>84</b>
<b>I. Kỹ thuật lai Southern (Southern hybridization)</b>	<b>84</b>
1. Chuyển Southern (Southern transfer)	84
2. Lai (hybridization)	86
3. Lai gel khô	87
<b>II. Lai Northern (Northern hybridization) và lai chấm điểm (dot blot hybridization)</b>	<b>90</b>
1. Northern hybridization (biến tính RNA bằng formaldehyde)	90
2. Dot blot hybridization (sử dụng hydroxymethyl thủy ngân)	91
<b>III. Phương pháp xác định trình tự nucleotide của DNA</b>	<b>93</b>
1. Phương pháp dideoxy	94
1.1. Điều chế DNA khuôn	95
1.2. Điều chế dung dịch nucleotide cho phản ứng dideoxy	97
1.3. Gắn kết DNA khuôn với môi	98
1.4. Phản ứng dideoxy	99
1.5. Sequencing gel (gel giải trình)	101
1.6. Sequencing DNA với máy luân nhiệt và DNA-Sequencer tự động	103
2. Phương pháp Maxam-Gilbert	106
2.1. Đánh dấu hóa học	107
2.2. Phân giải bằng piperidine và điện di trong gel	108
3. Phương pháp xác định trình tự nucleotide nằm kề đoạn DNA đã biết	109
<b>IV. Phương pháp mapping và nối dài môi (primer)</b>	<b>110</b>
1. S1 mapping	110
2. Phương pháp nối dài môi	111
2.1. Phương pháp sử dụng DNA hai sợi	111
2.2. Phương pháp sử dụng primer tổng hợp	112
3. Mapping bằng riboprobe (riboprobe mapping)	113
<b>V. Hệ phiên mã <i>in vitro</i></b>	<b>115</b>
1. Phương pháp điều chế dịch chiết thô tế bào HeLa	115
1.1. Dịch chiết xuất toàn tế bào	115
1.2. Dịch chiết xuất S-100	116
1.3. Dịch chiết xuất nhân	117
2. Phiên mã <i>in vitro</i> (run-off assay)	118
2.1. Sử dụng promoter của rDNA của người với pol I	118

2.2. Sử dụng hệ pol II với promoter major late Ad 2	119
2.3. Điện di trong gel agarose	119
<b>VI. Thử nghiệm run-on nhân</b>	<b>121</b>
1. Phân li nhân	121
2. Thâm đốm lên màng	121
3. Điều chế RNA tổ chức	122
4. Hybridization	123
<b>VII. Phân tích xê dịch gel (gel shift analysis)</b>	<b>125</b>
<b>VIII. Thí nghiệm cản trở kết hợp methyl hóa dimethyl sulfate (DMS)</b>	<b>127</b>
<b>IX. Phương pháp "vết chân" (foot print) nhờ DNase I</b>	<b>128</b>
<b>X. Phân tích protein</b>	<b>130</b>
1. Định lượng protein (phương pháp Bradford)	130
1.1. Điều chế các hóa chất	130
1.2. Định lượng	130
2. Điện di SDS-polyacrylamide	130
2.1. Chế tác gel SDS-polyacrylamide	131
2.2. Điều chế mẫu, điện di và nhuộm	131
3. Phương pháp thâm Western	133
3.1. Blotting	133
3.2. Nhuộm bằng kháng thể	134
<b>XI. Tinh chế protein kết hợp DNA nhờ sử dụng trình tự DNA đặc hiệu</b>	<b>136</b>
1. Điều chế DNA	136
2. Kết hợp DNA với sepharose đã được hoạt hóa bởi CNBr	137
<b>3. Tinh chế protein bằng cột Sepharose đã kết hợp DNA có trình tự base đặc hiệu</b>	<b>138</b>
<b>XII. South-Western hybridization</b>	<b>139</b>
<b>1. Điều chế dịch chiết xuất tế bào</b>	<b>139</b>
2. Phương pháp South-Western blot (thâm South-Western)	140
<b>XIII. Phương pháp tạo thể đột biến nhân tạo</b>	<b>141</b>
1. Chế tác thể đột biến khuyết tồn	141
1.1. Tiêu hóa từng phần bằng <i>Bal</i> 31	142
1.2. Tạo dòng phụ (subcloning) đoạn khuyết tồn	143
2. Chế tác thể đột biến vị trí chỉ định	144
2.1. Phương pháp sử dụng DNA tổng hợp làm mẫu	144
2.2. Phương pháp sử dụng DNA tổng hợp như đoạn ghép (phương pháp biến dị cassette)	149
<b>XIV. PCR</b>	<b>151</b>
1. PCR	151

	170
2. Một số kỹ thuật mở rộng áp dụng PCR	153
<b>XV. Phương pháp "vân tay" DNA (DNA finger print)</b>	<b>157</b>
1. Phương pháp DNA finger print	157
2. Phương pháp mẫu dò lạnh (cold probe)	158
<b>Tài liệu tham khảo</b>	<b>162</b>
<b>Mục lục</b>	<b>163</b>