

GIẢI TRÌNH TỰ DNA

Biên soạn: CN. Trần Anh Minh

BM. Sinh học, khoa Khoa học cơ bản, ĐH. Y Dược TP. HCM

- Có hai phương pháp chính để giải trình tự DNA, và nguyên tắc chung là dựa vào PCR (với mỗi được đánh dấu phóng xạ) và điện di.
- Điện di trên gel có độ phân giải cao (có thể phân biệt được những đoạn DNA chỉ hơn kém nhau 1 nucleotide) như gel polyacrylamide hoặc điện di mao quản.
- Hai phương pháp đó là:
 - o **PP Hóa học**, do Maxam & Gilbert phát minh. Ngày nay ít dùng vì sử dụng primer (mồi) có phóng xạ.
 - o **PP Enzyme hay PP Dideoxynucleotide**, do Sanger phát minh, được ứng dụng trong các máy giải trình tự tự động ngày nay.

1. PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC (MAXAM – GILBERT)

- Giả sử ta có bộ gen, và cần giải một trình tự DNA trong bộ gen đó (...GATCGGAC...)



- Ta chuẩn bị một cặp mồi (xuôi và ngược, đã biết trình tự, và chắc chắn là không gắn vào vị trí khác trên bộ gen) nằm hai bên đoạn DNA cần giải trình tự.
- Trong cặp mồi nói trên, thì một mồi có nucleotide mang phóng xạ ^{32}P , mồi này dùng để đánh dấu một mạch, ta sẽ giải trình tự đoạn polynucleotide được kéo dài từ mồi này. Sau khi giải trình tự xong mạch này, ta sẽ suy ra trình tự mạch kia theo nguyên tắc bổ sung A-T, G-C.
 - o Mồi xuôi: 5'*GTAC 3' (*G là Guanin có phóng xạ ^{32}P)
 - o Mồi ngược: 3' GCTT 5'
- Đầu mỗi chu kỳ PCR, từng mồi sẽ bắt vào mạch bổ sung của nó.



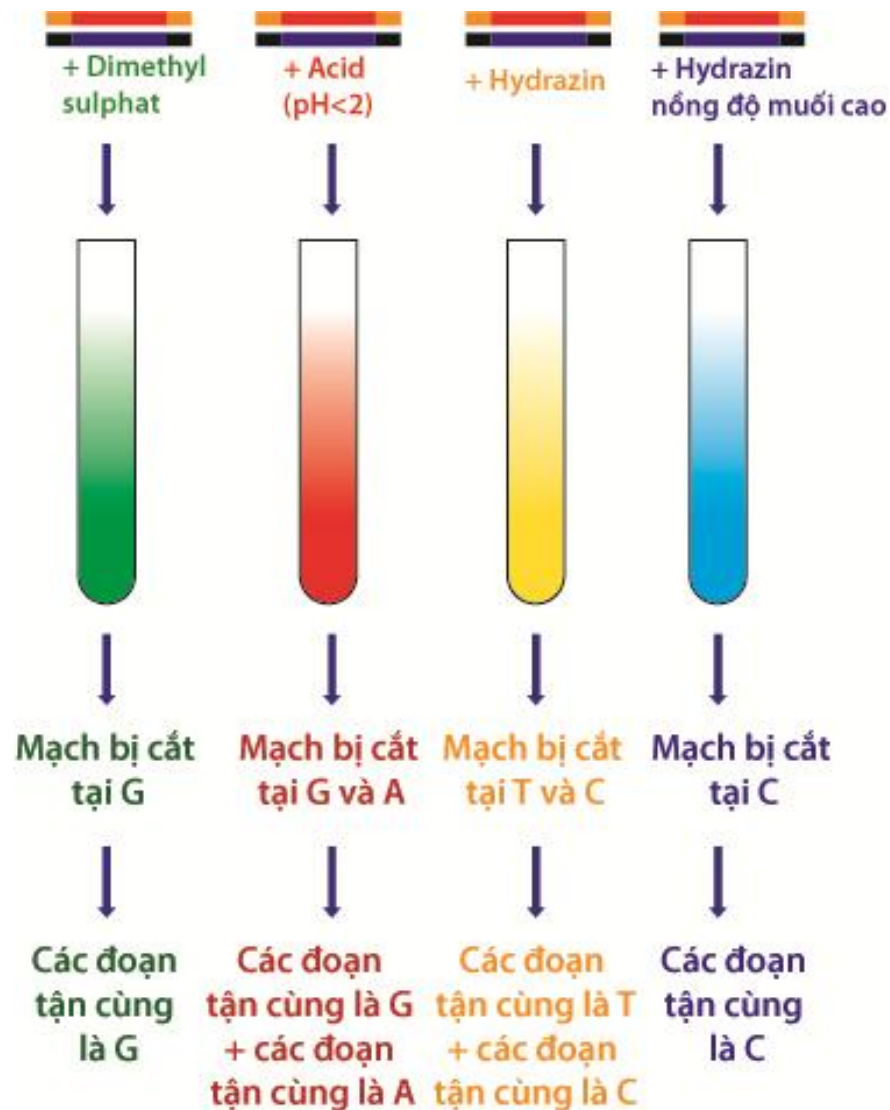
(Mỗi có vòng tròn đỏ màu cam (GTAC) là mỗi có phóng xạ ^{32}P .)

- Để bớt rườm rà, tôi chỉ vẽ mạch có mỗi phóng xạ gắn. Sau khi PCR, ta sẽ có sản phẩm là đoạn gen mục tiêu.

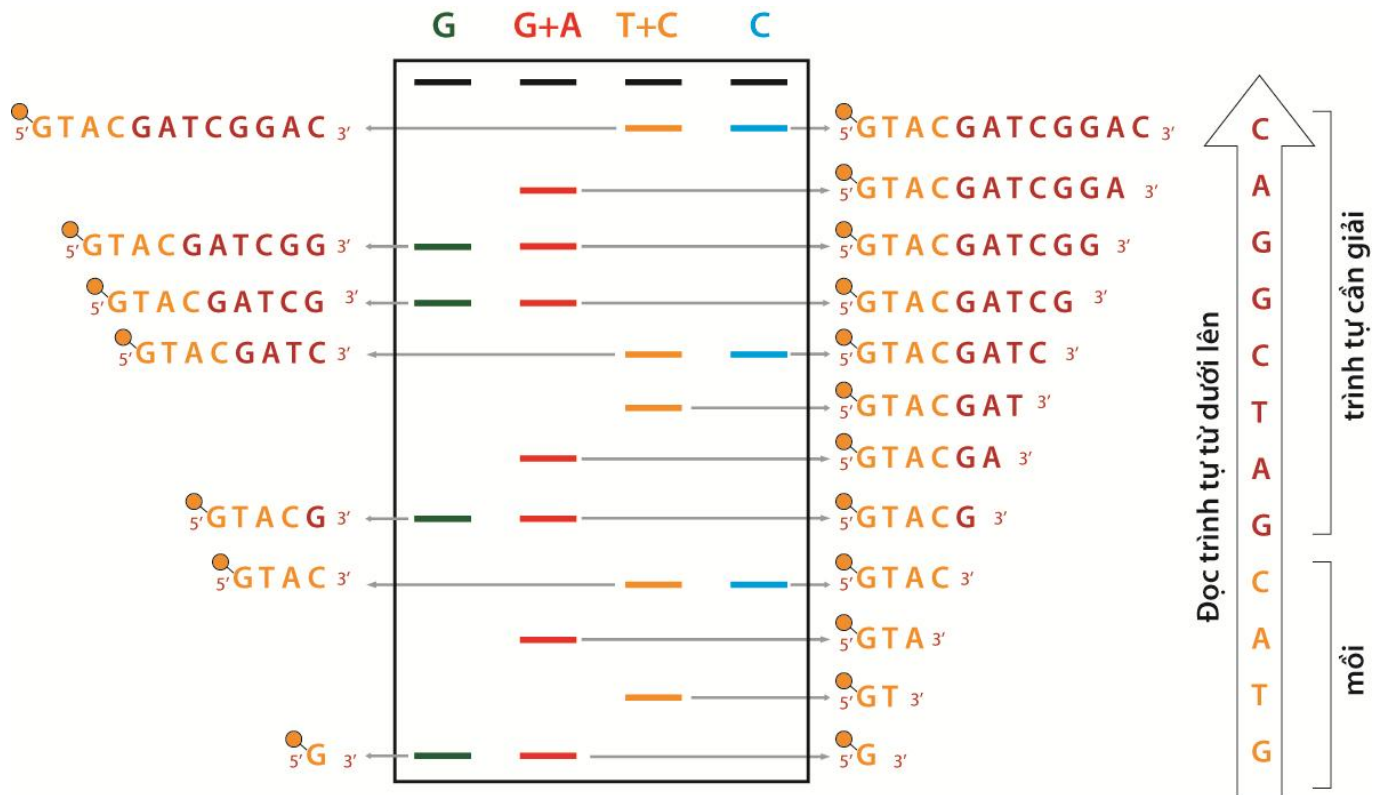


- Tất nhiên ta chưa biết trình tự sau mỗi là gì, những hình trên ghi rõ trình tự ra chỉ để các bạn dễ hình dung.
- Vậy sau khi PCR, ta sẽ có một lượng lớn đoạn gen mục tiêu. Lúc này, ta sẽ đem hỗn hợp này chia làm 4 phần, và đưa vào 4 ống nghiệm riêng biệt.
- Mỗi ống nghiệm ta sẽ cho thêm các hóa chất có khả năng làm biến đổi các nucleotide như sau:
 - **Ống 1: Dimethyl sulphat**
 - **Ống 2: acid (pH<2)**
 - **Ống 3: Hydrazin**
 - **Ống 4: Hydrazin nhưng môi trường có nồng độ muối cao.**
- Các hóa chất ở từng ống sẽ thủy phân hỗn hợp DNA trong mỗi ống nghiệm thành các đoạn nhỏ ở các vị trí trên DNA như sau:
 - **Ống 1:** Các đoạn DNA bị cắt tại G, tạo thành một hỗn hợp các đoạn có kích thước khác nhau và tận cùng tại G.
 - **Ống 2:** Các đoạn DNA bị cắt tại G và A, tạo thành một hỗn hợp các đoạn có kích thước khác nhau và tận cùng tại G hoặc A.

- **Ống 3:** Các đoạn DNA bị cắt tại T và C, tạo thành một hỗn hợp các đoạn có kích thước khác nhau và tậm cùng tại T hoặc C.
- **Ống 4:** Các đoạn DNA bị cắt tại C, tạo thành một hỗn hợp các đoạn có kích thước khác nhau và tậm cùng tại C.



- Điện di các ống nghiệm sau phản ứng thủy phân, sau đó hiện các vạch lên phim bằng tia X, ta có kết quả như sau (lưu ý là phản ứng ở mỗi ống nghiệm tạo ra rất nhiều đoạn DNA kích thước khác nhau, nhưng chỉ có đoạn nào có mang **nucleotide gắn phóng xạ mới hiện vạch trong kết quả điện di**, những đoạn còn lại không hiện vạch).



- **Ví dụ 1: Ở giếng G (ống nghiệm 1),** sản phẩm PCR bị cắt thành nhiều đoạn có nucleotide cuối cùng là G, nhưng chỉ có những đoạn có mồi đánh dấu phóng xạ là hiện vạch trên phim, những đoạn đó là:
 - *G
 - *GTACG
 - *GTACGATCG
 - *GTACGATCGG

- **Ở giếng G+A (ống nghiệm 2),** sản phẩm PCR bị cắt thành nhiều đoạn tận cùng là G hoặc A, trong đó các đoạn có dính mồi phóng xạ gồm:
 - Các đoạn có nucleotide cuối cùng là G (giống giếng 1):
 - *G
 - *GTACG
 - *GTACGATCG
 - *GTACGATCGG
 - Các đoạn có nucleotide cuối cùng là A:

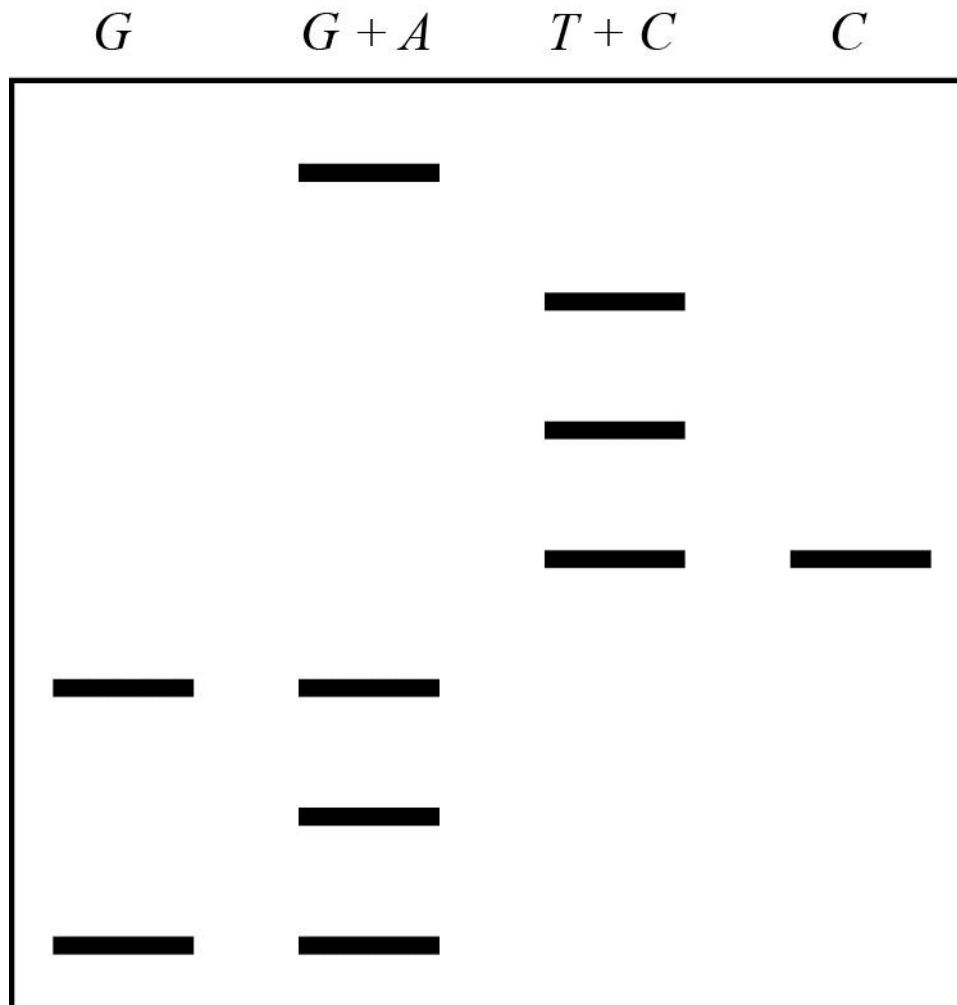
- ***GTA**
- ***GTACGA**
- ***GTACGATCGGA**

- Giếng T+C và giếng C giải thích tương tự.

*Lưu ý: *G là Guanin có ^{32}P .*

Màu sắc chỉ mang tính minh họa. Khi hiện phim sẽ cho vạch sáng trên nền phim tối.

- Khi điện di, đoạn nào kích thước nhỏ nhất sẽ chạy xa nhất. Vậy khi đọc trình tự, ta sẽ đọc từ cuối phim lên phía giếng: 5' **GTACGATCGGAC** 3'
- **Ví dụ 2:** Đọc trình tự DNA sau:

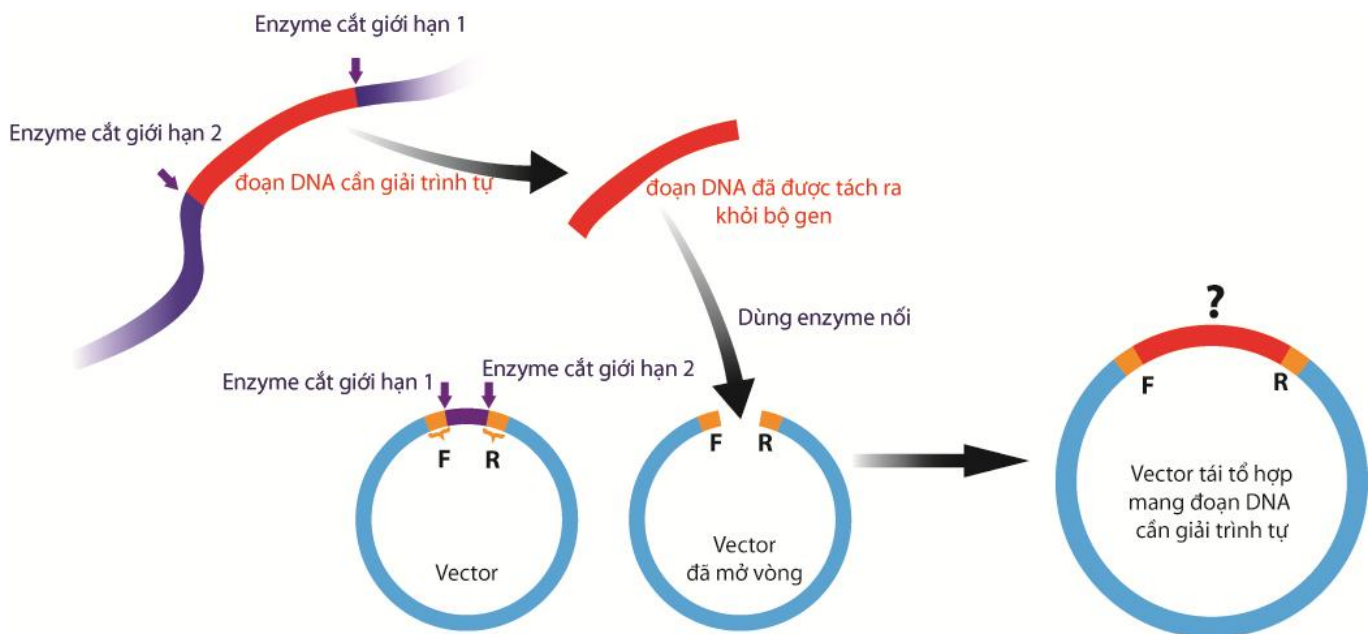


Theo cách đã trình bày ở ví dụ 1, ta đọc từ dưới lên: **5'GAGCTTA3'**

2. PHƯƠNG PHÁP ENZYME HAY DIDEOXYNUCLEOTIDE (SANGER)

- Hiện nay, đây là phương pháp giải trình tự phổ biến.
- Cần thực hiện các kỹ thuật: Tạo dòng, PCR, điện di.
- Tạo dòng. Cần chuẩn bị:
 - o DNA bộ gen hoặc đoạn DNA có mang đoạn trình tự cần giải.
 - o Vector (plasmid chẳng hạn) đã biết trình tự.
 - o Enzyme cắt giới hạn, dùng để cắt mở vòng vector và cắt đoạn gen mục tiêu ra khỏi bộ gen; enzyme nối để tạo vector tái tổ hợp.
 - o Chủng vi khuẩn làm tế bào mang vector tái tổ hợp, tạo nguồn gen phong phú.

Sau khi đã có dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp, ta có thể tách chiết vector tái tổ hợp ra để sử dụng khi cần.



- Hình trên mô tả sự tạo vector tái tổ hợp mang đoạn DNA cần giải trình tự. Đoạn màu cam nằm trên vector có ký hiệu F, R là những đoạn đã biết trình tự, sau này sẽ là khuôn để gắn cặp mồi (xuôi = F, forward; ngược = R, reverse) cho phản ứng PCR giải trình tự.
- Giả sử ta lấy lại trình tự ở phần trước, với 1 mồi 5'-GTAC-3' được đánh dấu phóng xạ ^{32}P . Mồi còn lại không phóng xạ.
- Giống như phần trước, ta chỉ cần giải trình tự 1 mạch thì sẽ suy ra được trình tự mạch còn lại. Trình tự được giải là trình tự có gắn mồi được đánh dấu phóng xạ, sẽ hiện vạch trên phim.



- Ở phương pháp này, trình tự sẽ được giải nhờ hoạt động tổng hợp mạch mới của enzyme DNA polymerase nên còn gọi là phương pháp enzyme. Tuy nhiên, ngoài các deoxyribonucleoside triphosphate thông thường (dNTP, là dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (ta quen gọi tắt là các base ni-tơ, hoặc nucleotide A, T, G, C), người ta còn bổ sung một lượng nhất định dideoxynucleoside triphosphate (ddNTP là ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP).
- Cấu tạo:

ddNTPs terminate DNA synthesis.

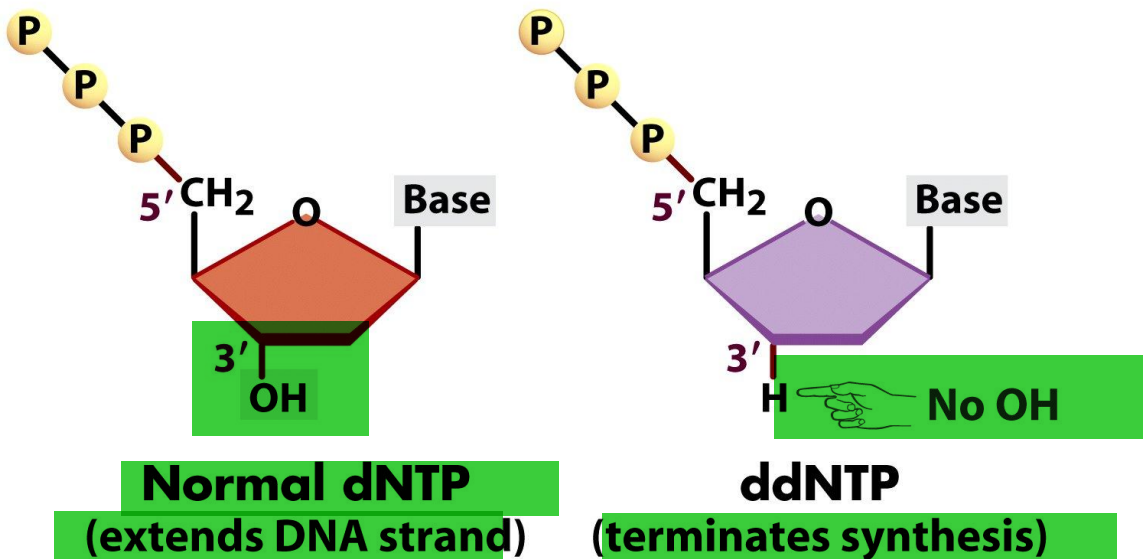
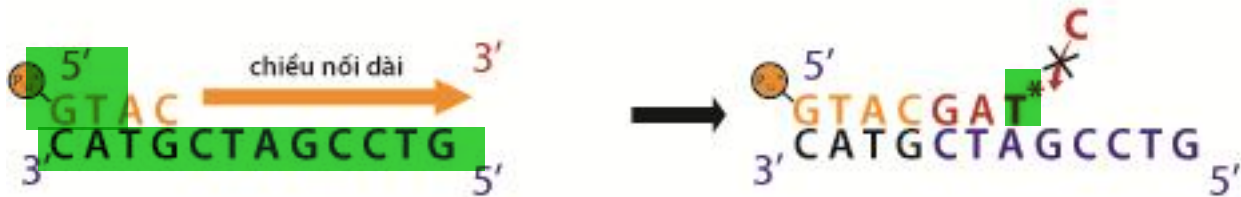


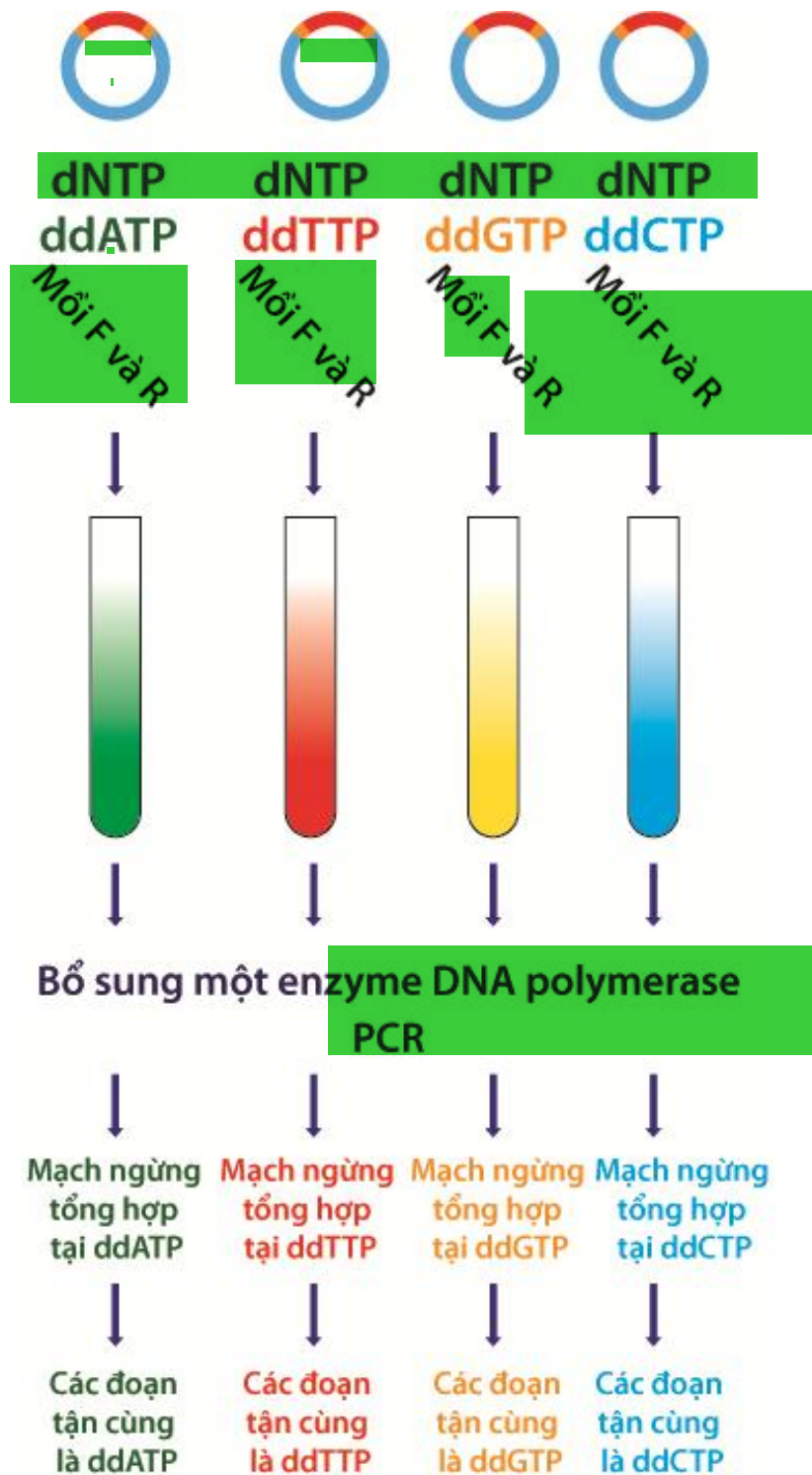
Figure 19-6a Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

- Bình thường, khi tổng hợp mạch mới, DNA polymerase sẽ gắn các dNTP với nhau ở 3'-OH và 5'P → liên kết cộng hóa trị → mạch được kéo dài.
- Nhưng nếu trong môi trường có ddNTP, do 3'- của ddNTP là 3'-H chứ không phải 3'-OH, nên không hình thành liên kết cộng hóa trị với dNTP tiếp theo → mạch ngừng kéo dài.
- Ví dụ như hình dưới đây: Trường hợp trên là trường hợp gắn dNTP bình thường, còn ở dưới là trường hợp gắn ddNTP.



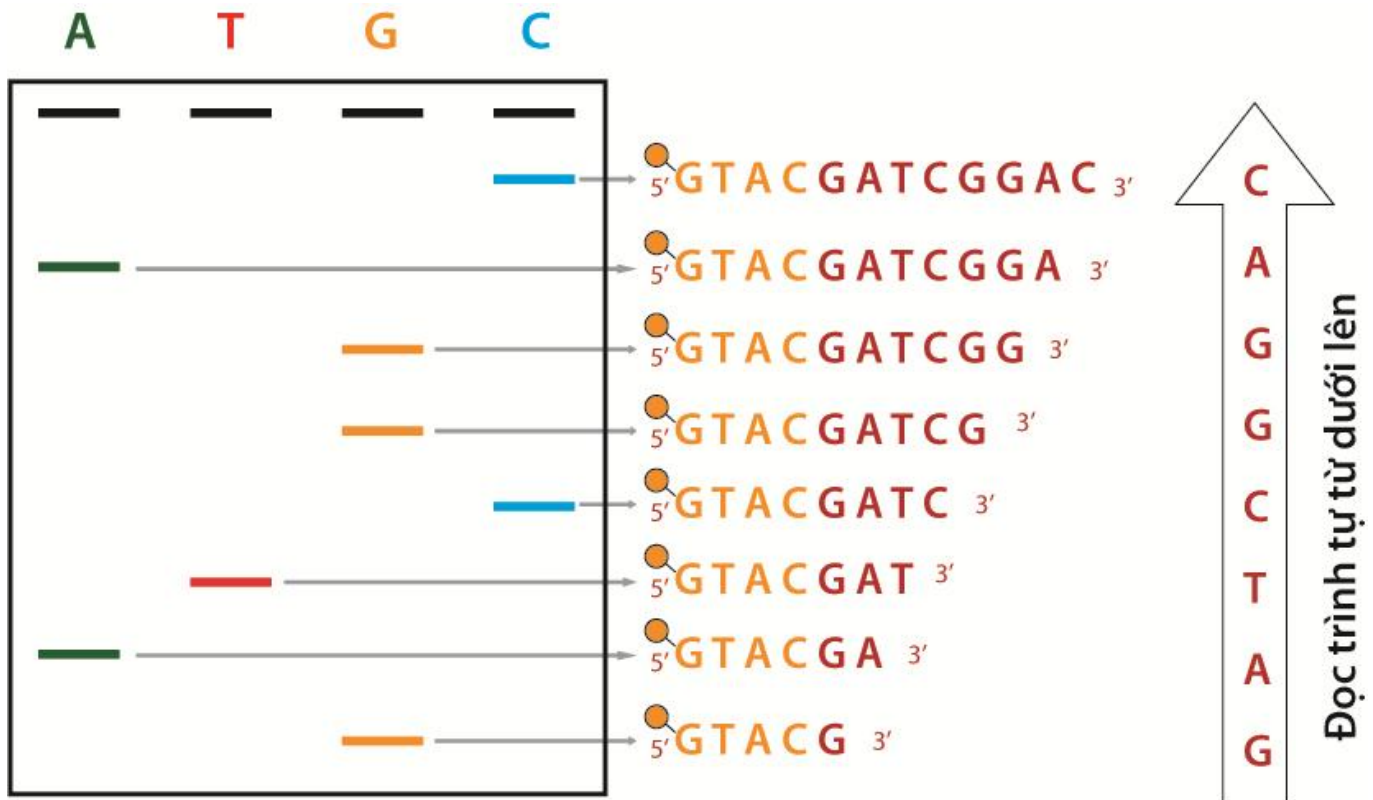
- Dựa trên nguyên tắc đó, phương pháp giải trình tự của Sanger còn được gọi là phương pháp Dideoxynucleotide.
- Nên nhớ, khi PCR diễn ra, cả hai mồi đều được gắn vào hai mạch khuôn và đều được kéo dài, liên tục tạo ra các mạch mới...Nhưng ta chỉ quan tâm đến mạch DNA được kéo dài từ mồi có phóng xạ mà thôi, vì kết quả điện di chỉ hiện hình các đoạn có đánh dấu phóng xạ.
- **Thực hiện:**
 - o Chuẩn bị 4 ống nghiệm riêng biệt. Mỗi ống nghiệm có các thành phần như hình dưới.



- Ta thấy các ống nghiệm chỉ khác nhau về ddNTP.

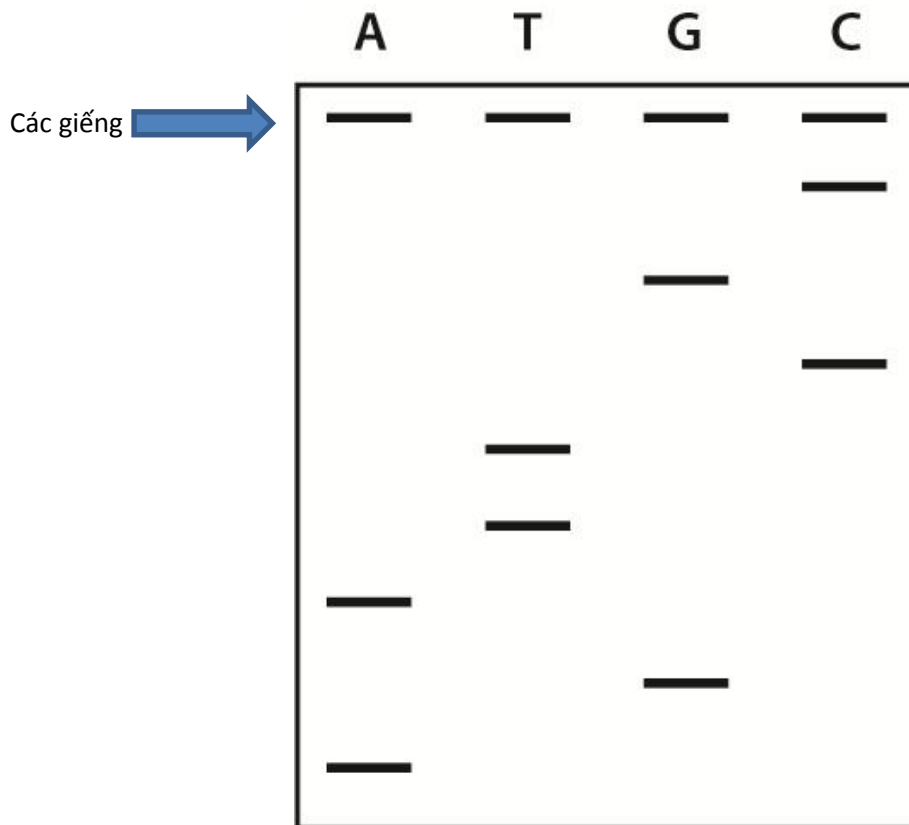
- Ống 1: bổ sung ddATP
- Ống 2: bổ sung ddTTP
- Ống 3: bổ sung ddGTP
- Ống 4: bổ sung ddCTP

- Do ddNTP chiếm lượng nhỏ nên sự ngừng kéo dài mạch ở mỗi ống nghiệm diễn ra tại các điểm ngẫu nhiên trên chiều dài của mạch DNA khuôn. Sau khi PCR, mỗi ống nghiệm sẽ cho các đoạn DNA kích thước khác nhau, cụ thể:
 - o Ống 1: Có các đoạn DNA bị ngừng kéo dài ở ddATP.
 - o Ống 2: Có các đoạn DNA bị ngừng kéo dài ở ddTTP.
 - o Ống 3: Có các đoạn DNA bị ngừng kéo dài ở ddGTP.
 - o Ống 4: Có các đoạn DNA bị ngừng kéo dài ở ddCTP.
- Sau khi điện di gel polyacrylamide và chụp phim với tia X (phóng xạ tự ghi), những đoạn DNA có mang mồi gắn phóng xạ sẽ hiện vạch trên phim chụp. Sự hơn kém 1 nucleotide giữa đoạn trước với đoạn sau cho ta thứ tự của các nucleotide ngay trên kết quả điện di:



- Ví dụ: Ở giếng A (ống nghiệm 1 có bổ sung ddATP), sự gắn ngẫu nhiên ddATP sẽ làm cho mạch ngừng tổng hợp tiếp và ta có các đoạn (không kể đoạn mồi GTAC):
 - o GA
 - o GATCGGA
- Hai đoạn trên sẽ hiện rõ trên phim.
- Giải thích tương tự cho các trường hợp giếng T, G, C.
- Đọc từ dưới lên theo thứ tự, ta có trình tự cần giải là 5'-GATCGGAC-3'

Một ví dụ khác: Cho bản phim chụp kết quả điện di, đọc trình tự DNA cần giải:



- Đọc từ dưới lên, ta có trình tự: **5'-AGATTCGC-3'**
- Phương pháp giải trình tự tự động bằng máy dựa theo phương pháp Sanger, nhưng dùng điện di mao quản. Các ddNTP được đánh dấu huỳnh quang với màu sắc khác nhau (VD: A lục, T đỏ, G vàng/đen, C lam). Các đoạn DNA kích thước khác nhau sẽ di chuyển trong ống mao quản, tương tự như điện di trên gel (hình dung mỗi ống mao quản là một giếng), đi qua thiết bị đọc tín hiệu ánh sáng. Máy sẽ tính toán và trả về kết quả trên màn hình máy tính dưới dạng các đỉnh sóng (peak) (xem hình dưới).



Hệ thống giải trình tự tự động



Kết quả giải trình tự tự động.

Mỗi đỉnh sóng (peak) ứng với một loại ddNTP → suy ra dNTP

NỘI DUNG CÂU HỎI THI CỦA PHẦN NÀY

- **HIỂU** NGUYÊN LÝ VÀ ỨNG DỤNG CỦA CÁC PHƯƠNG PHÁP TRONG BÀI (KỂ CẢ PHẦN TỰ HỌC NÀY).
- **KHÔNG** HỎI NHỮNG CÂU THUỘC LÒNG ĐẠI LOẠI NHƯ: “có mấy phương pháp nghiên cứu di truyền phân tử?”, “kỹ thuật PCR ra đời năm nào”, “ai là người phát minh ra phương pháp PCR?”, “bệnh loạn dưỡng cơ duchene di truyền trội hay lặn?”, “trong giải trình tự tự động thì G có màu gì?”,...