

---

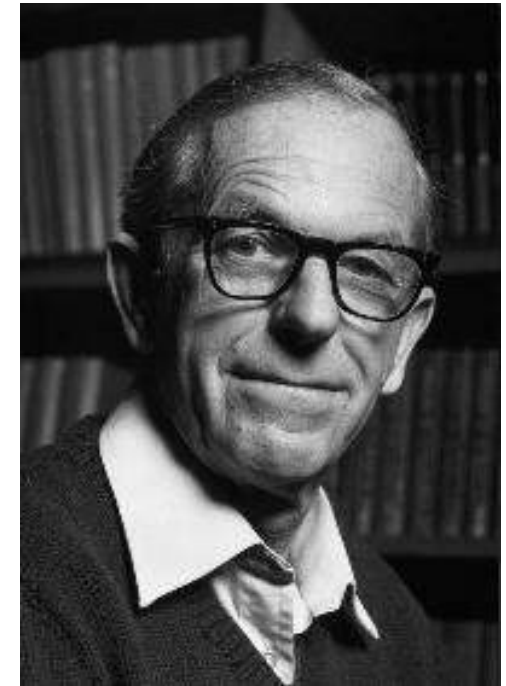
## **D. GIẢI TRÌNH TỰ DNA**

- 
- Hai phương pháp giải trình tự cổ điển:
    1. **Phương pháp enzyme** hay phương pháp dideoxynucleotide (Sanger - 1977)
    2. **Phương pháp hóa học** (Maxam & Gilbert - 1977)
  - Hiện nay: Giải trình tự tự động, dựa theo phương pháp của Sanger.

# Giải trình tự theo phương pháp Sanger

---

- Đặc điểm:
  - Dùng 1 mỗi duy nhất;
  - Đánh dấu phóng xạ  $^{32}\text{P}$  trên mỗi (hoặc trên dNTP);
  - Dùng đoạn Klenow;
  - Dùng các ddNTP (dideoxynucleoside triphosphate). Khi các ddNTP bị gắn vào đầu 3' của chuỗi polynucleotide  $\rightarrow$  sự tổng hợp kết thúc;
  - Đoạn DNA cần xác trình tự định phải được tạo dòng trong một vector mạch đơn (phage M13).
  - Trình tự kết quả được giải nhờ điện di trên gel polyacrylamide.



**Frederick Sanger**  
**(1918 - 2013)**

# Giải trình tự theo phương pháp Sanger

**ddNTPs terminate DNA synthesis.**

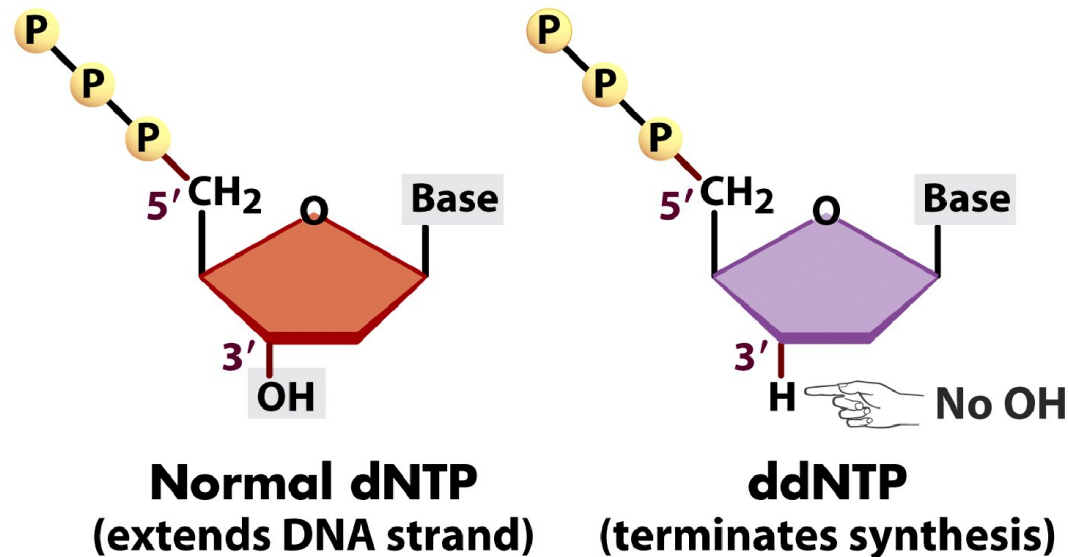


Figure 19-6a Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

**dideoxynucleoside triphosphate (ddNTP)**

- **dNTP** : cho phép mạch mới được tổng hợp liên tục
- **ddNTP** : ngưng tổng hợp mạch mới

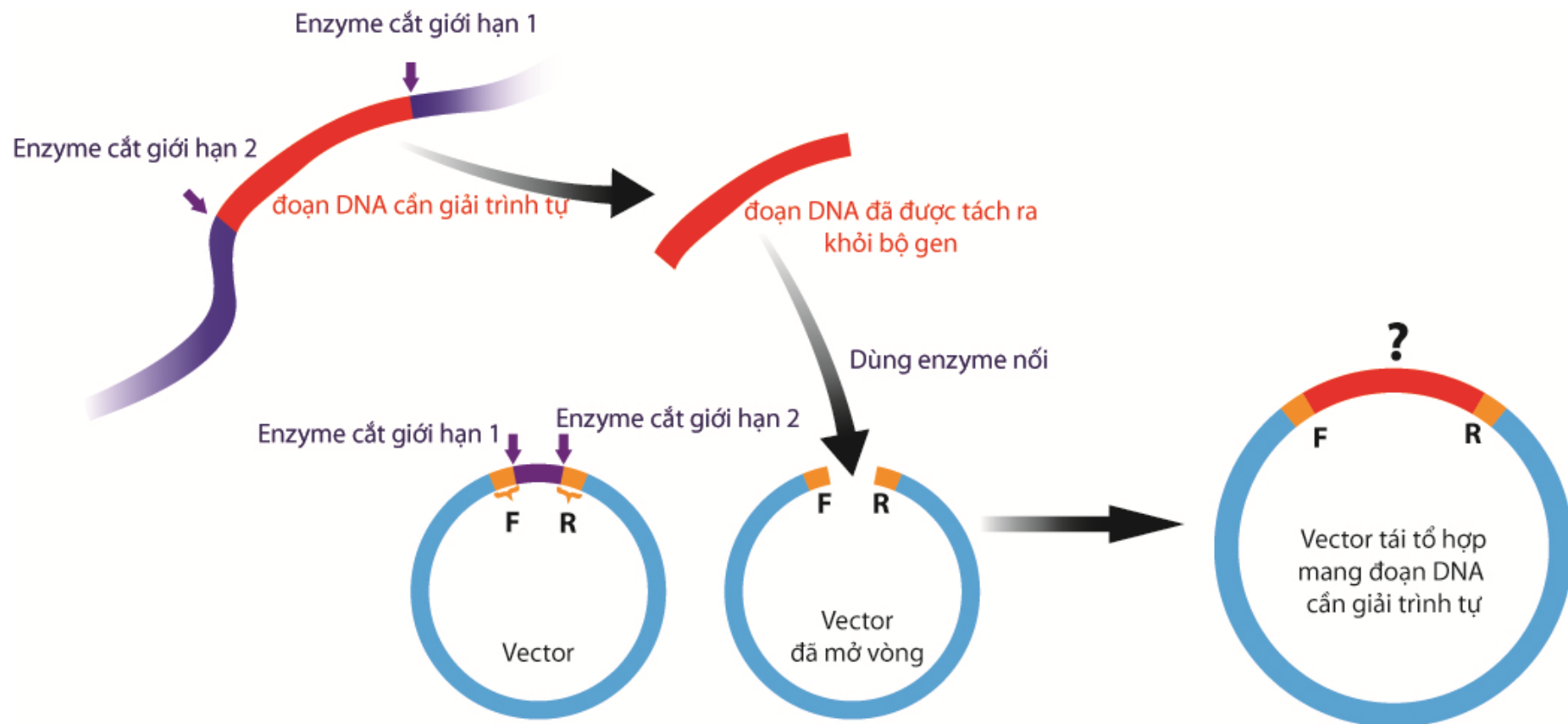


5' GTAC **GATCGGAC** CGAA 3'  
3' CATG **CTAGCCTG** GCTT 5'

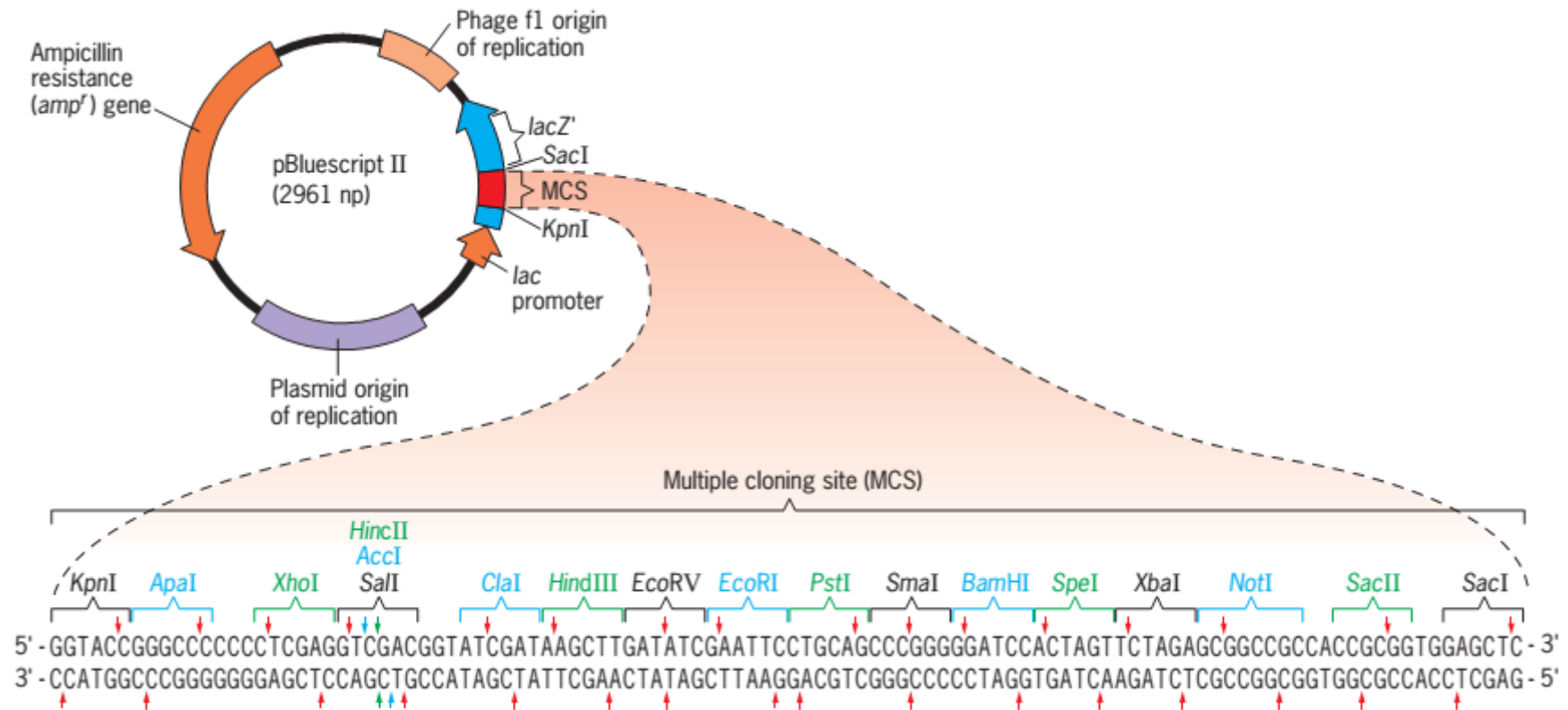
## TRÌNH TỰ CẦN GIẢI



**Dòng hóa vào plasmid**



# Cấu trúc cơ bản của một vector



- **MCS – Multiple cloning site** – Vùng có nhiều vị trí nhận biến của R-Enzyme;
- **Promoter** để tạo bản sao trong TB chủ hoặc biểu hiện gen;
- **Gen kháng kháng sinh** dùng để chọn lọc TB biến nạp.

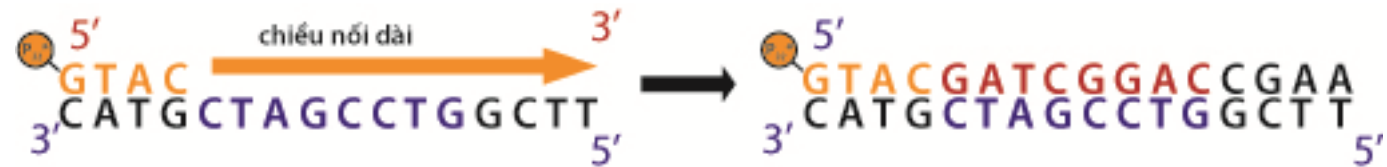
# Giải trình tự theo phương pháp Sanger

Đoạn cần giải trình tự  
(nằm trên vector)



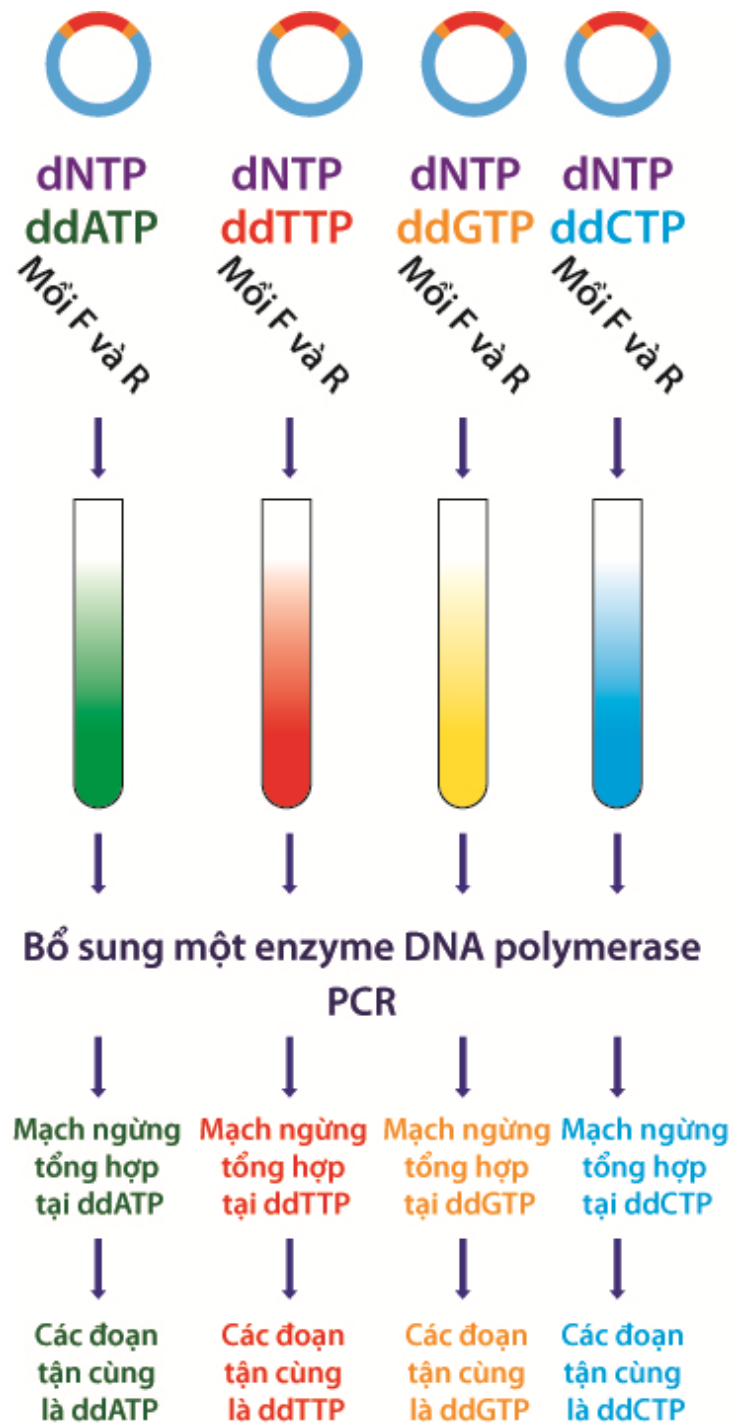
↓ + Klenow

- + dNTP



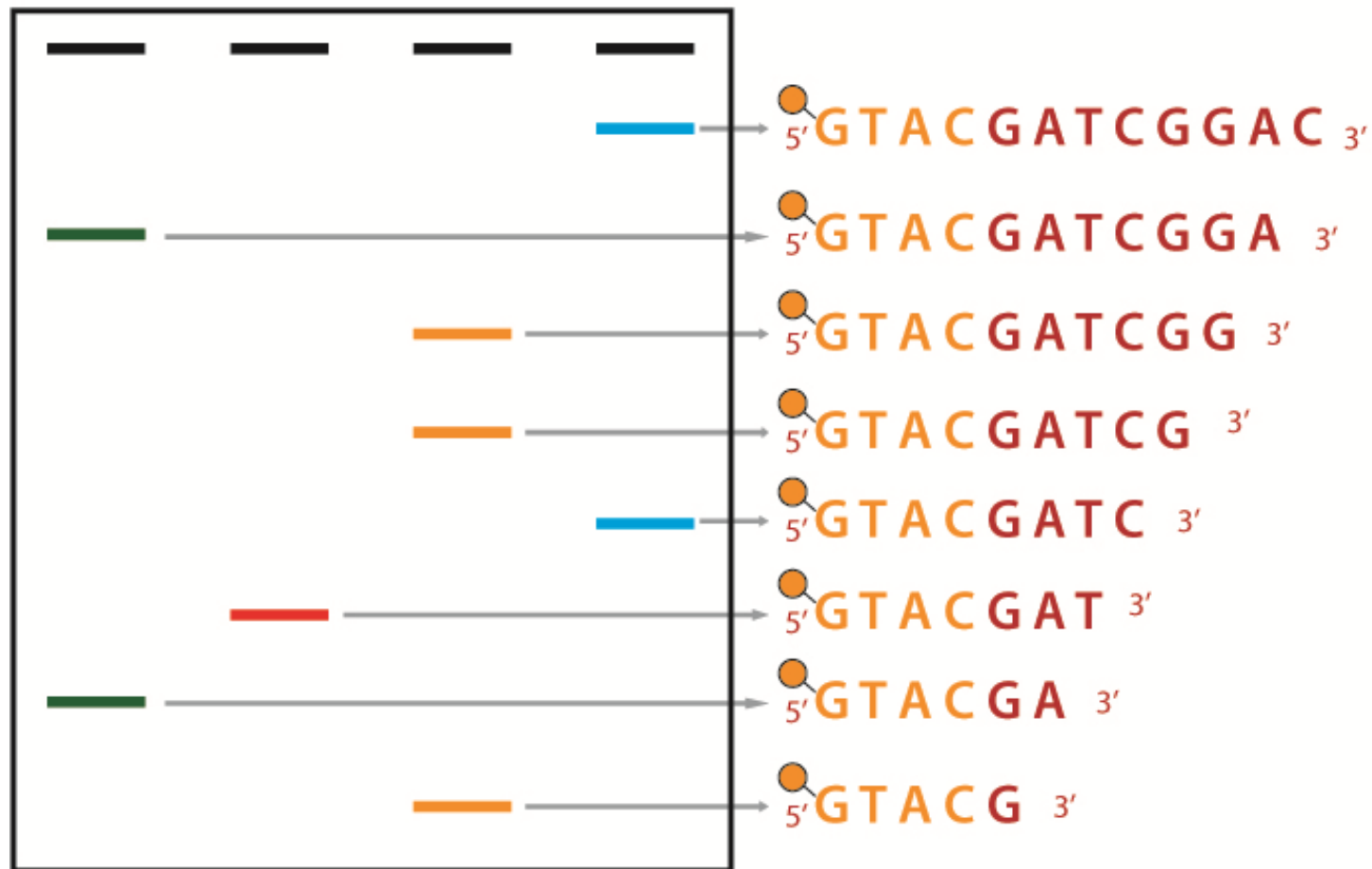
- + ddNTP  
(VD: ddTTP)







A T G C

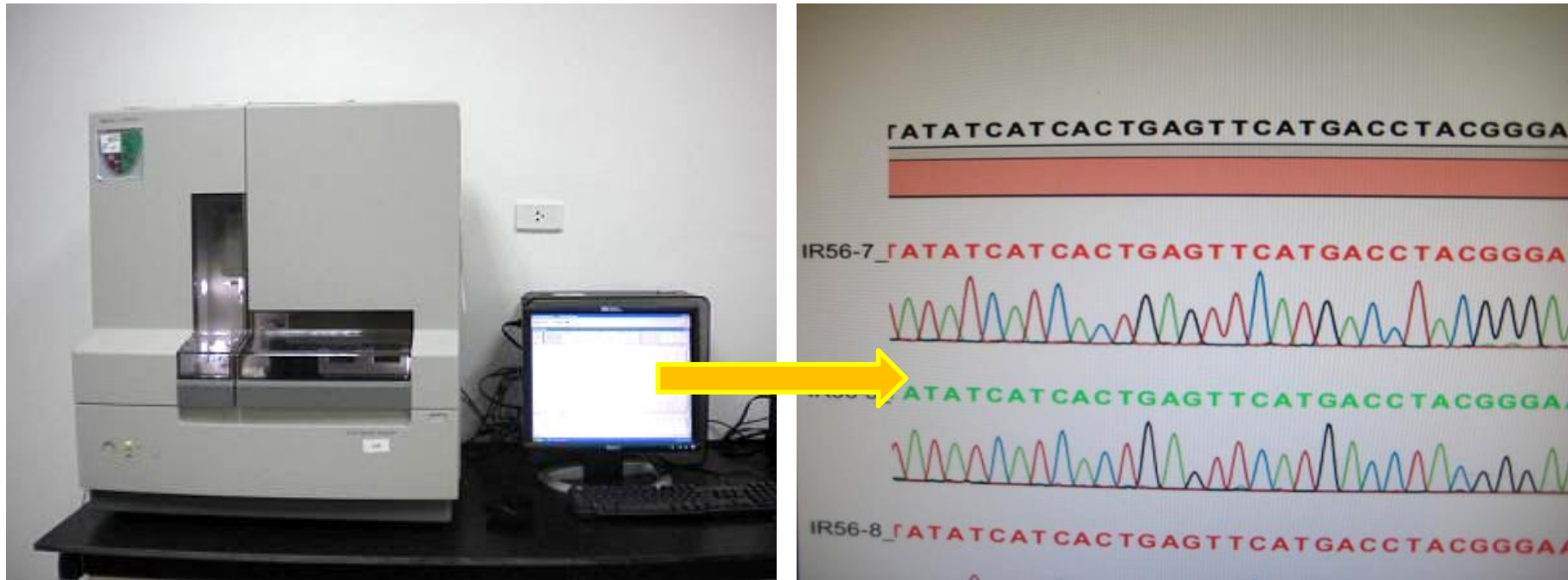


C  
A  
G  
G  
C  
T  
A  
G

Đọc trình tự từ dưới lên

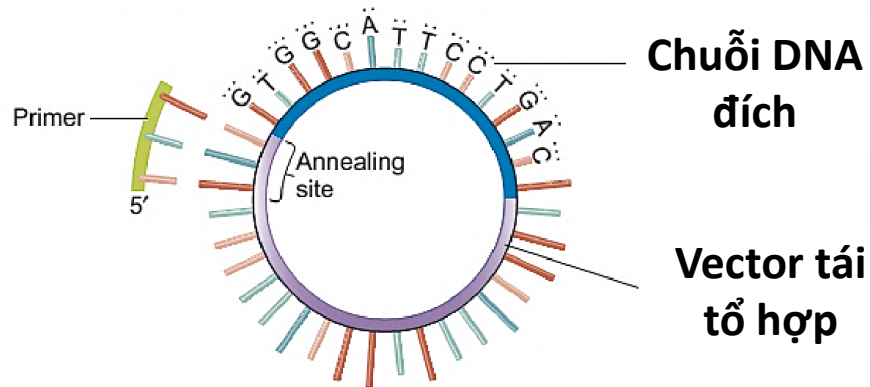
# Giải trình tự tự động

---

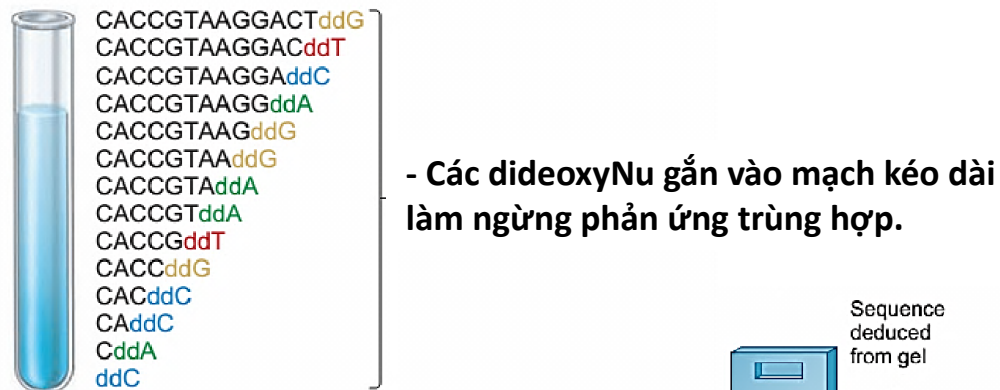


**Hệ thống giải trình tự tự động**

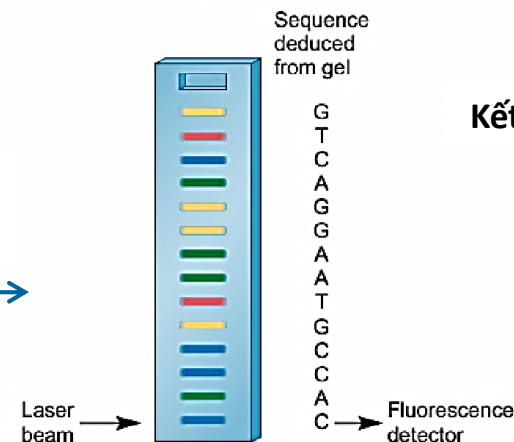
# Giải trình tự tự động



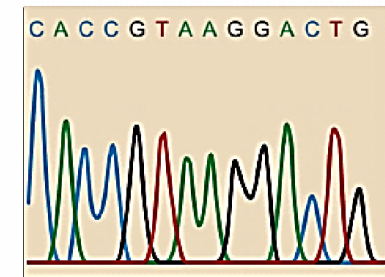
- Nhiều bản sao của vector tái tổ hợp, primer, dNTP, dideoxynucleotides đánh dấu huỳnh quang được trộn lẫn.
- Bổ sung DNA polymerase → PCR.



Phân tách các đoạn bằng điện di trên gel



Kết quả phân tích của máy tính



---

## **E. CẮT DNA GIỚI HẠN**

- 
- Là phương pháp để cắt gen hoặc một đoạn DNA bằng enzyme.
  - Enzyme thu nhận từ vi khuẩn, nấm và virus.
  - Ứng dụng:
    - Thu gen mục tiêu;
    - Cắt gen, vector và nối vào để tạo vector tái tổ hợp mang gen (tạo dòng);
    - Nghiên cứu đa hình chiều dài (RFLP).

# Các enzyme cắt giới hạn (RE)

---

- Danh pháp:
  - *Ba chữ cái in nghiêng*: tên của tế bào chủ;
  - **CHỮ CÁI ĐẦU VIẾT HOA**: giống;
  - hai chữ cái sau viết thường: loài;
  - Chữ cái thứ tư: chủng (nếu có);
  - **Số La Mã**: thứ tự tìm ra.

---

## Enzyme

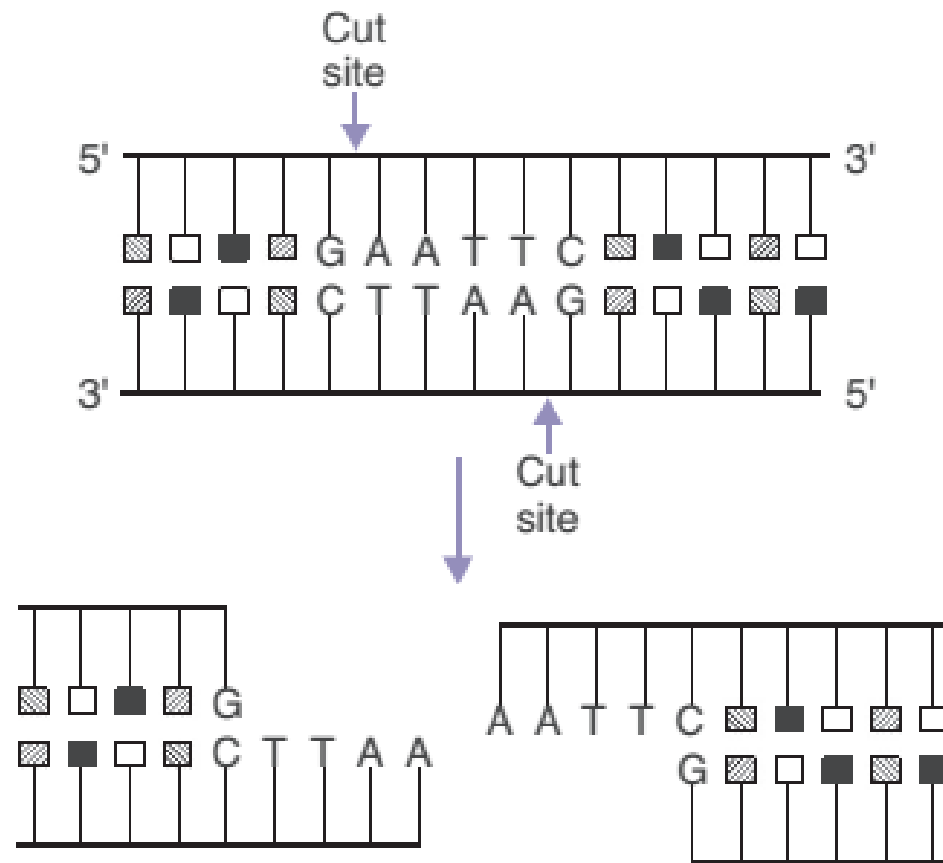
## Enzyme source

---

<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i> , 1st enzyme
<i>Hae</i> III	<i>Hemophilus aegyptius</i> , 3rd enzyme
<i>Hind</i> II	<i>Hemophilus influenzae</i> , strain d, 2nd enzyme
<i>Hind</i> III	<i>Hemophilus influenzae</i> , strain d, 3rd enzyme
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , strain H, 1st enzyme

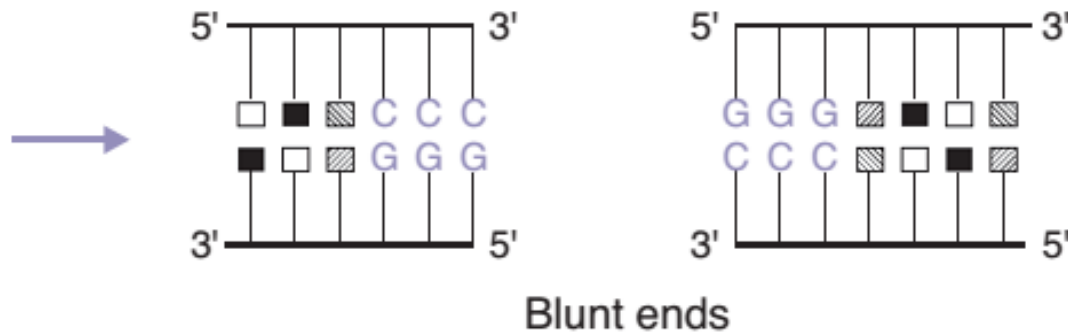
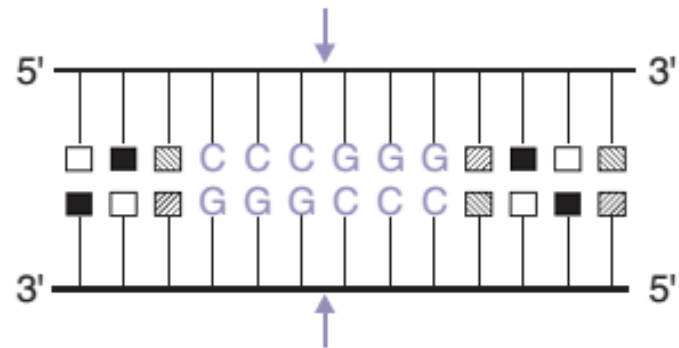
---

*EcoRI*



**Enzyme cắt DNA có đầu “dính”**

*SmaI*



**Enzyme cắt DNA có đầu “bằng”**



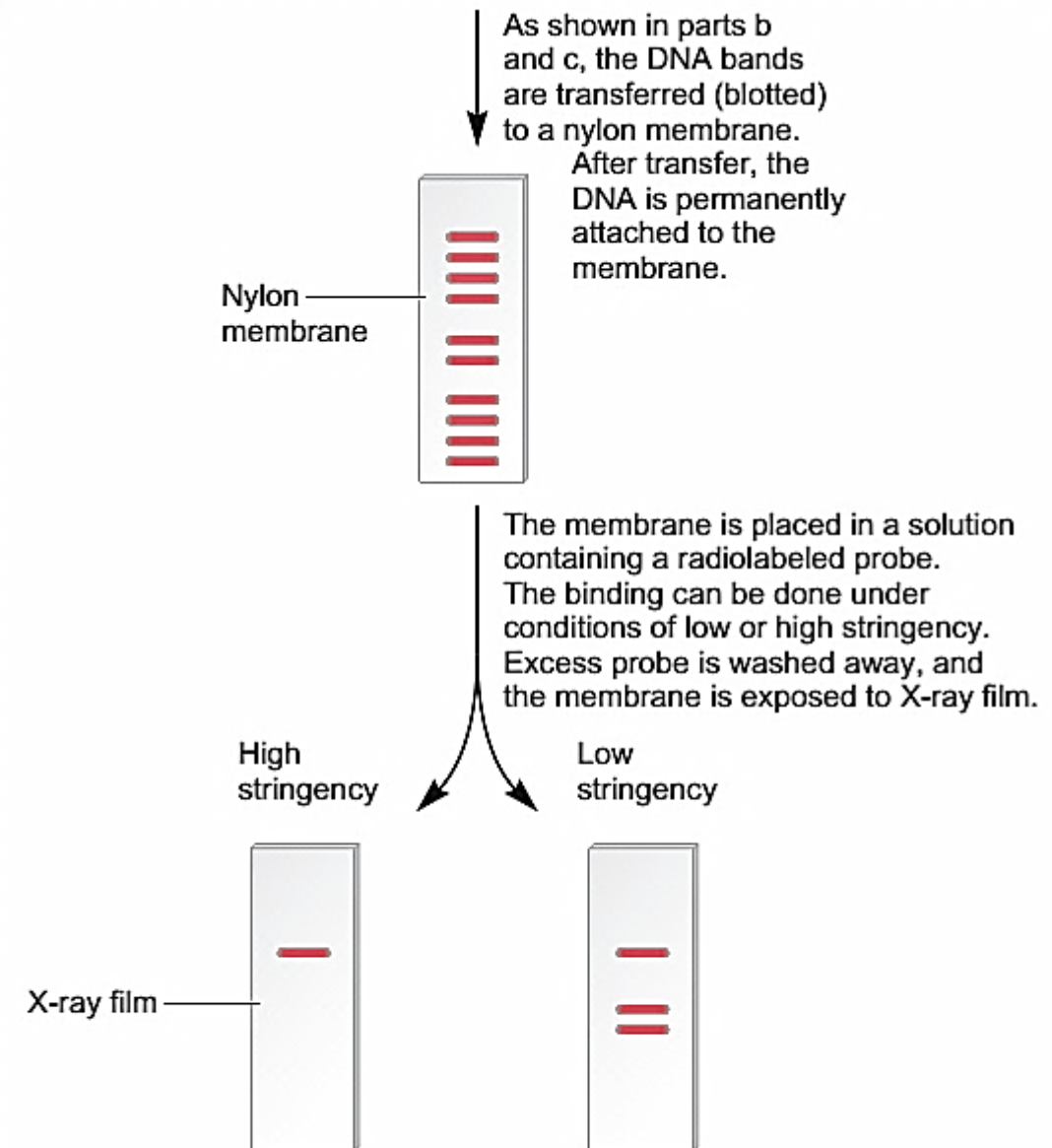
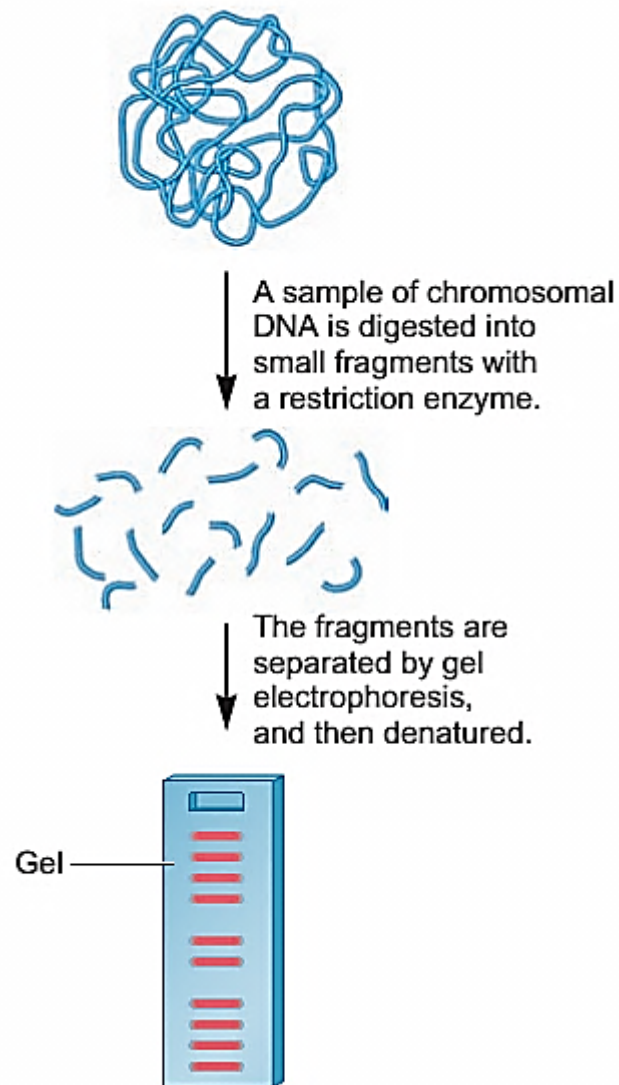
---

## **F. LAI PHÂN TỬ (hybridization)**

- 
- Là kỹ thuật chuyển các đoạn DNA, RNA hoặc protein lên màng lai và dùng các mẫu dò (probe) để xác định có sự hiện diện của phân tử mục tiêu hay không.
  - Ứng dụng trong phát hiện gene, protein bệnh; sự biểu hiện gen ở thời điểm, vị trí hoặc điều kiện nhất định nào đó...

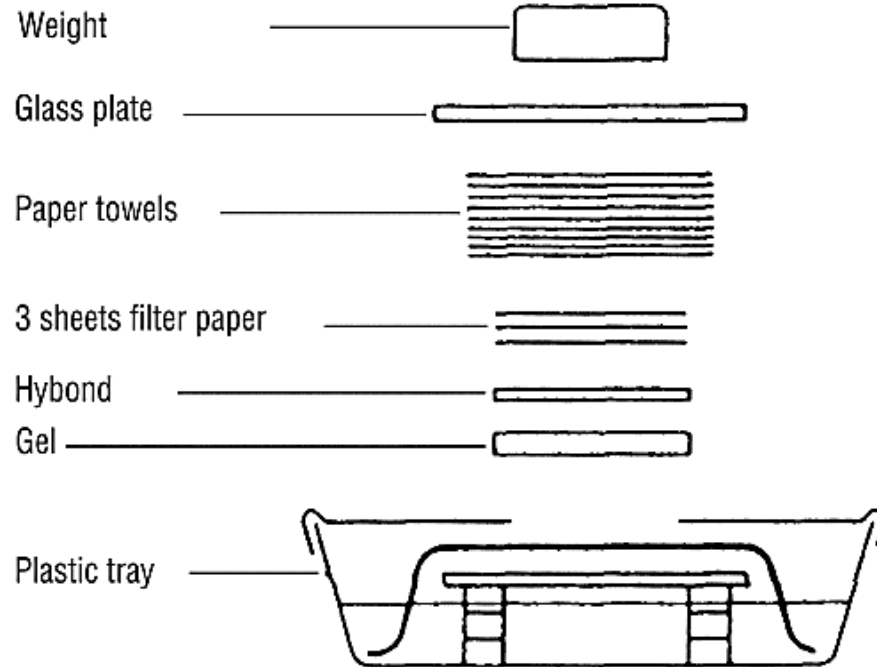
- 
- Lai là quá trình bắt cặp bổ sung giữa các base của hai mạch đơn polynucleotide.
  - Có nhiều kỹ thuật lai phân tử, nhưng cơ bản nhất là các kỹ thuật sau:
    - Southern blot – Lai DNA.
    - Northern blot – Lai RNA.
    - Western blot – Lai protein.
    - FISH.

# Southern blot

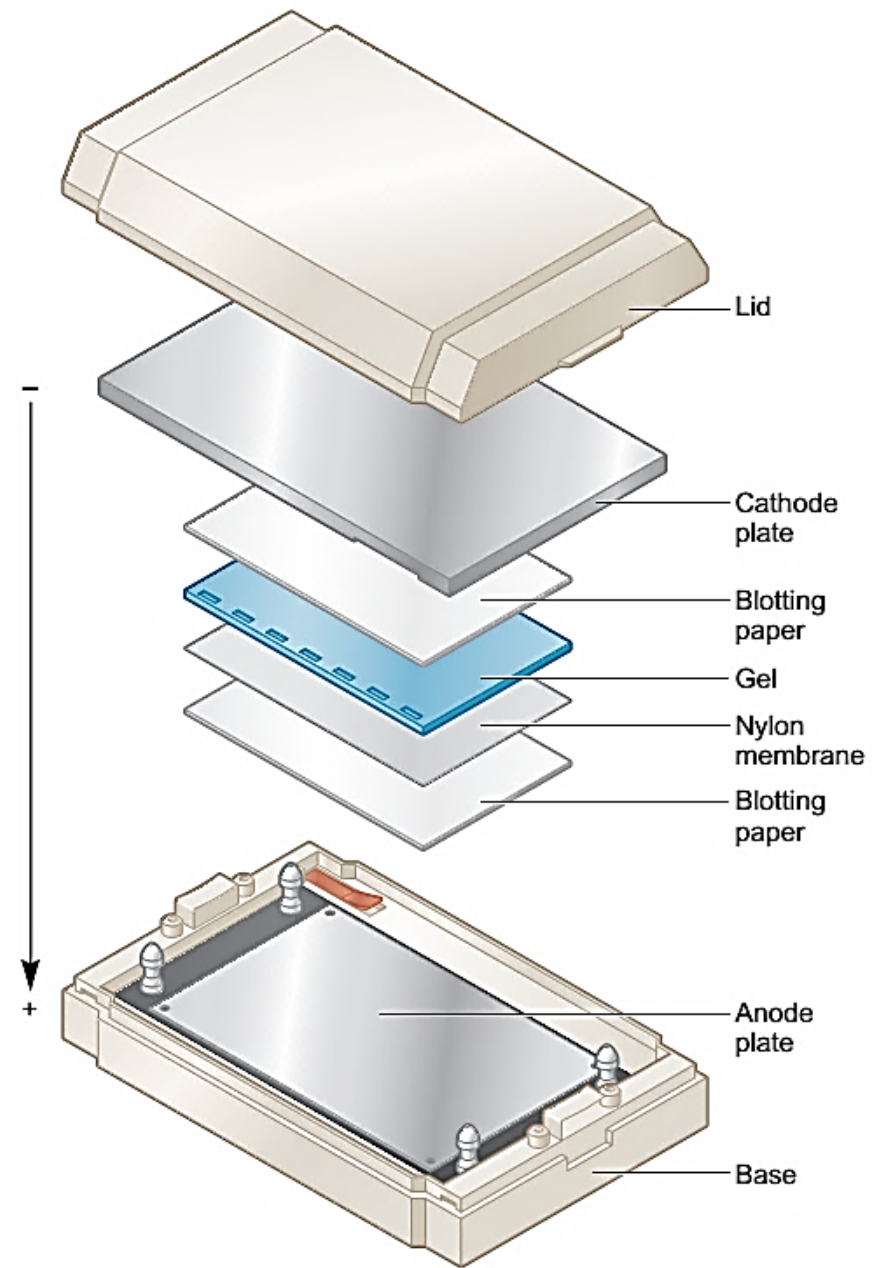


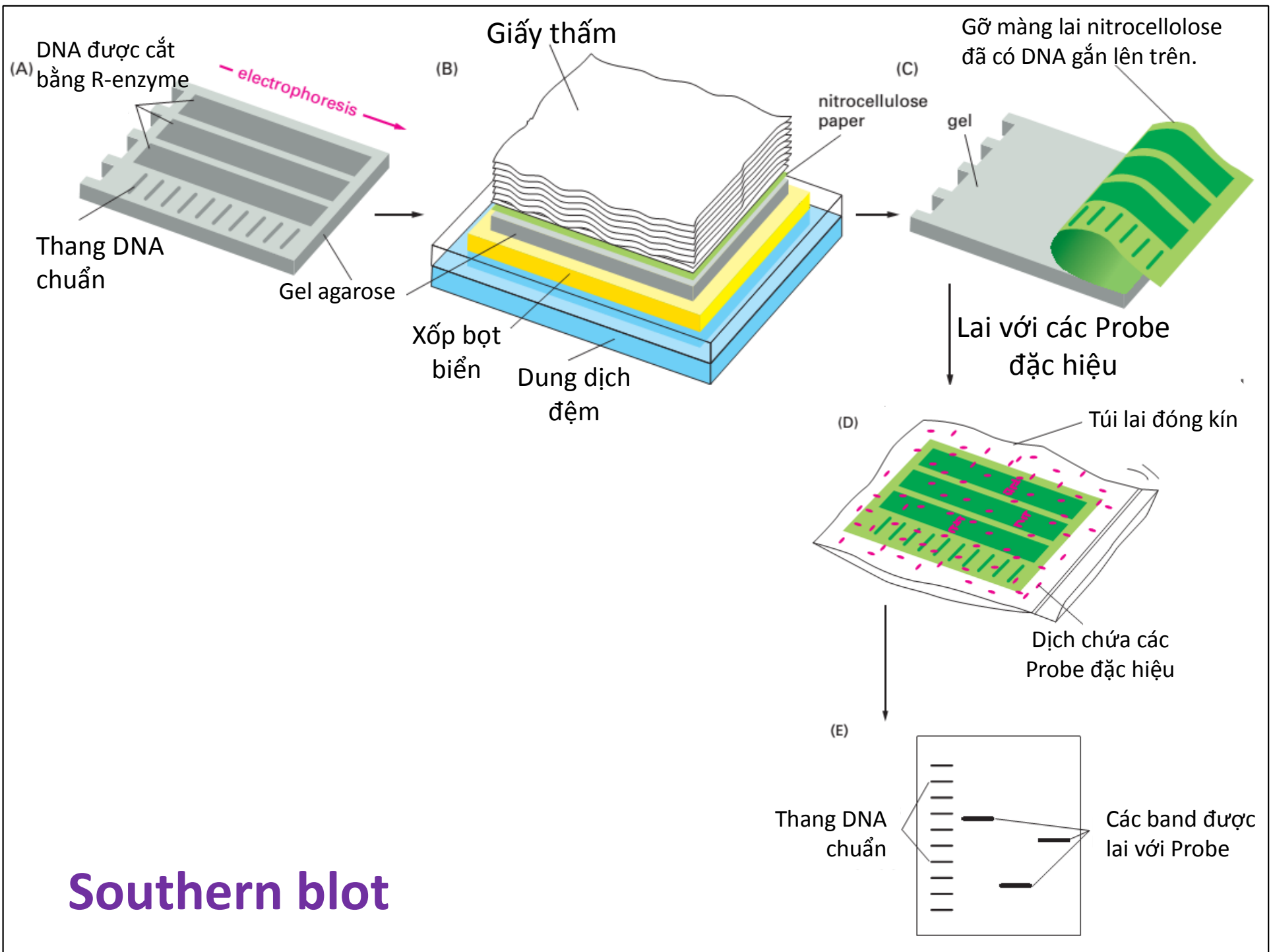
(a) The steps in Southern blotting

# Southern blot



- Ứng dụng phát hiện gen mục tiêu (bệnh)
- Kết hợp với RFLP, VNTR, STRs, SNPs... trong xác định huyết thống, pháp y, xác định hài cốt...





# Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

---

- FISH = Fluorescence in situ hybridization
- Thường được dùng để phát hiện các trường hợp mất đoạn, lặp đoạn hoặc chuyển đoạn NST.
- Đòi hỏi tính đặc hiệu cao của các mẫu dò (probe) và định hướng trong chẩn đoán lâm sàng.
- Kích thước mẫu dò: từ hàng chục Kb đến khoảng 1 Mb.

# Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

---

- Các loại mẫu dò:
  - **Dựa trên trình tự:** (1) trình tự lặp lại, (2) toàn bộ NST, hoặc (3) trình tự duy nhất.
  - **Dựa trên cách đánh dấu:**
    - **Đánh dấu trực tiếp:** mẫu dò có Nucleotide gắn huỳnh quang;
    - **Đánh dấu gián tiếp:** mẫu dò có Nucleotide gắn hapten, sau đó bổ sung kháng thể phù hợp (gắn huỳnh quang).

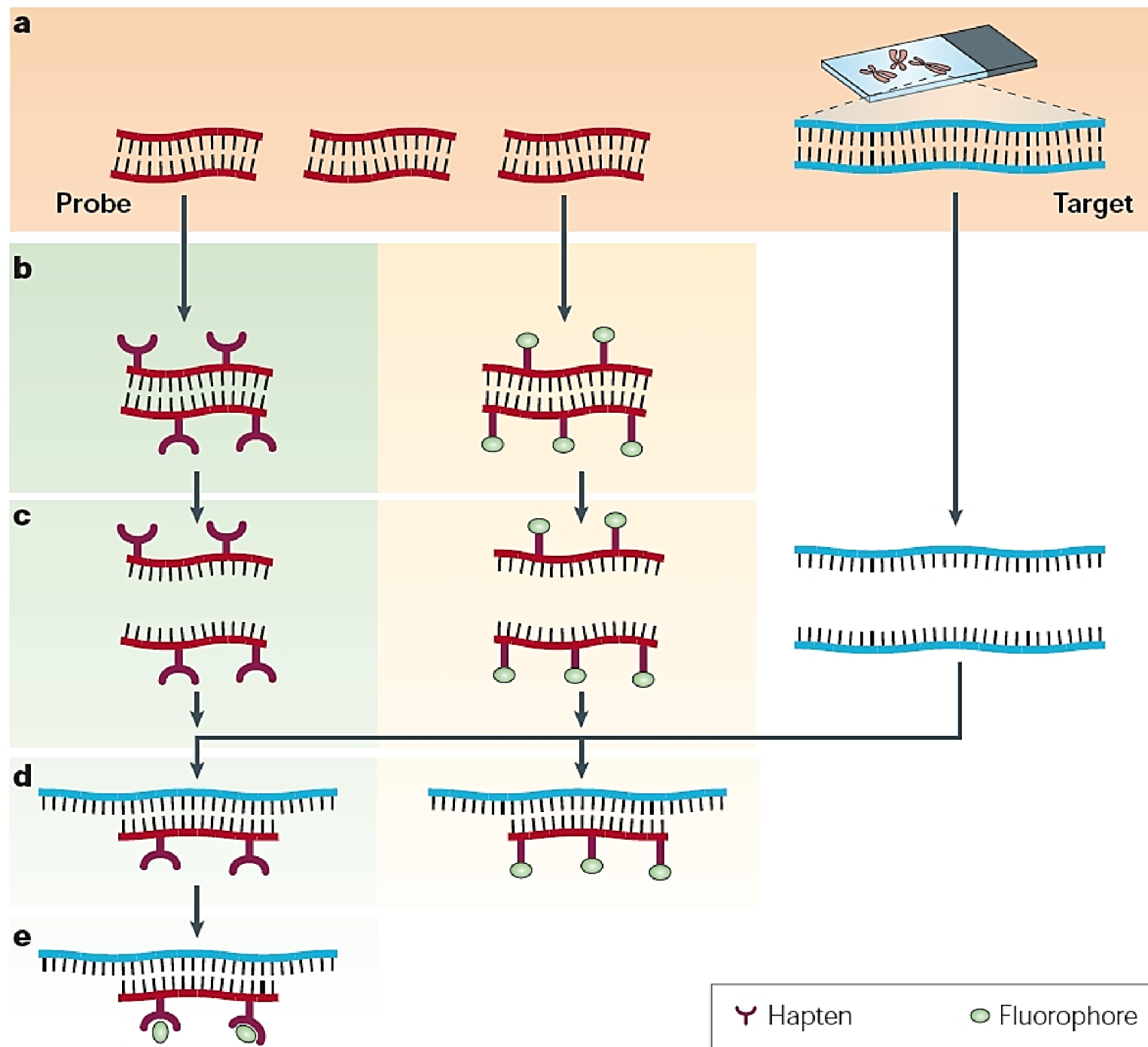


# Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

---



Kết quả xét nghiệm FISH của bệnh nhân bị mất đoạn trên vùng 22q11.



# Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

---

- **Ưu điểm**

- Phát hiện được bất thường NST trên cả TB không phân chia.
- Interphase FISH không cần phải nuôi tế bào, độ nhạy > 50 kB
- Mẫu dò đặc hiệu nên rất nhạy.

- **Nhược điểm**

- Phụ thuộc vào mẫu dò.
- Không quan sát được toàn bộ cấu trúc bộ NST.
- Một số trường hợp không phát hiện được các vi mất đoạn.

# TÀI LIỆU THAM KHẢO

---

1. Jane B. Reece et al., *Campbell Biology*, 10<sup>th</sup> ed, Benjamin Cummings, 2013.
2. Lodish et al., *Molecular Cell Biology*, 7<sup>th</sup> ed. W.H Freeman & Company, 2013.

---

# Cảm ơn đã lắng nghe!

Liên hệ: [chile@ump.edu.vn](mailto:chile@ump.edu.vn)

**Lưu ý:** SV làm feedback cho nội dung bài giảng  
và phương pháp giảng dạy.