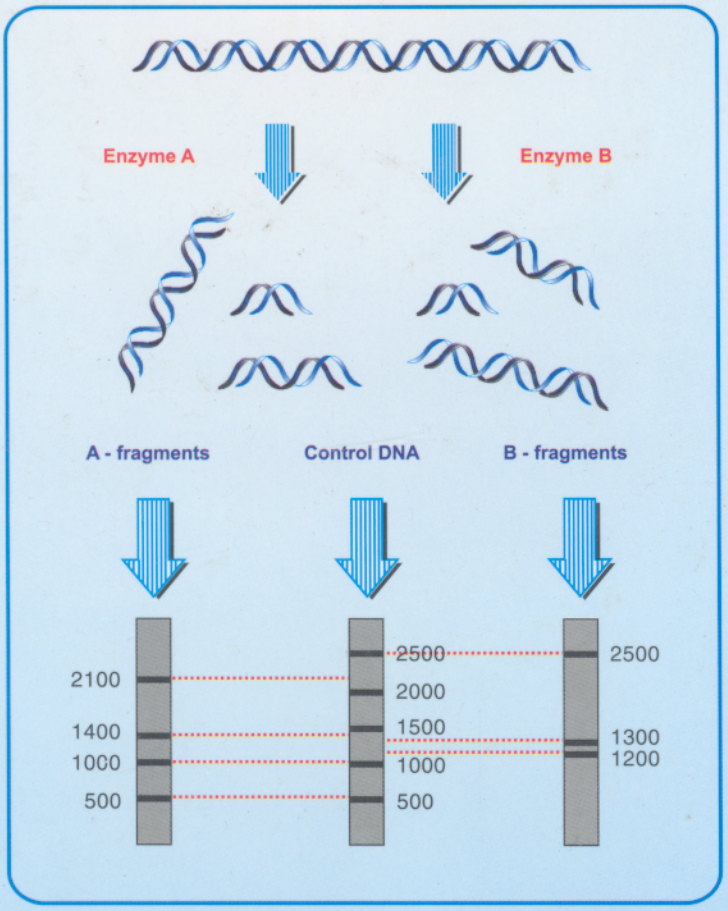
NGUYỄN THỊ LANG

# PHƯƠNG PHÁP CƠ BẢN TRONG NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SINH HỌC




NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

Nguyễn Thị Lang

# PHƯƠNG PHÁP CƠ BẢN TRONG NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
TP. Hồ Chí Minh - 2002

# Lời giới thiệu

*Công nghệ sinh học giúp cải tiến cây trồng và vật nuôi thông qua các phương pháp phân tích genome, xác định vị trí các gen trên bản đồ di truyền, xác định vị trí của marker liên kết với gen. Thông qua các bước trên chúng ta phải nắm vững các nguyên lý cơ bản của định luật Mendel trong di truyền, tính toán hệ số di truyền, để từ đó chọn quần thể xây dựng bản đồ di truyền. Một khối lượng DNA rất ít cần phải khuyếch đại với khối lượng DNA đủ cho sản phẩm hoạt động thông qua kỹ thuật cơ bản PCR (polymerase chain reaction). Trước hết, người ta phải thiết kế các primer, thông qua các bài toán về sự liên kết gen và chuỗi ký tự của marker. Gen mục tiêu sẽ được nhân bản vô tính bằng kỹ thuật "cloning". Ngân hàng gen DNA sẽ cung cấp thứ tự chuỗi mã di truyền (sequence) hoặc gen. DNA mục tiêu được gắn trong vectơ tạo nên thư viện DNA. Vectơ như là chiếc xe chở các DNA mục tiêu đưa vào tế bào chủ. Bước tiếp theo người ta phải ly trích được gen và đưa gen vào sinh vật lạ thông qua kỹ thuật chuyển gen. Công nghệ tái tổ hợp DNA là bước cơ bản trong nghiên cứu. Công nghệ tế bào là cầu nối tiếp cho công nghệ gen. Sự hợp nhất của gen lạ vào genome cây trồng là một tiến trình rất phức tạp. Việc xét nghiệm sự thể hiện của gen không chỉ dừng lại kỹ thuật PCR mà còn yêu cầu lai DNA-DNA, hoặc RNA - DNA, thông qua kỹ thuật Southern Blot, Norther Blot và Western Blot. Công nghệ gen hay công nghệ tái tổ hợp DNA trở thành nội dung nghiên cứu có tính chất then chốt trong sinh học phân tử.*

*Quyển sách này giới thiệu một số phương pháp cơ bản của công nghệ sinh học trong phòng thí nghiệm, áp dụng trong các lĩnh vực sinh học, di truyền, chăn nuôi, chọn giống, và y học, tiến hành thí nghiệm có cơ sở theo các bước tuần tự, để rút ngắn thời gian trong nghiên cứu và có kết quả mong muốn. Quyển sách này có thể hữu ích đối với cán bộ nghiên cứu và giảng dạy về các ngành di truyền, chọn giống, công nghệ sinh học và các ngành có liên quan.*

*Tác giả*

# MỤC LỤC

***

*Trang*

# 1. CẤU TRÚC HÓA HỌC CỦA DNA

**1.1. Mở đầu**

Cấu trúc xoắn kép của DNA theo Watson và Crick .1953 hình (1.1). Nucleotid có ba thành phần

i. Đường pentose ( deoxyribose )

ii. Base (bốn base: A, T, C, G)

iii. Acid phosphoric

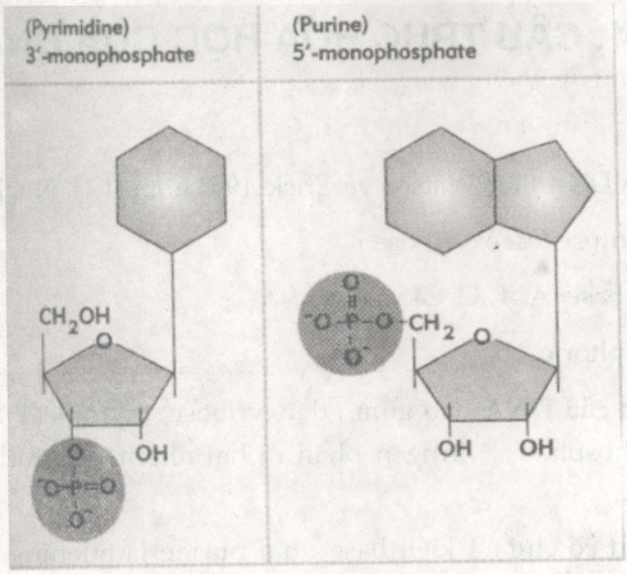
**1.2. Cấu trúc hóa học của DNA bao gồm** : deoxyribose, thymine(T), adenine (A), guanine (G), cytosine(C) và phosphate. Nitrogen phân ra hai nhóm pyrimidine và purine (hình 1.2)

Mỗi nucleic acid có chứa 4 kiểu base : hai purine là adenine và guanine hiện diện trong cả DNA và RNA

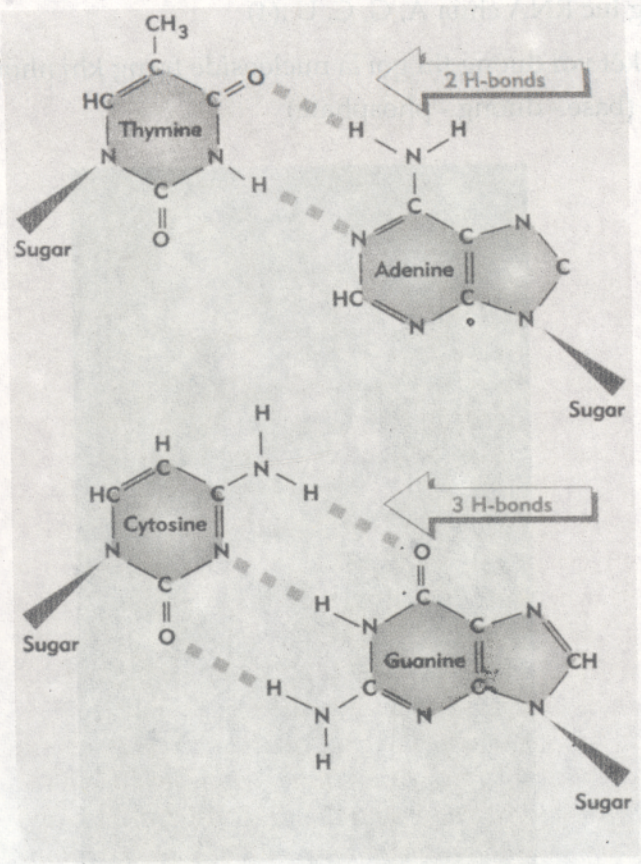
Pyrimidine trong DNA là thymine chuyển thành Uracil trong RNA, như vậy DNA chứa : A,G,C,T trong lúc RNA chứa A, G, C, U .(4)

Một base liên kết với đường thì gọi là nucleoside trong khi nhóm phosphate thêm vào thì gọi là nucleotide (base - đường - phosphate)

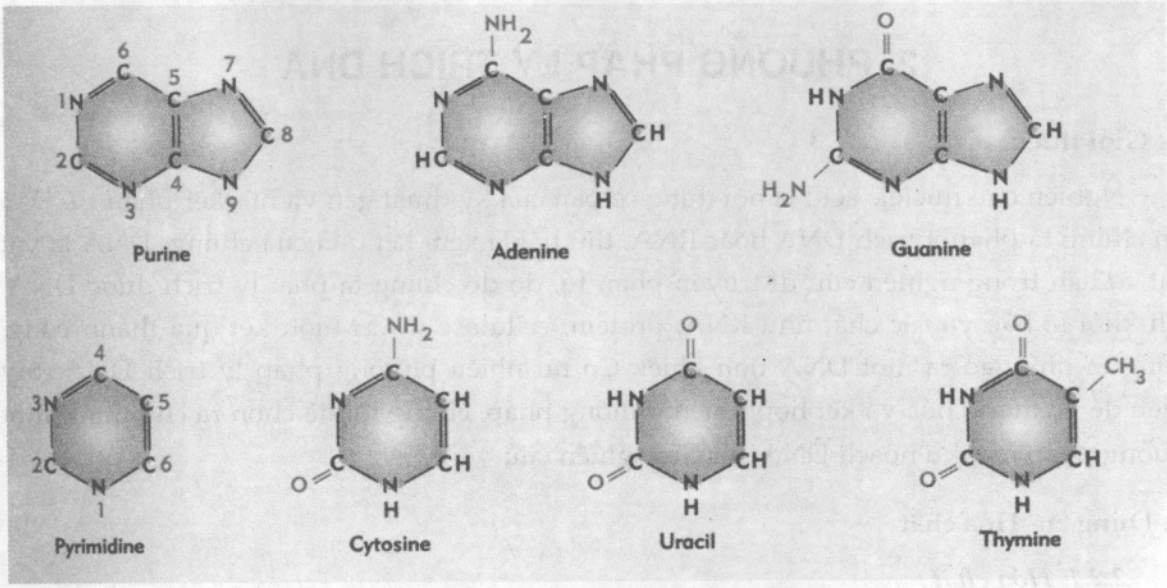
*Hình 1.1: Cấu trúc xoắn của DNA*




*Hình 1.2: Nhóm : pyrimidine và purine*




*Hình 1.3: Liên kết giữa A và T là 2 cầu nối hydrogen, trong khi G và C là 3 cầu nối*




*Hình 1.4: Các base trong DNA và RNA*

## Tài liệu tham khảo

Watson , J.D. and crick, F.H.C ( 1953) nature 171,946

3. Di chuyển ống nghiệm ra khỏi dung dịch nước ấm. Thêm vào 20ml chloroform và isoamyl alcohol : với nồng độ 24:1 (chloroform: isoamyl alcohol)

4. Ly tâm trong 30 phút với nhiệt độ 4°C và tốc độ 3000rpm

5. Chuyển supernatant ( phần trên ống nghiệm ) sang một ống nghiệm khác với thể tích 50ml và dùng một giấy lọc đặc biệt để lọc.

6. Sau khi lọc xong thêm vào 20ml isopropyl alcohol, trộn và đảo nhiều lần cho đều. Ủ dung dịch ở nhiệt độ lạnh - 20°C trong một giờ, nếu cần thiết có thể qua đêm.

7. Ly tâm 30 phút với nhiệt độ 4°C và tốc độ 3000rpm

8. Đổ bỏ supernatant, chỉ giữ pellet, rửa sạch pellet với cồn 70%. Phơi khô pellet với nhiệt độ trong phòng. Hòa tan nucleic acid với 5µlTE.

9. Thêm vào 5 µl RNAse (10mg/ml) và ủ nhiệt độ 37°C trong 30 phút.

10. Thêm vào 1/10 thể tích với 3M NaAc (tương đương 500µl và 10-11ml cồn. Ủ nhiệt độ - 20°C trong 1 giờ (hoặc lâu hơn qua đêm)

11. Giai đoạn thu DNA : giai đoạn này có hai phương pháp :

a/ Dùng ống cong pipette móc lấy DNA. Rửa DNA với cồn 70%. Phơi khô DNA. Chuyển DNA sang một ống nghiệm khác. Ly tâm 30 giây. Hòa tan dung dịch trong 500µlTE.

b/ Ly tâm ở tốc độ 3000rpm trong 30 phút, rửa sạch với 70% cồn. Hòa tan dung dịch trong 500µlTE.

Phản ứng và dung dịch cần cho ly trích DNA

**CTAB, 1 lít dung dịch ly trích DNA**

CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, a.k.a. hexadodecyltrimethylammonium bromide)

Thành phần: Pha cho một lít dung dịch

| Thành phần | Nồng độ | Ghi chú |
|---|---|---|
| CTAB | 20g | |
| NaCl | 81.82g | |
| 1M Tris | 100ml | pH = 8 |
| B-Mercaaptoethanol | 20µl/20ml | Khi sử dụng |
| Nước cất | | |

*Chú ý pha dung dịch để nhiệt độ trong phòng*

**$CHCl_3$: IAA, 1 lít**

960ml $CHCl_3$ (chloroform)
40ml IAA (isoamyl alcohol)

**3M NaAc, 0,5 lít**

123,1g Na Acetate
400ml dd $H_2O$
pH = 6,0
Thể tích 500ml nước cất

**TE, 1 lít**

10ml 1M Tris với pH = 8
2ml 0,5M EDTA, pH = 8
988ml nước cất

**10mg/ml RNAse**

10mg RNAse
Hòa trong 9833,3µl nước cất
100µl 1M Tris-Cl, pH = 7,5 (Nồng độ 10mM) yà 66,7µl NaCl (nồng độ 15mM)

**Dung dịch : 1XTAE**

40ml TAE
1960ml dung dịch nước cất

50XTAE

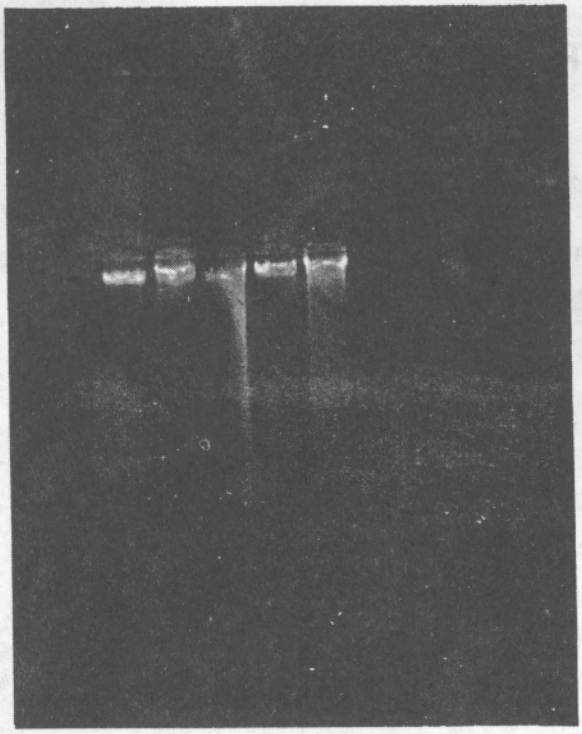
| | 500ml | 1l | 2l |
|---|---|---|---|
| Tris base 2M | 121g | 242g | 484g |
| DD $H_20$ | 250ml | 500ml | 1000ml |
| Glacial acetic | 28.6ml | 57.1ml | 114.2ml |
| EDTA, 0.5M, pH8 | 50ml | 100ml | 200ml |

*Chú ý thanh trùng*

**10X Stop/Load**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Nồng độ | 50ml | | |
| Dung dịch nước | 24ml | | |
| 500mlEDTA | 10mM | 1ml | |
| Bromophenol blue | 0.05% | 25mg | |
| Xylene cyanole | 0.05% | 5mg | 25mg |
| Glycerol | 50% | 25ml | |

Dung dịch giữ nhiệt độ - 20°C



*Hình 2.1.*

# 3. PHƯƠNG PHÁP LÀM AGAROSE GEL

## 3.1. Mở đầu

Sau ly trích DNA thì việc nấu gel để thử DNA hoặc chạy DNA là rất cần thiết, tùy đối tượng marker mà chọn gel. Trong phương pháp này chúng tôi giới thiệu agarose gel để phục vụ cho kiểm tra chất lượng DNA.

## 3.2. Dụng cụ- Hóa chất

### *3.2.1. Hóa chất :*

Agarose
Trizma base
Acid acetic glacial
EDTA
Bromophenol blue
Xylene cyanole
Glycerol
Ethidium bromide

### *3.2.2. Dụng cụ :*

1 nồi nấu
1 bình tam giác
Chuẩn pH

Agarose gel thường dùng cho điện di ngang

Điện di ngang với agarose gel : dùng thể kiểm tra chất lượng DNA, RNA hoặc protein

Phương pháp làm Agarose gel với điện di ngang : Tùy theo thể tích của điện di mà đổ dung dịch gel cho phù hợp. Trong bài này chúng tôi dùng gel lớn với kích thước gel 20-30cm. Mẫu có 24-36 giếng.

Cách làm : tùy theo tính chất của thí nghiệm mà chúng ta sẽ pha nồng độ cho đúng. Đối với nội dung kiểm tra chất lượng DNA, nồng độ gel chỉ cần 0,8%. Trong trường hợp kiểm tra RAPD, cần 1,6%. Đối với STS marker cần 1-1,2%. Đối với SSR cần 3-5% (tùy vào chất lượng agarose).

Như vậy nếu thể tích dung dịch là 250ml 1XTAE thì cần trọng lượng agarose như sau:

| Đối tượng thí nghiệm | Gel% | Agarose(g) |
|---|---|---|
| Chất lượng DNA | 0,8 | 2,0 |
| STS marker | 1,0 | 2,5 |
| RAPD marker | 1,6 | 4,0 |
| SSR | 3,0 | 7,5 |

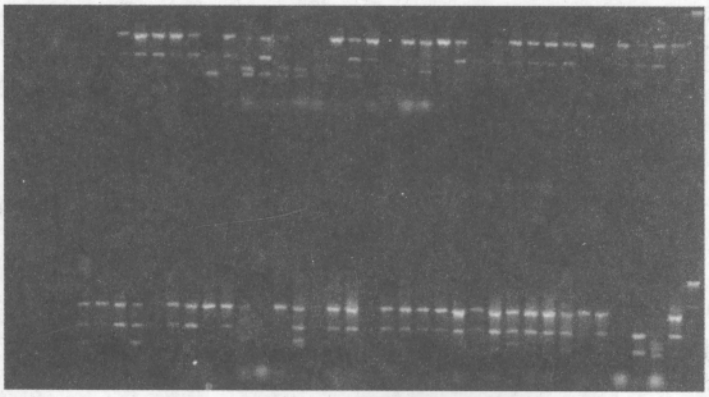
### 3.3. Các giai đoạn tiến hành

1. 250ml 1XTAE vào bình tam giác, cân nồng độ agarose bỏ vào bình
2. Đặt bình dung dịch vào microwave và đun sôi trong 6 phút. Chú ý chờ cho agarose tan ra hoàn toàn.
3. Để agarose nguội khoảng 65°C.
4. Thêm vào gel khoảng 5µl ethidium bromide (EtBr).

*Chú ý:* EtBr rất độc (gây ung thư da) do đó phải mang găng tay khi sử dụng hóa chất này.

5. Đổ gel vào khay dựng gel. Cẩn thận tránh bọt khí. Đặt lượt trước khi đổ gel vào khay. Để cho gel nguội khoảng 1 giờ.
6. Di chuyển hai đầu ( tape) ra khỏi gel
7. Đặt khay gel trong hộp điện di và đổ đầy 1XTAE, ngập gel. Cẩn thận rút lượt ra khỏi gel. Tránh làm bể gel và làm hư giếng.
8. Chuyển mẫu DNA vào các giếng (loading)
9. Đậy nắp gel và cho chạy điện di. Dòng điện cung cấp : 100 vol, 100mA. Chạy gel trong 2-3 giờ. Khi phẩm màu bromophenol blue di chuyển khoảng 3/4 khoảng cách trên từ giếng, tắt điện, lấy gel ra khỏi hộp điện di.
10. Chụp ảnh dưới tia UV.

Kết quả như hình 3.1.



*Hình 3.1: Agarose gel được nấu với nồng độ 1,2%*

# 4. PHƯƠNG PHÁP LY TRÍCH DNA (MINI DNA)

## 4.1. Mở đầu

Trong trường hợp cần một lượng DNA không nhiều phục vụ cho PCR thì việc ly trích theo kiểu mini tiết kiệm thời gian, hóa chất mà đảm bảo chất lượng DNA phục vụ cho nghiên cứu.

## 4.2. Dụng cụ- Hóa chất

### *4.2.1. Hóa chất :*

Chloroform

Cồn

Trizma base

Potassium chloride

Megnesium chloride

### *4.2.2. Dụng cụ :*

1 máy ly tâm

1 cối nghiền DNA

ống nghiệm : 1,5ml

Tube xanh

Máy đo pH

Dụng cụ đựng đá

Phương pháp ly trích DNA với số lượng ít (hay còn gọi mini extract DNA) không cần nitrogen lỏng.

Với phương pháp này lượng DNA đủ để thí nghiệm cho phương pháp PCR : như phương pháp phân tích STS marker, RAPD marker, SSR marker

## 4.3. Phương pháp

1. Ly trích DNA từ lá
2. Chọn và thu mẫu lá, chọn lá khỏe, non (2cm) đặt vào tube và ghi nhãn cẩn thận. Đậy tube và đặt tube vào thùng đá giữ lạnh.
3. Trong phòng, cắt lá nhỏ và đặt lá vào đĩa (Spot test)
4. Cộng vào 400µl DNA extraction buffer. Nghiền các mô lá với đũa thủy tinh. Dụng cụ này phải lau sạch trước và sau khi dùng.

5. Nghiền đến khi buffer có màu xanh (đây là dấu hiệu tế bào bị phá vỡ và phóng thích ra diệp lục)

6. Cộng thêm 400µl DNA extraction buffer. Trộn và chuyển 400µl vào một tube với thể tích 1.5 ml đã được ghi nhãn với số cây.

7. Cộng thêm 400µl chloroform. Trộn cẩn thận và khéo léo. Đặt tube này vào ly tâm (microcentrifuge) khoảng 30 sec. Chuyển dung dịch bên trên sang một tube (thể tích 1.5ml) và ghi nhãn với số cây thí nghiệm. Giai đoạn này cần sự cẩn thận để tránh sự trộn lẫn dung dịch bên đáy của tube.

8. Thêm vào 800 µl 100% ethanol (cồn) và trộn cho tốt. Ly tâm trong thời gian 3-5 phút. Đổ bỏ supernatant.

9. Rửa pellet với cồn và phơi khô DNA.

10. Hòa DNA vào 50µl TE. Giữ ở nhiệt độ -20°C

11. Dùng khoảng 1µl DNA cho một phản ứng/ PCR .

Phản ứng và dung dịch

Chất để ly trích DNA

| Thành phần | Nồng độ | 5ml |
|---|---|---|
| Tris (pH 8.0) | 50mM | 0.25ml |
| EDTA (pH 8.0) | 25mM | 0.25ml |
| NaCl | 300mM | 0.3ml |
| SDS | 1% | 0.5ml |
| $H_2O$ | | 3.7ml |

TE buffer (pH 8.0)

| Thành phần | Nồng độ | 50ml |
|---|---|---|
| Tris (pH 8.0) | 10mM | 0.5ml |
| EDTA (pH 8.0) | 0.5M | 0.1ml |
| $H_2O$ | | 49.4ml |

# 5. ĐÁNH GIÁ SỐ LƯỢNG DNA

**5.1. Giới thiệu**

Có hai phương pháp dành để đánh giá số lượng DNA :

1. Đo trực tiếp bằng máy đo (UV spectrophotometry)
2. Đánh giá bằng điện di (gel agarose)

**5.2. Đo trực tiếp bằng máy đo (UV spectrophotometry)**

***Phương pháp***

* Giới thiệu đánh giá số lượng DNA bằng máy soi màu (UV spectrophotometry)

1. Mở máy, chú ý đợi đèn báo hiệu và chờ nóng máy 30 phút.
2. Mở bước sóng. Thường thì đo độ dài sóng 260 và 280 nm
3. Rửa sạch ống nghiệm bằng nước cất. Chú ý đừng để chất lỏng trong ống nghiệm rơi xuống kính. Nếu ống nghiệm cần rửa sạch : rửa sạch bằng 1M HCl rửa vài lần xong, rửa lại bằng nước cất. Rửa tiếp với cồn 70% và sau đó phơi khô. Dùng giấy mềm lau khô.
4. Đổ đầy nước cất vào ống nghiệm (990µl). Đặt vào máy soi màu, đậy nắp máy lại
5. Nhấn nút để đo
6. Lấy ống nghiệm ra khỏi máy
7. Lấy 10µl mẫu DNA mà mình muốn đo pha với 990µl nước cất
8. Đặt mẫu vào máy để đo
9. Nhấn máy để đọc số trên máy
10. Nếu có máy in. Tự động máy sẽ in trên giấy
11. Lấy mẫu ra và rửa sạch với nước vài lần và cồn 70%. Lau khô
12. Lặp lại vài lần nếu cần thiết.
13. Khi đọc xong số liệu. Tắt đèn và máy
14. Tính toán nồng độ. Có một số máy tính toán tự động trên máy. Tuy nhiên nhiều máy chúng ta cần tính toán tiếp. Cách tính này theo sau:

Thí dụ: Nồng độ = (Mẫu A 260- Blank A260)* (50µg/ml)* (1/yếu tố pha)

Thí dụ yếu tố pha là 10µl/1000µl thể tích = 1/100

Do đó : Như thí dụ Nồng độ = (Mẫu A 260- Blank A260)* (50µg/ml)*(100)

15. Kiểm tí lệ là A260/A280. Giá trị này sẽ cho tinh khiết DNA theo thứ tự là 1.8 đến 2.0.

### 5.3. Đánh giá DNA bằng phương pháp điện di

Đối với một vài phương pháp như PCR based markers, chúng ta biết một số mẫu nồng độ khác nhau. Chúng ta có thể dùng phương pháp này để kiểm tra chất lượng DNA. Nếu DNA hiện diện trên gel không rõ chúng ta có thể chọn lọc hoặc ly trích lại DNA khi nào đủ mới tiến hành thí nghiệm. Đối với RFLP và AFLP chúng ta cần lượng enzyme để cắt chúng, do đó dựa trên enzyme phân cắt chúng ta có thể đánh giá số lượng DNA.

***Các bước tiến hành***

1. Chuẩn bị gel agarose
2. Chuẩn bị mẫu DNA cho loading: dùng parafilm để đặt DNA lên (khoảng 5-10 µl DNA cho một mẫu ) + 4µl dung dịch nhuộm.
3. Đầu tiên đặt mẫu DNA chuẩn: mẫu DNA chuẩn sẽ dùng cho thí nghiệm là 0,5X, 1X và 2X (5, 10 và 20 µl theo thứ tự của 0,5µg/µl). Ba mẫu chuẩn này đặt bên cạnh các mẫu thí nghiệm để dễ dàng so sánh kết quả.
4. Chạy điện di và chụp ảnh
5. Dựa trên band hình xuất hiện DNA, đánh giá số lượng DNA
6. Pha dung dịch DNA bằng dung dịch TE

# 6. PHƯƠNG PHÁP CHỤP HÌNH GEL

## 6.1. Giới thiệu

Để thấy được DNA, gel được nhuộm Ethidium bromide (EtBr). Gel được khuyếch đại thông qua UV transilluminator. Với phương pháp này chúng ta cần film để chụp. Hiện nay với công nghệ thông tin hiện đại. Máy chụp được qua một hệ thống gọi là gel document, nhờ máy vi tính điều chỉnh thông qua phần mềm chuyên dụng. Với phương pháp này, người ta in trực tiếp và lưu vào đĩa, giảm được tiền mua phim.

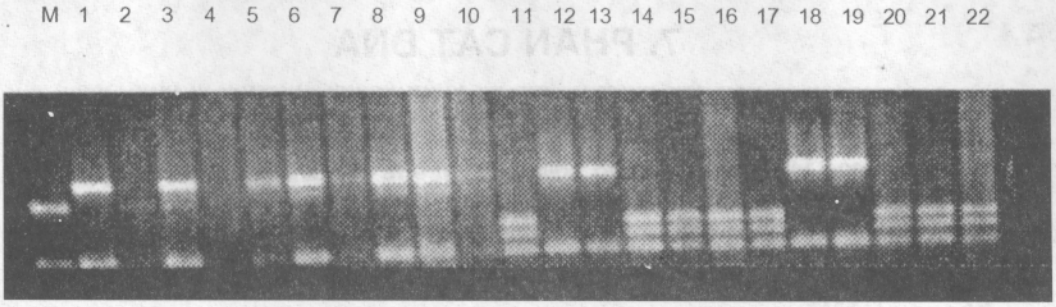
## 6.2. Phương pháp

Hệ thống máy chụp đặt trong phòng tối.

1. Để gel trên UV transilluminator. Chú ý cẩn thận tránh bọt khí. Tốt nhất lấy giấy mềm thấm bớt nước
2. Đặt phim vào máy chụp
3. Điều chỉnh máy chụp hình, tập trung ánh vào vị trí trung tâm và chỉnh hình cho rõ nét. Lúc này dùng hệ thống đèn sáng để chỉnh hình
4. Tắt hệ thống đèn. Mở đèn UV. Lúc này phải mang kính bảo hộ để tránh tia UV, ảnh hưởng mắt và da. Tay nhẹ nhàng di chuyển ống kính để điều chỉnh hình cho sắc nét . Sau khi hình vào tụ điểm, chỉnh hình.
5. Bấm máy. Tắt hệ thống đèn UV
6. Cẩn thận rút phim ra khỏi máy
7. Đợi 45 giây, xong bỏ giấy bao trên hình. Ta có hình như mong muốn (hình 6.1)

Chú ý, máy dễ bị dơ do phim chụp nhiều hoặc phim cũ, hệ thống càng bẩn chụp sẽ rất khó in hình. Do đó cần phải tháo máy ra lau chùi bằng cồn 70%.

8. Sau khi chụp xong, bỏ gel vào thùng chứa, lau sạch bàn.



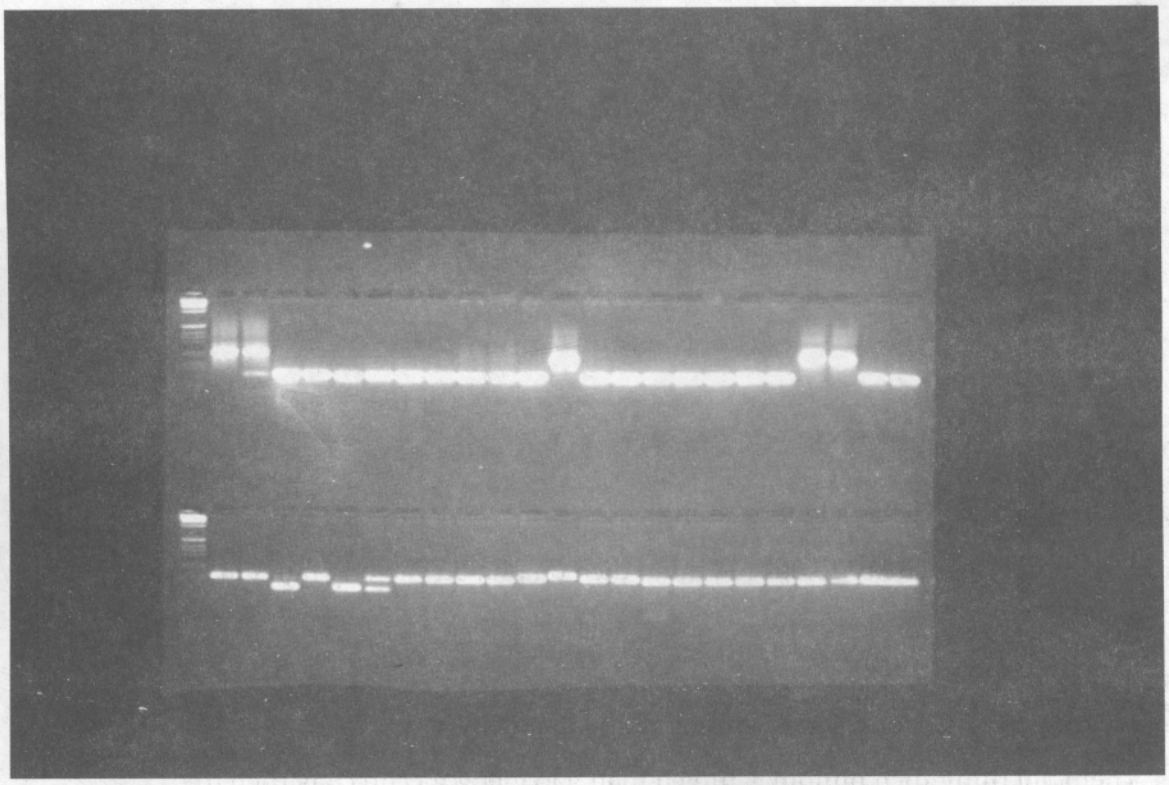

*Hình 6.1: Sản phẩm PCR chụp trên tia UV*

## 6.3. Chụp ảnh trên gel document

Trường hợp dùng hệ thống gel document. Hình ảnh sẽ hiện ngay sau khi đặt trong buồng tối. Đặt gel vào buồng tối. Điều chỉnh máy chụp hình

Có thể thông qua hệ thống vi tính điều chỉnh hình sắc nét trước khi chụp ảnh.Có máy in trực tiếp. Thông qua hình ảnh lưu trữ vào đĩa lâu dài.

Thí dụ : Hình 6.2 là hình ảnh chụp thông qua hệ gel document



*Hình 6.2: Gel được chụp qua hệ thống gel document*

# 7. PHÂN CẮT DNA

## 7.1. Giới thiệu

Tùy theo thí nghiệm chúng ta có thể cắt DNA ra nhiều mảnh nhỏ

Phân cắt DNA phục vụ cho RFLP

Genomic DNA

Nếu DNA dùng cho thí nghiệm RFLP thì chúng ta phải dùng enzyme để phân cắt chúng. Do đó phải cần một lượng lớn DNA để phân cắt. Tất nhiên tùy thuộc vào mỗi loại enzyme khác nhau mà phản ứng với DNA cắt mau hay chậm.

## 7.2. Phương pháp thực hiện

1. Enzyme là chất dễ mẫn cảm với nhiệt độ, do đó phải luôn luôn giữ enzyme trong đá khi sử dụng
2. Chuẩn bị ghi nhãn các ống nghiệm cho từng mẫu DNA
3. Chuyển 10µl mẫu DNA (1µg/µl hoặc 10µg) vào ống nghiệm đã ghi nhãn
4. Pha dung dịch với thành phần như sau

| Thành phần | Nồng độ stock | µl/mẫu |
|---|---|---|
| Nước cất | | 10,5 |
| TE | 10X | 2,5 |
| Enzyme | 10U/µl | 2 |
| DNA | | |
| Tổng số | | 15µl |

5. Trộn đều dung dịch và ly tâm chúng
6. Dùng pipette man lấy 15.0µl của dung dịch đã pha bỏ vào ống nghiệm có chứa 10µl DNA
7. Trộn đều ống nghiệm
8. Ủ nhiệt độ 37°C trong 4 giờ. Thường thì để qua đêm
9. Thêm 5µl dung dịch nhuộm. Chuyển mẫu vào giếng và cho chạy điện di
10. Phân tích mẫu đã được chạy trên gel

***Phân cắt DNA phục vụ cho STS***

Khi sử dụng STS marker thường thì các primer xuất hiện đơn hình (monomorphism). Do đó muốn có dạng đa hình chúng ta cần phải phân cắt chúng bằng một số loại enzyme đặc biệt .

***Phương pháp thực hiện***

1. Enzyme là chất dễ mẫn cảm với nhiệt độ, do đó phải luôn luôn giữ enzyme trong đá trong lúc sử dụng

2. Chuẩn bị ghi nhãn các ống nghiệm cho từng mẫu DNA

3. Chuyển 10µl mẫu DNA (1µg/µl hoặc 10µg) vào ống nghiệm đã ghi nhãn

4. Pha dung dịch với thành phần như sau

| Thành phần | Nồng độ stock | µl/mẫu |
|---|---|---|
| Nước cất | | 7,9 |
| TE | 10X | 2,0 |
| Enzyme | 10U/µl | 0,1 |
| Tổng số | | 10µl |

5. Trộn đều dung dịch và ly tâm chúng

6. Dùng pipette man lấy 15.0µl của dung dịch đã pha bỏ vào ống nghiệm có chứa 10µl DNA

7. Trộn đều ống nghiệm

8. Ủ nhiệt độ 37°C trong 2 giờ. Thường thì để qua đêm

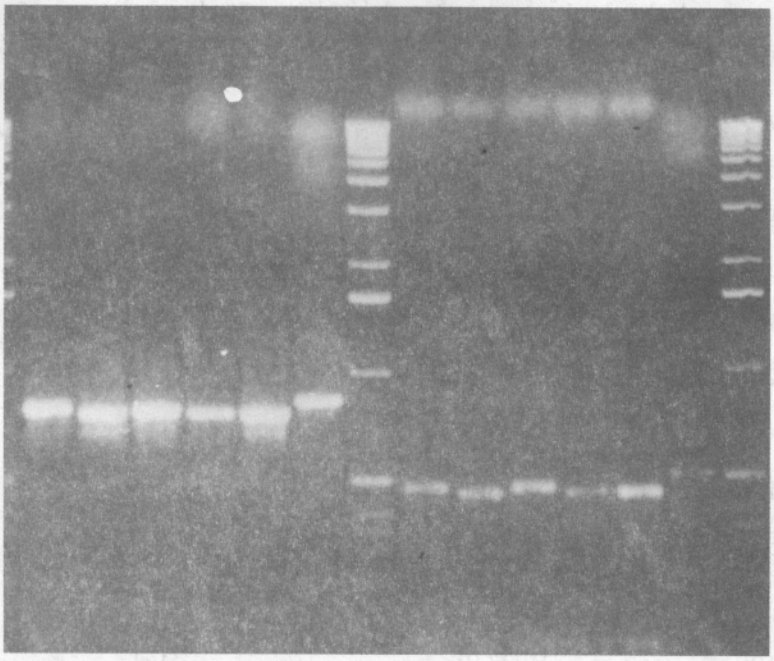
9. Thêm 5µl dung dịch nhuộm. Chuyển mẫu vào giếng và cho chạy điện di

10. Phân tích mẫu đã được chạy trên gel

Sau đây là một số thí dụ về DNA phân cắt và DNA chưa phân cắt

Thí dụ 1: DNA chưa phân cắt 1 alen

A B

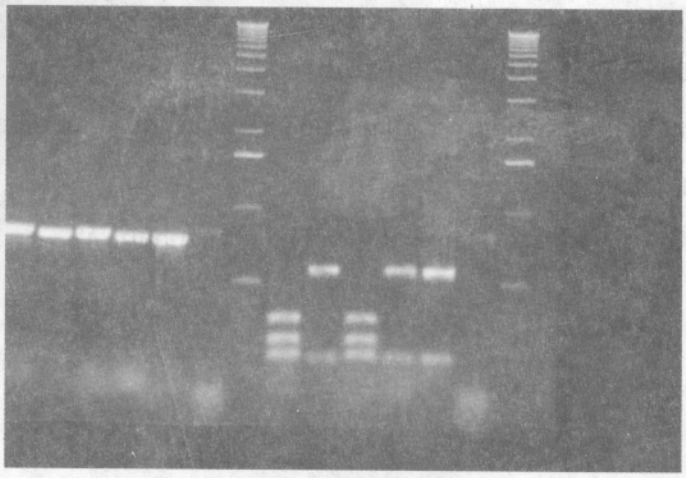


*Hình 7.1: DNA từ các giống lúa kháng rầy được phân cắt với Pvu II*

*A: Chưa phân cắt, B : Sau khi phân cắt*

Thí dụ 2: DNA phân cắt với 3 alen

A B



*Hình 7.2:DNA từ các giống lúa kháng rầy được phân cắt với HinfI*

*A: Chưa phân cắt, B : Sau khi phân cắt*

# 8. THÀNH PHẦN GEL, VÀ CHẠY ĐIỆN DI

## 8.1. Mở đầu

Tùy theo kích thước lớn nhỏ của acid nucleic mà ta dùng gel để tách trong điện di. Nếu khối lượng phân tử trung bình, dùng polyacrylamide gel, nếu phân tử to dùng polyacrylamide và agarose phối hợp .

Nếu kích thước phân tử rất lớn thì dùng agarose

## 8.2. Polyacrylamide gel

Polyacrylamide hình thành từ polymer hóa hợp chất vinyl của acrylamide monomers ($CH_2$ = CH-CO-$NH_2$) gắn vào chuỗi của polyacrylamide qua đường chéo và liên kết với N, N'- methylene bis-acrylamide ($CH_2$ = CH-CO-NH-$CH_2$-NH-CO-CH = $CH_2$).

Kết quả liên kết đường chéo ta có cấu trúc gel của polyacrylamide.

Chạy gel

Thông thường chạy gel cho phân tích nucleic acid đơn giản hơn là protein.

Sau đây là các dung dịch để chạy polyacrylamide và agarose gel

*Bảng 8.1:* **Dung dịch gel**

| Buffer | Chuẩn bị pha 10X stock cho 1 lít |
|---|---|
| TBE | 108,0 g Tris base, 55,0 g boric acid, 93 g EDTA, pH 8,2 |
| TAE | 48,4 g Tris base, 11,4 ml Glacial acetic acid, 20,0 ml 0,5M EDTA, pH 7,6 |
| TPE | 108,0 g Tris base, 15,5 ml 85% phosphoric acid, 40,0 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 |

*Bảng 8.2 :* **Mức tối thiểu cho nồng độ polyacrylamide khác nhau**

| Polyacrylamide (%) | Xếp thứ tự Ds DNA(bp) | SsDNA(n) | XC | BPB |
|---|---|---|---|---|
| 3,5 | 100-1000 | 750-200 | 450 | 100 |
| 5,0 | 75-500 | 200-1000 | 250 | 65 |
| 7,5 | 50-400 | 50-400 | 150 | 45 |
| 10,0 | 35-250 | | 70 | 20 |
| 15,0 | 20-150 | | 60 | 15 |
| 20,0 | 5-100 | | 45 | 12 |

*Bảng 8.3 :* **Thành phần phối hợp với polycrylamide gel (100ml)**

| Nồng độ (%) / Thành phần | 3,5 | 5,0 | 7.5 | 10 | 15 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Acrylamide(g) | 3,24 | 4,7 | 7,13 | 9,6 | 14,55 | 19,5 |
| Bis(g) | 0,26 | 0,3 | 0,37 | 0,4 | 0,45 | 0,5 |
| TEMED(ml) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Dungdịch pha stock 10X (ml) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Nước | 86,4 | 84,9 | 82,4 | 79,9 | 74,9 | 69,9 |
| Ammonium persulphate 10% (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

***Phương pháp chuẩn bị gel polyacrylamide***

1. Chuẩn bị số lượng gel cần, tùy theo kích thước khay đựng gel
2. Tính toán số lượng phản ứng cần theo bảng 8.3
3. Hòa số lượng acrylamide và Bis (chú ý mang găng tay vì hóa chất rất độc) vào trong nước buffer, thêm TEMED
4. Ngay tức khắc dùng ammonium persulphate trộn vào cho tốt
5. Ngay tức khắc dùng một ống bơm bơm vào miệng khay nhanh, tránh bọt khí
6. Đặt lược trên miệng khay
7. 30 phút sau, di chuyển lược ra khỏi miệng khay và chuẩn bị cho gel chạy điện di

***Phương pháp ứng dụng mẫu vào điện di***

Các loading buffer có thể dùng cho điện di agarose và polyacrylamide

*Bảng 8.4:* **Loading buffer**

| Buffer | Nồng độ |
|---|---|
| SBX | 40% sucrose, 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cynano |
| FBX | 15% ficoil 400, 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cynano |
| GBX | 30% glycerol, 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cynano |
| PAGE | 0,3% bromophenol blue, 0,3% xylene, 10mM EDTA in 80% Formamindecynano |

Chú ý trước khi chuyển mẫu DNA vào giếng của polyacrylamide gel, mẫu được làm nóng 100°C trong 5 phút, ngay tức khắc bỏ vào đá và loading trên gel.

# 9. PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI NẰM

## 9.1. Mở đầu

Agarose dùng để phân tách nucleic acid có kích thước lớn, thành phần trung bình của hydroynamic radii có thể là 30nm và khối xoắn DNA với trọng lượng phân tử là $10^8$, sử dụng một lượng 0,03% agarose. Tuy nhiên nồng độ có thể biến thiên trong khoảng 0,3-3,0%. Chạy điện di cũng tùy thuộc vào gel.

*Bảng 9.1:* **Nồng độ Agarose**

| Agarose (%) | Kích thước (kb) |
|---|---|
| 0,3 | 1,0 - 70 |
| 0,5 | 0,7 - 45 |
| 0,8 | 0,4 - 20 |
| 1,0 | 0,3 - 10 |
| 1,2 | 0,2 - 8 |
| 1,5 | 0,2 - 6 |
| 2,0 | 0,1 - 5 |

## 9.2. Phương pháp làm gel

Agarose gel dùng để chạy điện di nằm

Agarose (%) tùy theo marker sử dụng

TAE hoặc TBE

Đun và nấu gel từ 7-10 phút, chờ cho gel chín hoàn toàn, bằng cách nhìn vào gel, không đục, không lợn cợn

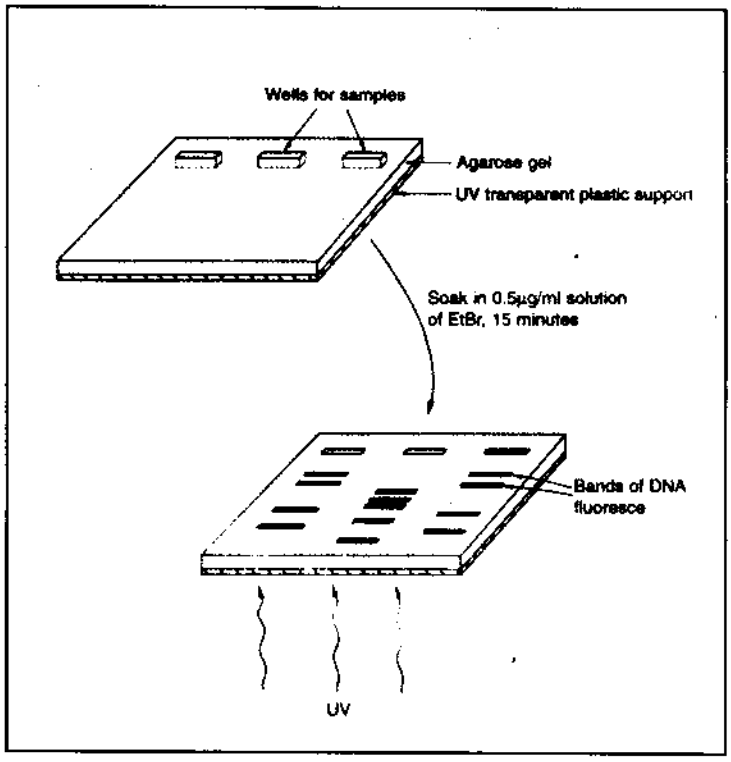
Đem ra để máy lắc cho nguội 65°C

Đổ vào gel

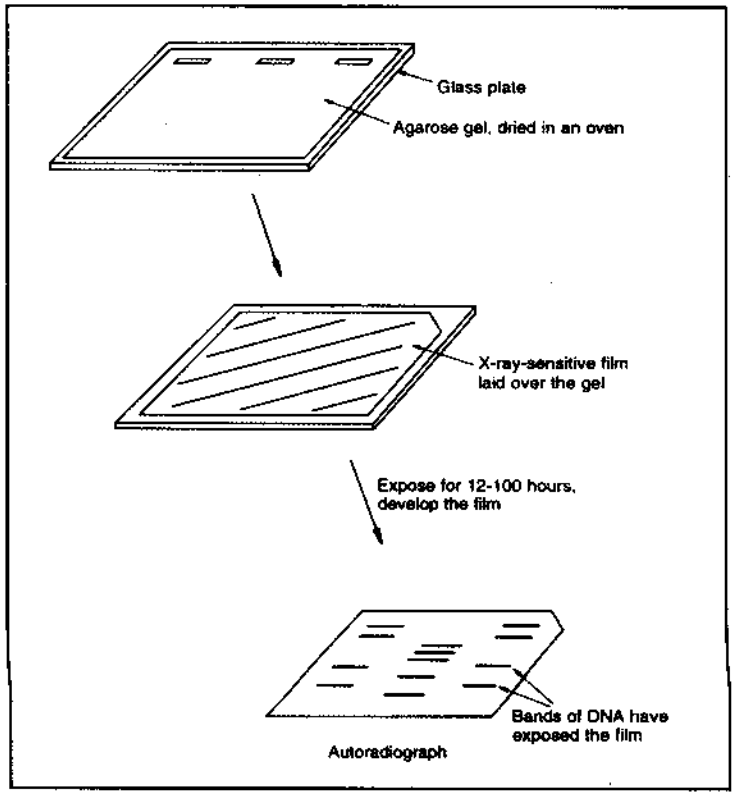
Chờ gel nguội, ( 2 giờ)

Chạy điện di

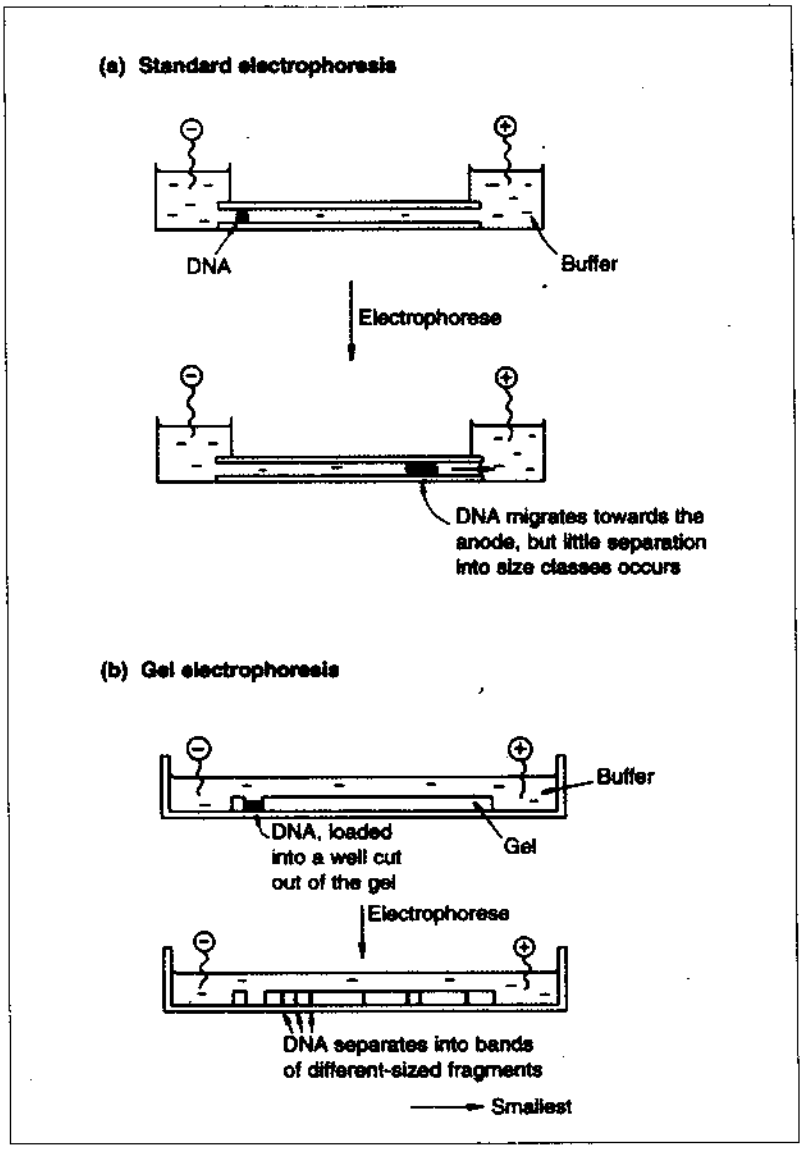
Một số hình ảnh minh họa (hình 9.1, 9.2, 9.3)




*Hình 9.1*




*Hình 9.2*




*Hình 9.3: Chạy điện di*

### 9.3. Chạy điện di

DNA sẽ đi từ cực âm sang dương, trọng lượng phân tử DNA nào nhẹ sẽ di chuyển xuống trước, nặng di chuyển chậm sẽ xuống sau, tạo thành dãy DNA có kích thước phân tử khác nhau. Chúng ta gọi đó là hiện tượng đa hình (polymoprphism)

Hoàn thành chạy điện di trong 2 giờ, lấy ra và chụp ảnh.

**Các hóa chất cần cho làm gel và chạy điện di**

Agarose

50X TAE (Trizma base)+ acid glacial acetic

EDTA (Disodium ethylenedia minetera acetate)

Ethidium bromide

***Dụng cụ***

Điện di

Nồi hấp vô trùng (oven)

Cân.

Tủ thanh trùng

Tủ lạnh

Máy đo pH

Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

# 10. PHƯƠNG PHÁP LY TRÍCH RNA

## 10.1. Giới thiệu

Ly trích RNA cần phải thực hiện trong môi trường vô trùng, vì có biết bao RNase tự do trong phòng lab, do đó trước khi ly trích cần phải khử trùng 180°C các dụng cụ ly trích. Mặc áo blouse, mang găng tay để bảo vệ mẫu RNA tinh khiết không lẫn tạp.

Nội dung quan trọng trong quá trình ly trích RNA là :

Phenol để di chuyển protein lạ và tách các nucleic acid.

Chloroform để di chuyển các RNA từ tế bào đồng gen và cuối cùng là giai đoạn ly trích thực sự.

mRNA có công dụng thiết lập thư viện cDNA.

## 10.2. Hóa chất cần thiết

1. Cồn
2. Chloroform
3. Nitơ lỏng
4. Isopropanol
5. NaCl
6. Tris pH 7,5
7. $MgCl_2$
8. SDS
9. DEPC (Diethyl pynpcarbonate)
10. Sodium acetac
11. Urê

Chạy điện di

12. Chuẩn bị 5X formaldehyde chạy gel
13. 0,1 MOPS (pH = 7,0)
14. 40mM Sodium Acetate
15. 5mM EDTA

*Dụng cụ*

Ly tâm lạnh

Cối

Pipepment

Giấy lọc

Điện di và các khay, lượt

Các dụng cụ cần thiết cho thí nghiệm

**10.3. Phương pháp 1**

1. Cân 2 g lá tươi và để vào nitơ lỏng
2. Nghiền trong cối cho bột lá màu xanh xuất hiện, thêm 20 ml phenol: chloroform: isoamyl alcohol (50:50:1)
3. Bỏ mẫu vào tube 50ml lắc 10 phút
4. Ly tâm với vận tốc 5000rpm trong 20 phút và thu supernatant, thêm chloroform : isoamyl alcohol và lắc trong 5 phút
5. Ly tâm với vận tốc 5000 rpm trong 20 phút
6. Thêm chloroform lần thứ hai
7. Thêm một lượng tương đương isopropanol và trộn vài lần, ủ trong nhiệt độ lạnh trong 20 phút
8. Kết tủa dung dịch và ly tâm ở vận tốc 500rpm trong 20 phút ở 4°C
9. Pellet trong 5ml TE và thêm 200 ml của 5M NaCl và 12,5 ml cồn lạnh, ủ trong đá 20 phút
10. Hòa tan dung dịch trong tube, thêm 0,25 thể tích 8M urê và trộn, cộng thêm 0,25 thể tích 10M $LiCl_2$ .Ủ qua đêm -20°C
11. Chọn RNA để ly tâm ở nhiệt độ 500rpm, trong vòng 20 phút, ở 4°C. Bỏ supernatant, chỉ lấy pellet và hòa tan trong 2ml TE . Tồn trự ở điều kiện -70°C.

**10.4. Phương pháp 2**

***Ly trích RNA thông tin (mRNA)***

1. Thu 2g lá tươi và nghiền trong nitơ lỏng
2. Chuyển bột lá vào ống tube 50 ml, thêm ngay tức khắc vào 15 ml lysis buffer (200mM NaCl, 200 mM Tris pH 7,5, 1,5mM $MgCl_2$ và 2% SDS) và ủ trong nhiệt độ 45°C trong 60 phút.

3. Mẫu được ly tâm ở 4000rpm trong 5 phút
4. NaCl được thêm vào (0,5M thêm 950µl của 5M NaCl stock). Trộn và đảo nhiều lần. Surpernatant (lysate) được bỏ 3-4 lần thông qua giấy lọc đặc biệt, để không còn DNA.Tế bào Oligo (dT) được thêm vào lysate cho phép trong 2 phút
5. Mẫu được lắc trong nhiệt độ trong phòng (60 phút) và ly tâm vận tốc 3000 rpm trong vòng 5 phút. Cẩn thận di chuyển oligo (dT) resin và rửa.

***Cách rửa***

1. Oligo (dT) được cột với buffer (500mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 7,5 trong DEPC (Diethyl pynpcarbonate), và ly tâm ở vận tốc 3000 rpm trong 5 phút.
2. Rửa nhiều lần với 10ml binding buffer
3. Sau khi rửa lấy 10ml salt buffer (250mM NaCl, 10mM Tris Cl pH 7,5) trong nghiệm thực rửa DEPC
4. Ly tâm và lặp lại ba lần

***Hòa tan***

1. Để RNase trong tube và thêm 20 µl elution buffer (10mM Tris Cl pH 7,5 trong DEPC)
2. Chọn RNA thông qua ly tâm 30 giây. Giai đoạn này thêm 200 µl elution buffer thêm một lần.
3. RNA được kết tủa trong 0,15 vol của 2M sodium acetac và 2,5 vol của 100% cồn
4. Mẫu được phơi khô trong đá (20 phút)
5. Ly tâm 15 phút với vận tốc 15.000rpm trong 4°C
6. Di chuyển cồn và còn lại mRNA trong 20 µl elution buffer. Mẫu dự trữ ở điều kiện -70°C.

**10.5. Phương pháp ba**

Ly trích RNA

↓

5g lá tươi + Nitơ lỏng

↓

Thêm 25ml buffer

↓

Chuyển sang tube

↓

Thêm 5ml 10% SDS + 2,5ml Na acetate + 25 ml (P=C+IAA)
Trộn đều

↓

Ủ trong phòng 15 phút

↓

Ly tâm tốc độ 7500rpm trong 20 phút

↓

0,8vol của Pronanal

↓

RNA trong 1 giờ

↓

Ly tâm tốc độ 7500rpm trong 20 phút

↓

Pellet được hòa DEPC

↓

6M $LiCl_2$ , 4°C qua đêm

↓

Ly tâm tốc độ 7500rpm trong 20 phút

↓

RNA rửa với 2M $LiCl_2$ + với 70% cồn

↓

Hòa DEPC → RNA

***Đo chất lượng RNA***

Chạy điện di để kiểm tra chất lượng RNA giống như DNA

1. Chuẩn bị 5X formaldehyde để chạy gel
2. 0,1 MOPS (pH = 7,0)
3. 40mM Sodium Acetate
4. 5mM EDTA

*Phương pháp*

1. Hòa 20,6 g của 3- (N- Morpholino) propane sulfonic acid (MOPS) trong 800ml của diethyl pryocarbonate (DEPC) với 50mM sodium Acetate, pH tới 7,0 với 2N NaOH
2. Thêm 10 ml DEPC nghiệm thức 0,5 M EDTA (pH = 8,0).
3. Rửa dung dịch qua tấm lọc với 0,2 micron Millipre filter và dếm trong phòng
4. Chuẩn bị agarose gel
5. Nấu gel để nguội 60°C thêm vào 5X formaldehyde và chạy, sau đó cho 1X formaldehyde với nồng độ 1X và 2,2X theo thứ tự (1 phần của stock 12,3 M formaldehyde hòa 3,5 phần agarose trong nước với tỉ lệ 1:1 của 5X formaldehyde)
6. Chuẩn bị mẫu để trộn :

Thành phần gồm

4,5µl RNA

2,0µl 5X formaldehyde buffer

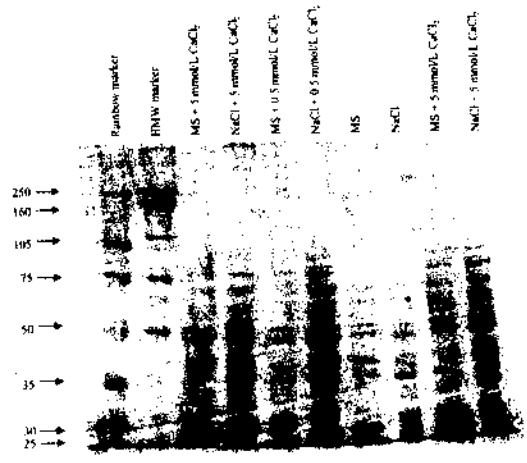
3,5 µl formaldehyde

10,0µl formamide

7. Ủ mẫu trong 15 phút ở 65°C, đặt mẫu ngay tức khắc vào đá
8. Ly tâm trong 2 sec
9. Trước khi loading mẫu vào gel chú ý dùng trọng lượng RNA được biết như 18S,28 S rRNA hoặc 9S b globin mRNA của thỏ. Kích thước 6333, 2366, 710nts. DNA marker (x/ Hind III) chuẩn bị để kiểm tra lại

* Chú ý tốc độ của DNA và RNA di chuyển khác nhau thông qua agarose gel có chứa formaldehyde, RNA di chuyển nhanh hơn.

11. Kết quả hình RNA được tách agarose gel (hình 10.1)




*Hình 10.1: RNA*

### 10.6. Ứng dụng

- Dùng mRNA để tổng hợp cDNA

Muốn thiết lập ngân hàng cDNA cần phải có lượng mRNA.Annamalai (1995) đã thiết kế hai ngân hàng gen cDNA từ cây cải dầu (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

- Dùng RNA phục vụ cho sao chép trong RT-PCR và nhân bản vô tính cho sản phẩm PCR

Người ta ứng dụng cách sao chép trên để tách các subclone của mía đường (Quintana, 1999), Bắp (Worrell và ctv 1991), Lúa (Valdez 1996).

**Tài liệu tham khảo**

Annamalai Padmana ban. 1995. Development of PCR based marker for heat tolerance and cloning of it related gene in Brassica oleracea var capitata. fila report, Jiscas : Vol 4: 67-88

Quintatana Maribel. 1999, Sucrose phosphate Synthase Gene Expression in Sugarcane.Final resport, JICAS vol : 8 :197-221

Padmana ban

Valdez- Alarcon, J.J Ferrando, M. Salerno, G. Jimenez- moraila, B and Herrera Estrella, L .1996. characterization of rice sucrose phosphate synthase encoding gene. Gene 170 (20, 2; 217-222)

Worrell, A, C. Bruneau, J.M. Sommerfelt, K. Boersing, M and Voelker, T.A. 1991. Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf partinitioning. The plant cell 3 : 1121-1130

# 11. PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ GEL TRONG ĐIỆN DI TÁCH RNA

## 11.1. Mở đầu

Người ta dùng agarose gel để tách chuỗi đơn DNA, bao gồm cả RNA, nhưng phải phân biệt hai phương pháp:

(1) Alkaline agarose để tách DNA,

(2) Glyoxal agarose để tách RNA và kể cả DNA.

## 11.2. Phương pháp

***Điện di Akaline agarose gel***

1. Chuẩn bị agarose gel với dung dịch sau : 50mM NaCl, 1mM EDTA (pH = 8)
2. Khi đặt gel để chạy cần ngâm trong dung dịch : 30mM NaOH, 1mM EDTA
3. Cồn để tạo sự kết tủa, lấy 10µl buffer (50mM NaOH, 1mM EDTA, 3% Ficoll 400, 0,025% bromocresol green, 0,025% xylene cyanole).
4. Chạy gel bình thường, dùng DNA có đánh dấu để phát hiện dưới tia pUV, Nếu DNA không được đánh dấu, người ta phải ngâm gel trong 1M TrisHCl pH = 7,6, 1,5M NaCl trong 45 phút và sau đó nhuộm với ethidium bromide

***Điện di Glyoxal agarose gel***

1. Khử ion với 6M 40% glyoxal và trộn đều
2. Lấy 19µg DNA hoặc RNA đặt trong 8µl của 1 M glyoxal, 50% dimethyl sulphaoxide 10mM sodium phosphate pH 7,0, đun 50°C trong 1 phút
3. Làm lạnh mẫu thêm vào 2µl loading buffer : LD = 10mM sodium phosphate pH = 7, 50% glycerol, 0,4% bromophenol blue
4. Load trên agarose gel và đựng trong 10mM Sodium phosphate pH 7,0
5. Chụp hình trên UV, chú ý nhuộm ethidium bromide 10 phút trước khi chụp. Băng hình sẽ thể hiện trên gel.

# 12. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG RNA

## 12.1. Giới thiệu

Đánh giá chất lượng RNA cũng giống như đánh giá chất lượng DNA. Điều quan trọng là phải chú ý RNA tinh khiết phục vụ cho nghiên cứu, nếu RNA bị tạp băng hình sẽ không tốt. Nếu chất lượng RNA đạt giá trị hơn 100ng là tốt, chạy trên mini agarose còn gọi là minigel trong điều kiện không có RNase. Băng xuất hiện gần mẫu giếng được xem như tạp.

## 12.2. Dụng cụ và hóa chất

Minigel

0,1M NaOH

TBE (A 10X stock chứa 55g Tris base, 55g acid boric, 40ml 0,5M EDTA, nước 1 lít)

Loading buffer (0% bromophenol blue, 60% glycerol)

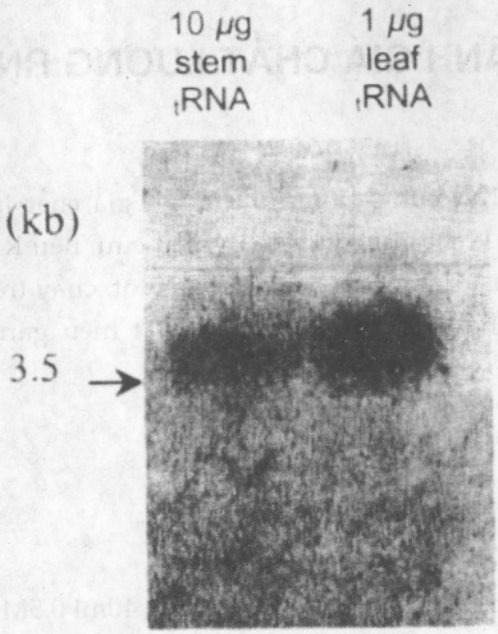
20% SDS

1mg/µl ethinium bromide

Agarose

## 12.3. Phương pháp

1. Các khay và lượt được nhúng trong 0,1 M Na0H (để hủy diệt RNA hoặc RNase), rửa hai lần với nước cất.
2. Chuẩn bị 0,8% agarose, nấu và để nguội với nhiệt độ 65°C
3. Đổ nhẹ từ từ ra khay, chú ý tránh bọt khí
4. Khi gel cứng, di chuyển lượt và khung chắn ra khỏi gel
5. Hòa mẫu RNA (1 - 2µg) trong 7µl nước, thêm vào 1µl 20% SDS và ủ trong 2 phút ở nhiệt độ 75°C hòa RNA,
6. Thêm 3µl loading buffer. Trộn mẫu
7. Chạy điện di với 50V
8. Sau khi hoàn thành gel nhuộm với ethidium bromide vào buffer 1µg/l. Nhuộm trong 10 phút
9. Chụp ảnh, và đánh giá




*Hình12.1: RNA trên agarose gel*

# 13. KỸ THUẬT LY TRÍCH PROTEIN

## 13.1. Giới thiệu

Protein có cấu trúc lớn, bao gồm amino acid nối với nhau bởi cầu nối peptide. Enzyme là protein và chúng là một protein đặc biệt trong cấu trúc. Protein có thể có một hoặc nhiều chuỗi polypeptide, với cấu trúc sơ cấp (primary), cấu trúc thứ cấp (secondary), cấu trúc tam cấp (tertiary) và cấu trúc tứ cấp (quaternary). Marker phân tử có thể chia ra hai nhóm : DNA marker và protein marker, trong nhóm protein có thể chia ra protein marker, isozymes, protein dự trữ. Tuy nhiên số marker từ protein còn nhiều hạn chế. Trong phương pháp này chúng tôi giới thiệu kỹ thuật ly trích protein với phương pháp được cải tiến từ nhiều phương pháp khác nhau.

## 13.2. Vật liệu

Nitơ lỏng

Tris HCl

EDTA (Disodium ethylenediaminetetra acetate)

DTT (dithiothreitol)

PMSF (Phenylmethyl Sulfonyl fluoride)

Glycerol

$MgCl_2$

KCl

SDS

Poly aromide

Bromophenol blue

2- mercaptoethanol

Sucrose

Cối

## 13.3. Phương pháp ly trích protein

***Phương pháp 1***

Một gram mẫu được nghiền trong cối, lọc và giấy lọc

Đưa vào dung dịch như sau (100mM / L Tris HCl, 4 M / L EDTA, 0,5 M/L DTT và 1 M /L PMSF).

Mẫu được chuyển sang ống tube 15ml và ly tâm với vận tốc là 500rpm ở 40°C trong 15 phút.

Bỏ pellets và supernatant được chuyển sang 50 ml tube cộng thêm 40 ml acetone

Ly tâm để loại bỏ EDTA, lipid và đường saccharid vv.

Ly tâm mẫu với vận tốc 5000 rpm ở 4°C trong 5 phút. Loại bỏ acetone, thêm vào 40ml acetone,

Chú ý thêm $(NH_4)_2SO_4$ để cho kết tủa

Loại bỏ acetone và lặp lại ba lần như trên để lấy pellet

Ly tâm mẫu với vận tốc 5000 rpm ở 4°C trong 10 phút.

Bỏ acetone vào và trộn đều

Pellet được chuyển vào 1,5ml aliquot và ly tâm ở 16.000 rpm 4ở 4°C trong 20 phút.

Loại bỏ acetone, giữ pellet trong tủ ấm 37°C trong 5 phút để phơi khô pellet

Bây giờ protein sẵn sàng cho nghiên cứu

***Phương pháp 2***

Mẫu được nghiền trong dung dịch nitơ lỏng

Để mẫu vào dung dịch buffer (0,2M Tris HCl pH 8,0, chứa 30mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 1 mM DTT, 1mM PMSF) và 19% glycerol để trong 1 giờ

Mẫu được votex rất kỹ

Ly tâm với tốc độ 20.000 rpm trong 20 phút

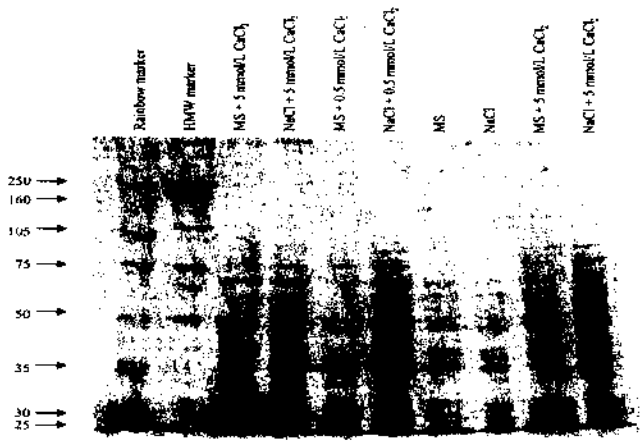
Lọc qua một giấy lọc và cho kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ ở 65% tới 100%,

Protein chuẩn bị đưa vào buffer (50mM tris HCl pH 8,0 có chứa 1mM EDTA - $Na_2$ với 0,2% 2- mercaptoethanol) trong 36 giờ và phơi khô bằng lyophilization và hòa tan trong 1ml buffer.

***Chạy điện di***

Loading buffer bao gồm (50mM Tris HCl, pH 8,0, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethethanol, 40 % sucrose, Bromophenol blue)

Thêm vào mẫu protein. Trộn đều, trước khi load phải đun sôi trong 5 phut




*Hình 13.1 : Các băng protein*

## 13.4. Ứng dụng protein trong nghiên cứu

Protein được nghiên cứu để đánh giá chất lượng cây trồng như gạo, đậu, bắp v.v. Ngoài ra còn đánh giá tính chịu mặn khác nhau thông qua phân tích protein (Fan shuguo, 1999)

### Tài liệu tham khảo

Fan Shuguo 1999. Protein analysis of salt tolerant suspension cultures of rice by supplemental calcium. Final repoted, JIRCAS, vol 8: 107-144.

# 14. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH RAPD

## 14.1. Khái niệm về RAPD marker

"RAPD" viết tắt từ chữ random amplified polymorphic DNA (RAPD). RAPD *là đoạn ngắn DNA sequence, do sự tổng hợp một cách ngẫu nhiên, giúp phân tích genome thông qua kỹ thuật phân tích di truyền phân tử là PCR.* Nhiều RAPD marker có thể chuyển đổi thành STS marker : thí dụ như F18F-R, BC19F-R, KO 05 F-R marker v.v..

Kỹ thuật DNA marker trên cơ sở vị trí được đánh dấu có tính chất mã di truyền, kỹ thuật này gia tăng thêm số marker trong quá trình xây dựng bản đồ liên kết gen, do khả năng nhận dạng đa hình cao. Cung cấp cho một vài bản đồ dựa trên RAPD như : Rầy nâu, gen lúa ưu thế lai v.v.. RAPD thành công trong khi tách được giống lúa nước và lúa cạn.

Kỹ thuật này đơn giản nhanh, cần một lượng nhỏ DNA. Nucleotides và sản phẩm được khuyếch đại của RAPD.

RAPD có hai nhược điểm: (1) nó cần có dữ liệu mã di truyền thích hợp đối với từng locus, (2) không ổn định. Tính chất quan trọng của vấn đề thứ hai - tần suất đa hình thấp - thay đổi ở mỗi locus và ở mỗi cặp lai cụ thể.

## 14.2. Phương pháp tiến hành

Các bước tiến hành như sau:

1. Các thành phần dung dịch dùng thường đặt trong tủ lạnh -20°C hoặc -80°C
2. Ghi nhãn cẩn thận trên ống nghiệm 0,5µl hoặc trên micro tap (một loại đặc biệt dùng để chạy mẫu PCR)
3. Chuyển 10,0µl của mẫu DNA vào ống nghiệm
4. Chuẩn bị pha dung dịch

| Thành phần | Pha nồng độ | Phản ứng cho nồng độ | µl/mẫu |
|---|---|---|---|
| Nước cất | | | 5,9 |
| PCR buffer | 10X | 1X | 2.0 |
| dNTP | 4mM | 200µM | 1,0 |
| Primer | 5µM | 250nM | 1,0 |
| Taq polymerase | 5U/µl | 0,5U | 0,1 |
| | | | 10.0µl |

5. Trộn đều và ly tâm

6. Dùng pipette lấy 10,0µl cho mỗi phản ứng trong ống nghiệm có chứa sẵn DNA

7. Lấy một giọt dầu (mineral oil) phủ trên dung dịch.

8. Ly tâm.

9. Đặt ống nghiệm vào máy PCR, đóng nắp máy và khởi hành cho máy hoạt động

10. Chu trình hoạt động của máy như sau:

| Chương trình | Kiểu | Giai đoạn 1 | | Giai đoạn 2 | | Giai đoạn 3 | | Số chu kỳ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Nhiệt độ | Thời gian | Nhiệt độ | Thời gian | Nhiệt độ | Thời gian | |
| 1 | | 94°C | 5 phút | | | | | |
| 2 | Chu kỳ | 94°C | 30 giây | 35-40°C | 30 giây | 72°C | 1 phút | 35 |
| 3 | | 72°C | 5 phút | | | | | |
| 4 | | 4°C | | | | | | |

11. Lấy mẫu ra khỏi máy, khi hoàn thành chu kỳ

12. Dự trữ nhiệt độ 4°C

13. Phân tích mẫu trên agarose gel

**14.3. Đo đếm và sắp xếp số liệu**

Số liệu từ phân tử RAPD marker sau khi hoàn thành sẽ được đo đếm như sau

Số liệu đo đếm để phục vụ cho xây dựng bản đồ gen

| | | |
|---|---|---|
| A | 1 | Bố mẹ là 1, với alen là codominant |
| H | 2 | Dị hợp tử |
| B | 3 | Bố mẹ là 2, với alen là codominant |
| C | 4 | Không có bố mẹ 2, là dominant |
| D | 5 | Không có bố mẹ 1, là dominant |
| - | 0 | Không có số liệu |

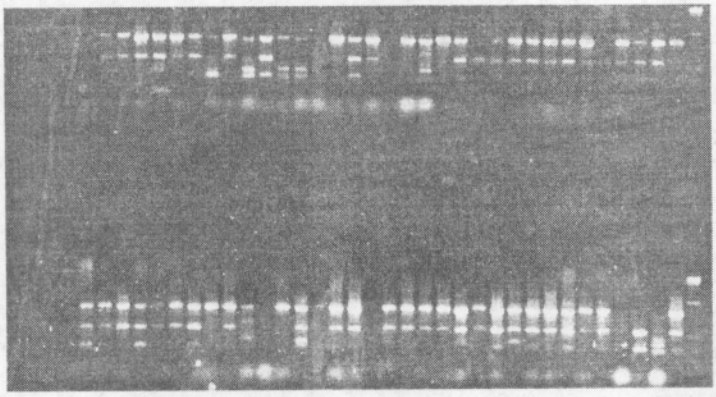
| | |
|---|---|
| Trong quần thể | Cho phép đo đếm |
| $F_2$ | Tất cá đều đo đếm |
| $BC_1F_1$ | Trong trường hợp này A hoặc H ở đây A là cha mẹ. |
| DH/RIL | Chỉ có A hoặc B. Không có dị hợp tử |

Một số kết quá thí nghiệm như sau :

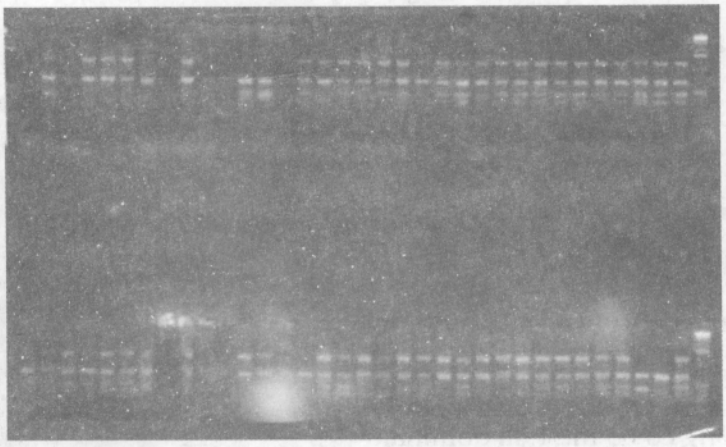
1. Thí dụ : Một trường hợp ta có RAPD từ phản ứng PCR mà không qua phân cắt DNA. Còn gọi là đơn hình (monomorphism).

Đa hình (Hình 14.1)

Chú ý hình ảnh cúa RAPD thường rất nhiều băng.



*Hình 14.1. RAPD A -11*



*Hình 14.2: RAPD với marker AC- 14 , được đánh giá trên lúa mùa Việt Nam*

## 14.4. Các dụng cụ và hóa chất dùng phân tích RAPD

*Các hóa chất cần thiết cho phân tích RAPD*

1. 1M Tris base
2. 1M KCl
3. *Taq* polymerase
4. Mineral oil
5. dNTPs
6. Primer
7. Agarose
8. Ethidium bromide
9. Methylene blue
10. 1DN Aladder
11. Bromphenol blue
12. Xylene cyanole FF
13. Glycerol

*Dụng cụ*

Pipeman
Máy PCR
Máy ly tâm
Máy điện di
Oven
Tủ lạnh - 20°C. 40°C v.v..
Cân
Máy thanh trùng

## 14.5. Ứng dụng

Do dễ thực hiện và rẻ tiền, nên trong những năm mới hình thành marker phân tử, các nhà nghiên cứu dùng nhiều kỹ thuật RADP trong nghiên cứu đa dạng di truyền (Buu. 1999). Ngoài ra còn dùng cho nghiên cứu xây dựng bản đồ gen. Bản đồ gen TGMS được xây dựng trên cơ sở RAPD (Lang 1998).

### Tài liệu tham khảo

Bui Chi Buu, and Nguyen Thi Lang. 1999. Using molecular marker in study of rice genetic diversity. Omon rice (7) 17-25.

Nguyen Thi Lang, P.K Subudhi, S.S Virmani, N, Huang, and D.Brar. 1998 Development of PCR-Based Markers for thermosensive genetic male sterility tms-3 in rice. Rice genetic Newslette: Vol 7:102-103.

# 15. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH STS

## 15.1. Khái niệm

Sự chọn lọc nhờ marker [MAS] có thể làm tăng hiệu quả lai tạo giống lúa đối với những tính trạng rất khó phân lập kiểu hình. Mặc dù phương pháp này đã xây dựng được bản đồ gần như khá đủ với DNA marker, nhưng việc ứng dụng của những nhà chọn giống vẫn phải bị lệ thuộc vào chi phí rất đắt của công nghệ gen.

### *15.1.1. Khái niệm về STS marker:*

"STS" viết tắt từ chữ sequence-tagged sites. Khái niệm STS do Olson và ctv (1989) đề xuất. Khái niệm về STS marker được xem xét đầu tiên trên genome của người. *STS là đoạn ngắn-DNA sequence, giúp phân tích genome thông qua kỹ thuật phân tích di truyền phân tử là PCR.* STS cung cấp một ngôn ngữ chung trong DNA marker trong mối tương quan với bản đồ vật lý của genome. Nhiều DNA marker có thể chuyển đổi thành STS marker : thí dụ như RFLP marker, RAPD marker v.v.. Hơn 750 từ RFLP marker được chuyển đổi từ STS.

Kỹ thuật DNA marker trên cơ sở vị trí được đánh dấu có tính chất mã di truyền.

Trong khi đánh giá hiệu quả PCR trên lĩnh vực nghiên cứu genome con người, họ ghi nhận những chuỗi mã DNA dạng copy đơn của một vị trí đã biết rồi trên bản đồ, có thể được xem như một marker, để lập bản đồ di truyền và bản đồ vật lý các gen quan trọng trong các nhiễm thể.

Thay vì bảo quản, duy trì vật liệu sinh học, các nhà khoa học bảo quản các thông tin có tính chất điện tử (electronic information), vì nó dễ nhân ra, sắp xếp theo thứ tự, và lan truyền. Những marker được lưu trữ có tính chất điện tử này đã được gọi là STSs. Ứng dụng STS để phát triển các bản đồ vật lý từ những bản đồ di truyền, đang được tiến hành trong nhiều chương trình nghiên cứu, kể cả cây lúa (Inoue và ctv. 1994).

### *15.1.2. STS-based PCR và kỹ thuật marker phân tử:*

Một STS là một đoạn ngắn của chuỗi mã di truyền, được tìm thấy bởi PCR (Saiki và ctv. 1985). Mỗi STS được ghi nhận trên bản đồ, tại một vị trí chuyên biệt nào đó như là một ranh giới (landmark) trong genome. Do vậy người ta còn dùng thuật ngữ "standard landmarkers" để chỉ STS marker. Kỹ thuật PCR có vẻ thích hợp hơn kỹ thuật DNA blotting trong chọn lọc giống nhờ marker (MAS). Nó yêu cầu DNA có số lượng và chất lượng thấp hơn DNA blotting. Do đó nó có thể chịu được nguyên tắc trích DNA mà vẫn tránh được hiện tượng mẫu lớn. Nó còn có tính tự động hóa rất cao, không phải sử dụng phóng xạ, hay yêu cầu các hệ thống tìm kiếm có tính chất hóa sinh phức tạp (Zheng và ctv. 1995). STS-based PCR có ưu điểm là một bộ phận gián đơn, có tính sinh sản nhanh trên gel : agarose hoặc polyacrylamide. Bộ phận này dễ nhận thấy và dễ diễn giải, trong hầu hết các trường

hợp nó là codominant. Những marker như vậy cho phép thể dị hợp có thể được phân biệt với hai thể đồng hợp.

STS-based PCR có hai nhược điểm: (1) nó cần có dữ liệu mã di truyền thích hợp đối với từng locus, (2) nó không có tính chất polymorphic như những DNA marker khác, thí dụ như microsatellites (Wu và Tanksley, 1993). Tính chất quan trọng của vấn đề thứ hai - tần suất đa hình thấp - thay đổi ở mỗi locus và ở mỗi cặp lai cụ thể.

Việc sáng tạo ra STS là tiền đề cho phép chúng ta chuyển đổi bản đồ di truyền thành bản đồ vật lý . Inoue và ctv. (1994) đã tìm ra các bộ PCR primer, mỗi primer chừng 20 base, để dò tìm các sequence của RFLP landmarker, chứa đựng các clone của genome cây lúa. Các marker này phân bố khắp 12 nhiễm thể, và được thể hiện như copy dạng đơn trong phân tích Southern. Với những PCR protocol được cải tiến hiện nay, người ta đã tạo ra được 63 standard STS landmarker. 63 STS trên cơ sở RFLP landmarker này phân bố trong genome cây lúa $4.3 \times 10^8$ bp, với khoảng cách trung bình của mỗi STS là $6.5 \times 10^6$ bp.

Người ta có thể tạo ra STS bằng cách chạy sequence các clones, sau đó mapping chúng. Qui định này có tính bắt buộc đối với microsatellites, tiếp theo đó là những markers khác được sử dụng để chuyển đổi ra STS, như cDNA, gen được tạo thành clone, và các sản phẩm PCR được tạo thành clone. Số lượng lớn của ETS (expressed tagged sites) của cDNA cây lúa cũng có thể tạo ra STS. Chuỗi mã có tên gọi là single-pass automated sequence cung cấp thông tin (350-450 bases) chỉ từ một đoạn cuối của mỗi clone. Điều này đáp ứng đầy đủ thông tin cho ETS được sử dụng để xây dựng bản đồ vật lý, hoặc để nghiên cứu tính chất tương tự trong nguồn dữ liệu, những PCR amplicon này lấy từ ETS, thường rất ngắn để phát hiện polymorphism của bố mẹ, theo qui trình ALP (amplicon length polymorphism) hay PCR-based RFLP (Ghareyazie và ctv. 1995). Tuy nhiên người ta có thể khám phá polymorphism giữa những amplicon ngắn như vậy thông qua qui trình điện di dặc biệt (Fukuoka và ctv. 1994).

### 15.2. Phương pháp tiến hành

Các bước tiến hành như sau:

1. Các thành phần dung dịch dùng thường đặt trong tủ lạnh -20°C hoặc -80°C
2. Ghi nhãn cẩn thận trên ống nghiệm 0,5µl hoặc trên micro tap (một loại đặc biệt dùng để chạy mẫu PCR)
3. Chuyển 10,0 µl của mẫu DNA vào ống nghiệm
4. Chuẩn bị pha dung dịch

| Thành phần | Pha nồng độ | Phản ứng cho nồng độ | µl/mẫu |
|---|---|---|---|
| Nước cất | | | 4,9 |
| PCR buffer | 10X | 1X | 2,0 |
| dNTP | 4mM | 200µM | 1,0 |
| Primer Forward | 5µM | 250nM | 1,0 |
| Primer reverse | 5µM | 250nM | 1,0 |
| Taq polymerase | 5U/µl | 0,5U | 0,1 |
| | | | 10,0µl |

5. Trộn đều và ly tâm

6. Dùng pipette lấy 10,0µl cho mỗi phản ứng trong ống nghiệm có chứa sẵn DNA

7. Lấy một giọt dầu (mineral oil) phủ trên dung dịch

8. Ly tâm

9. Đặt ống nghiệm vào máy PCR, đóng nắp máy và khởi hành cho máy hoạt động

10. Chu trình hoạt động của máy như sau:

| Chương trình | Kiểu | Giai đoạn 1 | | Giai đoạn 2 | | Giai đoạn 3 | | Số chu kỳ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Nhiệt độ | Thời gian | Nhiệt độ | Thời gian | Nhiệt độ | Thời gian | |
| 1 | | 94°C | 5 phút | | | | | |
| 2 | Chu kỳ | 94°C | 30 giây | 55°C | 30 giây | 72°C | 1 phút | 30 |
| 3 | | 72°C | 5 phút | | | | | |
| 4 | | 4°C | | | | | | |

11. Lấy mẫu ra khỏi máy, khi hoàn thành chu kì

12. Dự trữ nhiệt độ 4°C

13. Phân tích mẫu trên agarose gel

**15.3. Đo đếm và sắp xếp số liệu**

Số liệu từ phân tử STS marker sau khi hoàn thành sẽ được đo đếm như sau

Số liệu đo đếm để phục vụ cho xây dựng bản đồ gen

| | | |
|---|---|---|
| A | 1 | Bố mẹ là 1, với alen là codominant |
| H | 2 | Dị hợp tử |
| B | 3 | Bố mẹ là 2, với alen là codominant |
| C | 4 | Không có bố mẹ 2, là dominant |
| D | 5 | Không có bố mẹ 1, là dominant |
| - | 0 | Không có số liệu |

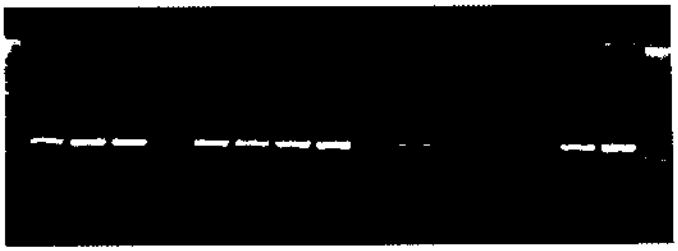
| | |
|---|---|
| Trong quần thể | Cho phép đo đếm |
| $F_2$ | Tất cả đều đo đếm |
| $BC_1F_1$ | Trong trường hợp này A hoặc H ở đây A là cha mẹ |
| DH/RIL | Chỉ có A hoặc B. Không có dị hợp tử |

Một số kết quả thí nghiệm như sau :

1. Thí dụ : Một trường hợp ta có STS từ phản ứng PCR mà không qua phân cắt DNA ( hình 15.1). Còn gọi là đơn hình (monomorphism)

P1 F1 P2 S1 S2 S3 S4 S5

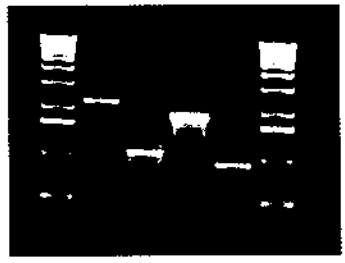
– – – – – – – – Marker



*Hình 15.1: STS Marker phân tử AC3. Genomic DNA từ 15 giống lúa :*

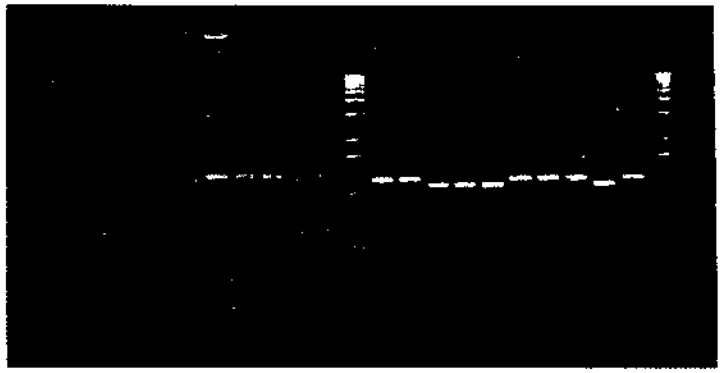
*1:IR32364TGMS; 2:IR68; 3:IR24; 4:IR36; 5:IR64; 6:IR72; 7:IR8; 8:RGS050; 9:Balilla8; 10:RGS064; 11:IR65598-112-2; 12:IR65600-42-5-2; 13:IR65600-96-1-2-2I; 14:Spr3;15:Spr4.*

2. Đối với STS từ phản ứng PCR mà không qua phân cắt DNA nhưng dạng đa hình polymorphism. (hình 15.2)



*Hình 15.2: STS marker phân tử F18F-F18MR và F18MF-F18RM theo thứ tự .*
*Phân tích DNA từ hai giống IR32364tgms và IR68 : 1,3: IR32364tgms; 2,4:IR68*

3. Đối với STS từ phản ứng PCR qua sự phân cắt DNA bằng enzyme. (hình 15.3)



*Hình 15.3: STS marker phântử RG140L/L và RG140L/B được phân cắt với enzme PvuII trên 10 giống lúa Ưu thế lai:*
*1: IR24, 2:IR46, 3: IR36, 4: IR58025, 5:IR62829, 6: IR40750-82-2-2-3-R.*
*7: ZSR1, 8:ZSR2, 9: ZSA , 10: ZSR3.*

4. Một số trường hợp sự phân cắt của enyme với nhiều alen (hình 15.4)

*Hình 15.4: STS marker phân tử RG556 phân cắt với DraI trên nhiều giống lúa địa phương. Có 4-5 alen.*

## 15.4. Ứng dụng STS marker

Biến thiên di truyền giữa hai giống lúa có thể được phân tích nhờ khác biệt về độ dài của đoạn DNA đặc biệt nào đó thông qua kỹ thuật PCR, với cùng một cặp primer. Vì sản phẩm của PCR được gọi là amplicon, cho nên biến thiên như vậy được gọi là amplicon length polymorphism (ALP). Khi không có ALP nào được phát hiện bởi một cặp primer giữa hai giống, người ta áp dụng kỹ thuật PCR-based RFLP (viết tắt là PBR), với một restriction enzyme nào đó, cho thêm vào để tiêu hóa amplicon này. Việc xác định enzyme này cần làm với hàng loạt xét nghiệm, cho đến khi nào tìm được polymorphism xảy ra trên điện di.

*Bảng1:* **STS được liên kết với các gen kháng bệnh đạo ôn và bạc lá, rầy nâu, Lúa ưu thế lai**

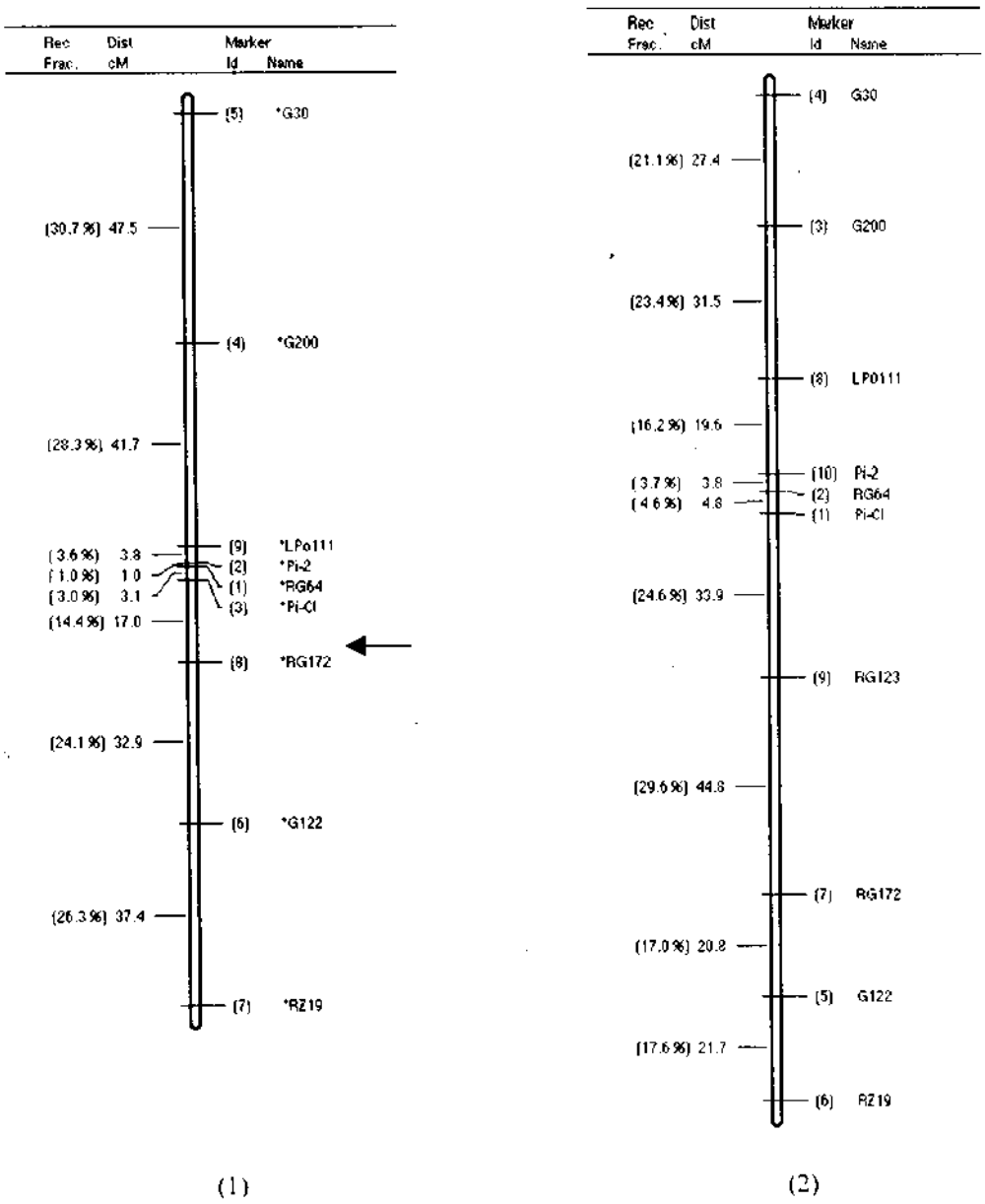
| Marker | Gen liên kết | CHR no. | STS primer 5'----------3' | ALP / enzyme trong PBR | Tác giả |
|---|---|---|---|---|---|
| RG64 | *Pi-2* | 6 | CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG<br>CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG | *Hae*III | Hittalmani et al. 1995 |
| | | | AGACGCGGAAGGGTGGTTCCCGG<br>A | | Chunwongse et al. 1993 |
| pTA8 | *Xa-21* | 11 | AGCGCGGTGTAATCGAAAGATGAA<br>TAGCTGCTGCCGTGTGC | ALP | Bennett và Ning Huang |
| | | | AATATTTCAGTGTGCATCTC<br>CAGCTGTTCAGTCGTTTG | *Dra*I | Lu và ctv |
| RG556 | *xa-5* | 5 | CAGCTGTTCATACAAGAAAT | ALP | |
| P265.550 | *Pi-12(t)* | 12 | | | |
| F18F | *Tgms*-3 | | TTC CCG GGT TCC ACT AGG AT<br>GGGG ATTGGGTTGGGCCCTT | ALP | Lang et al 1998 |
| F18R | | 6 | GAG CTC ACA GCA ATC TGC AT<br>TAG TGT CTG TCA CTG GAG GC | *Alu*I and *Rsa*I | Lang et al 2000 |
| RG532 FL<br>RG532 RL | *RF-3* | 1 | GTA CAT AGT AGC ACC TGC TC<br>TCC CTA GTT TGT GCT ACT CC | *Eco*RI | Lang et al 2000 |
| RG140 FL<br>RG140 RL | *RF-3* | | GCA GTG GCA GAT GGG ATC G T<br>GCT CCG AAA TCC CAA GCG AT | *Hin*fI | Lang et al 1999 |
| RG457 FL<br>RG457 RL | BPH | 12 | | | |

Trước đó cặp primer (F và R) được thiết kế sau khi chạy sequence RFLP marker cần thiết. Việc thiết kế này tùy thuộc vào kinh nghiệm và kỹ năng của người làm việc trong phòng thí nghiệm.

Cả hai ALP và PBR đều được xem như là PCR-based marker

Thí dụ trong bảng 1 cho thấy các STS primer được dùng để tìm xem gen kháng có chứa trong bố mẹ và con lai.

Ngoài phát hiện đa hình, STS còn giúp xây dựng bản đồ di truyền, trong quá trình fine mapping, tìm vị trí gen gần nhất. Bản đồ fine mapping trên gen kháng bệnh đạo ôn (Lang 2001), hình 15.5




*Hình 15.5: Bản đồ fine mapping trên hai quần thể (1) OM 1308/Tẻ tép (2) Sóc nâu/OM997*

**15.5. Hóa chất và dụng cụ phân tích**

***Các hóa chất cần thiết cho phân tích STS***

1. 1M Tris base
2. 1M KCl
3. *Taq* polymerase
4. Mineral oil
5. dNTPs
6. Primer
7. Agarose
8. Ethidium bromide
9. Methylene blue
10. 1DN Aladder
11. Bromphenol blue
12. Xylene cyanole FF
13. Glycerol
14. Enzyme

***Dụng cụ***

Pipeman

Máy PCR

Máy ly tâm

Máy điện di

Nồi hấp vô trùng (oven)

Tủ lạnh -20°C. 40°C v.v..

Cân

Máy thanh trùng

Máy đo pH

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Fukuoka S, Inoue T, Miyao A, Monna L, Zhong HS, Sasaki T, Minobe Y. 1994. Mapping
sequence-tagged sites in rice by single strand conformation polymorphism. DNA Re
1:271-227heng KL, Huang N, Bennett J, Khush GS. 1995. PCR-based marker-assiste

selection in rice breeding. IRRI Discussion Paper Series No.12. Manila, Philippines: International Rice Research Institute

Ghareyazie B, Huang N, Second G, Bennett J, Khush GS. 1995. Classification of rice germplasm. I. Analysis using AFLP and PCR-based RFLP. Theor. Appl. Genet. 91:218-227

Hittalmani S, Foolad MR, Mew TV, Rodriquez RL, Huang N. 1995. Development of PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, *Pi-2*(t) in a segregation population. Theo. Appl. Genet. 91:9-14

Nguyen Thi Lang, PkSubudhi, S.S.Virmani, D.S Brar and N. Huang.1998. A resessive gene tms-3(t) for thermosensitive genetic male sterility in rice 90. ryza sativaL) Omonrice 6 : 29-36.

Nguyen Thi Lang, D .Brar, G.S Khush, Ning Huang and Bui chi Buu. 1999. Development of STS markers to indentify brown planthopper resistance in a segregating population. Omon rice 7 . 26-37.

Nguyen Thi Lang, G.Zhang, G.Magpantay, S.S.virmani, n.huang, D.S. Brar. J.bennett, G.S.khush and Z.k.Li.2000. PCR based DNA markers for fertility restoration gene Rf-3 and thermosensitive male sterility gene, tgms-3, in rice. Euphytica00:1-8,2000

Nguyen Thi Lang, G.Khush, N. Huang, Bui Chi Buu, 2001. Fine mapping for blast resistance gene in rice using bulked segregrant analysis , omonrice (9) :1-8

Inoue T, Zhong HS, Miyao A, Ashikawa I, Monna L, Fukuoka S, Miyadera N, Nagamura Y, Kurata N, Sasaki T, Minobe Y. 1994. Sequence-tagged site (STSs) as standard landmarkers in rice genome. Theor. Appl.Genet. 89:728-734

Olson M, Hool L, Cantor C, Botstem D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. Science 245:1434-1435

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sicle-cell amenia. Science 230:1350-1354

Wu KS, Tanksley SD. 1993. Abundance, polymorphism, and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol. Gen. Genet. 241:225-235

# 16. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH SSR

## 16.1. Khái niệm

Microsatellite là chuỗi mã di truyền lặp lại rất đơn giản, thường xảy ra một cách ngẫu nhiên trong hầu hết genomic trên thực vật. SSR được viết tắt từ chữ "simple sequence repeat". Chiều dài thường 1-100 bp. Do đó SSR có thể khuyếch đại trong ống nghiệm bằng phương pháp PCR với phát triển của primer theo miền của hai bên chuỗi ký tự lặp lại trên một locus. Kỹ thuật ứng dụng SSR rẻ tiền hơn kỹ thuật RFLP. Do đó hiện nay các nhà nghiên cứu tiếp tục dùng SSR thiết kế bản đồ gen trong di truyền, chọn lọc giống bằng SSR, đa dạng hóa về các vật liệu di truyền.

***Phản ứng PCR cho SSR***

Giống như phương pháp RAPD, một phản ứng PCR cho SSR bao gồm các thành phần sau:

1. Một dung dịch gọi là buffer, chứa Tris-HCl, KCl và $MgCl_2$
2. Bốn deoxynucleotide (dNTPs)
3. Hai oligonucleotide primers
4. DNA
5. Một DNA polymerase

Thể tích cần cho một PCR của SSR có thể là 15-50µl là đủ. DNA có thể ly trích từ nhiều phương pháp khác nhau. Tuy nhiên trước khi dùng DNA, điều quan trọng là phải kiểm tra nồng độ DNA về số lượng cũng như chất lượng. Nồng độ dùng cho SSR từ 30-25ng/µl. Nếu nồng độ quá cao phải pha loãng trước khi sử dụng.

***PCR dùng cho một phản ứng:***

| Thành phần | Pha dung dịch | Thể tích | Nồng độ sau cùng | Ghi chú |
|---|---|---|---|---|
| $H_2O$ | | 12.5 | | |
| PCR buffer | 10X | 2 | 1X | |
| dNTP | 1mM | 2 | 100µM | |
| Primer forward | 5µM | 4 | 0,25µM | |
| Primer reverse | 5µM | 5 | 0,25µM | |
| *Taq* polymerase | 5unit/µl | 0.5 | 2,5 unit/20µl | |
| DNA | 25ng/µl | 1 | 25ng/µl | Tùy theo nồng độ DNA |

**16.2. Phương pháp tiến hành**

Các bước tiến hành như sau:

1. Các thành phần dung dịch dùng thường đặt trong tủ lạnh -20°C hoặc -80°C
2. Ghi nhãn cẩn thận trên ống nghiệm 0,5ml hoặc trên micro tap (một loại đặc biệt dùng để chạy mẫu PCR)
3. Chuyển 10,0 µl của mẫu DNA vào ống nghiệm
4. Chuẩn bị pha dung dịch
5. Trộn đều và ly tâm
6. Dùng pipette lấy 10,0µl cho mỗi phản ứng trong ống nghiệm có chứa sẵn DNA
7. Lấy một giọt dầu (mineral oil) phủ trên dung dịch (dầu này làm tránh bốc hơi dung dịch)
8. Ly tâm
9. Đặt ống nghiệm vào máy PCR, đậy nắp máy và khởi hành cho máy hoạt động
10. Chu trình hoạt động của máy như sau:

| Chương trình | Kiểu | Giai đoạn 1 | | Giai đoạn 2 | | Giai đoạn 3 | | Số chu kỳ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Nhiệt độ | Thời gian | Nhiệt độ | Thời gian | Nhiệt độ | Thời gian | |
| 1 | | 94°C | 5phút | | | | | |
| 2 | Chu kỳ | 94°C | 1phút | 55°C | 1 phút | 72°C | 2 phút | 35 |
| 3 | | 72°C | 5 phút | | | | | |
| 4 | | 4°C | | | | | | |

11. Lấy mẫu ra khỏi máy, khi hoàn thành chu kì
12. Dự trữ ở nhiệt độ 4°C
13. Phân tích mẫu trên agarose gel hoặc acrylamide gel

***Phân tích mẫu trên gel: Có hai phương pháp***

**A. Agarose**

Giống như các phương pháp phân tích RAPD, STS. Agarose được nấu cho tan, với nồng độ 3%. Tùy theo thể tích của khung điện di mà tính toán số lượng agarose cho phù hợp.

**B. Acrylamide gel**

Chạy gel acrylamide gel

Chuẩn bị kính để chạy gel

1. Rửa kính thật sạch qua nước với giấy mềm hoặc bọt biển, đặt kính đứng để mau khô.
2. Đối với kính dài : mang bao tay để rửa. Rửa 3 lần với cồn 95% và dùng giấy kimwipes. Trộn 1% cồn, 5µl acid glacial acetic, 3µl bind silane.

3. Dùng pipet man lấy 1ml dung dịch bind silane đặt nhẹ trên kính, chú ý phải phủ đều dung dịch này trên kính.
4. Lấy giấy kimwipe lau sạch
5. Sau 5-10 phút phơi khô và rửa cồn 95%. Lặp lại giai đoạn này 2-3 lần
6. Đối với kính ngắn
7. Thay bao tay trước khi rửa
8. Dùng pipetman, lấy 1ml sigma code đặt phủ trên toàn tấm kính,
9. Sau 5-10 phút dùng cồn 95% rửa tiếp với kimwipes

Chuẩn bị khung kính
Đặt kính ngắn trên bàn
Lấy hai dây đặt hai đầu.

**Chuẩn bị đổ gel**

1. Chuẩn bị 5% acrylamine gel trong 100ml trước khi đổ gel
2. Thêm 50µl TEMED và 600µl 10% ASP (ammonium persulfaate)
3. Nhẹ nhàng đưa gel vào khung bằng cách dùng ống bơm. Chú ý tránh bọt khí Sau khi đưa gel vào khung, đặt lượt vào. Kế đến dùng giấy plastic phủ các đầu gel. Tránh làm khô gel.
4. Sau hai giờ chúng ta có thể loading

**Chạy Acrylamide gel**

**Dung dịch trong bể**

1. Đổ 500ml 1xTBE vào phòng trên
2. Tiếp tục đổ 500ml 1XTBE vào phòng dưới
3. Nối điện và cho chạy. Khởi động ban đầu 2500V, 150 mA và 90 W. Giai đoạn này chạy nóng khoảng 30phút.

**Chuẩn bị loading**

1. 10µl loading thêm vào mỗi probe (8µl thể tích từ phản ứng PCR)
2. Đặt phản ứng này vào máy thermocycler (5 phút) ở nhiệt độ 94°C
3. Đặt mẫu vào đá ngay tức khắc sau khi denature
4. Tắt điện và chuẩn bị loading
5. Ghi nhãn cẩn thận
6. Rửa các giếng cẩn thận
7. Loading : 10 µl mẫu đưa vào giếng
8. Khởi động máy trở lại với 2500 volt ,120 và 70 W. Sau khi loading mẫu đầu tiên khoảng 30 phút. Tiếp tục loading mẫu thứ hai và trên một gel có thể loading 4 set
9. Khi gel đạt hoàn toàn. Thời gian có thể thay đổi tùy theo loading chậm hay nhanh. Tắt điện và di chuyển gel ra ngoài. Chú ý mở buồng trên và đổ buffer vào một chai nhựa để dành cho gel đợt sau.

10. Di chuyển gel ra khỏi tấm kính
11. Mở ốc. Một tay nâng kính ngắn. Ngón tay trỏ nâng từ từ tấm kính dài và tách khỏi tấm kính ngắn.
12. Gel nằm và dính chặt trên tấm kính dài

**Rửa phim**

1. Gel nằm và dính chặt trên tấm kính dài .
2. Đặt kính và gel vào bể có chứa 10% acid acetic (dung dịch này gọi là dung dịch cố định (thời gian 20-25 phút). Dung dịch này giữ lại để dùng trong giai đoạn 7
3. Rửa nước (hai lần trong 2 phút)
4. Nhuộm dung dịch bạc (30 phút) cho lần nhuộm thứ nhất. Nếu nhuộm lần thứ hai 45 phút và nhuộm lần ba 60 phút. Do đó dung dịch này có thể giữ và dùng nhiều lần
5. Rửa gel (rất nhanh 20 giây)
6. Rửa phim : Giai đoạn này nhanh hay mau tùy theo phản ứng
7. Đưa sang dung dịch cố định phim
8. Rửa nước: chú ý rửa nhanh đảo 10 lần lấy ra
9. Phơi khô: dựng trên giá để cho gel mau khô, chú ý ghi nhãn cẩn thận
10. Đếm băng, trên đèn và scan trên máy

**Đo đếm và sắp xếp số liệu:**

Số liệu từ phân tử SSR marker sau khi hoàn thành sẽ được đo đếm như sau

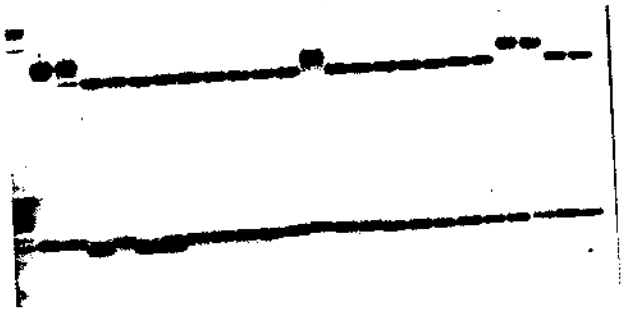
Số liệu đo đếm để phục vụ cho xây dựng bản đồ gen

| | | |
|---|---|---|
| A | 1 | Bố mẹ là 1, với alen là codominant |
| H | 2 | Dị hợp tử |
| B | 3 | Bố mẹ là 2, với alen là codominant |
| C | 4 | Không có bố mẹ 2, là dominant |
| D | 5 | Không có bố mẹ 1, là dominant |
| - | 0 | Không có số liệu |

| Trong quần thể | Cho phép đo đếm |
|---|---|
| $F_2$ | Tất cả đều đo đếm |
| $BC_1F_1$ | Trong trường hợp này A hoặc H ở đây A là cha mẹ. |
| DH/RIL | Chỉ có A hoặc B. Không có dị hợp tử |

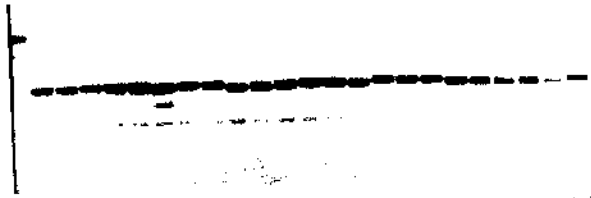
**Đếm băng và đánh giá kết quả**

Thí dụ 1 : Đây là băng hình chạy của microsatellite. Với nồng độ 3% agarose. Trên hình polymorphism rất rõ nét.

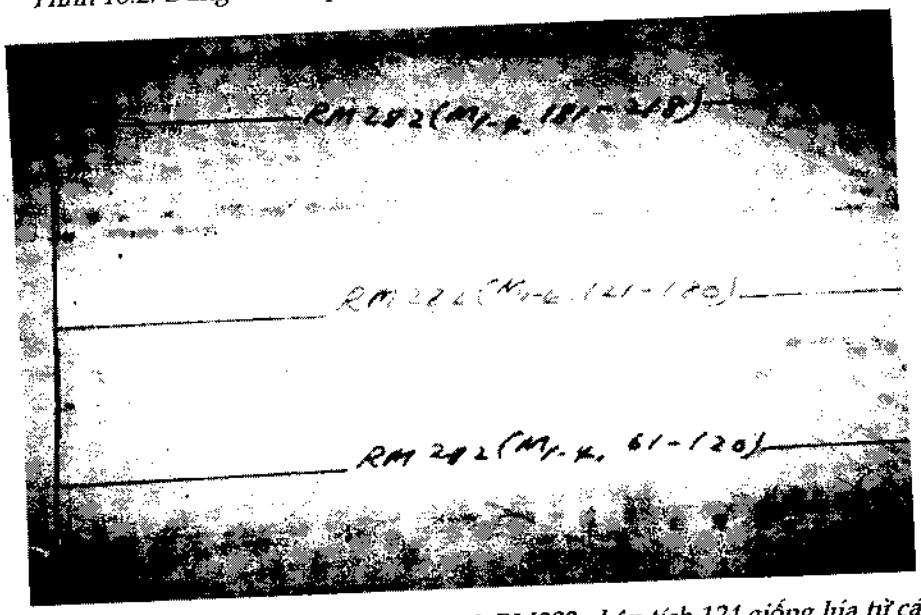


*Hình 16.1. Band hình microsatellite được đánh giá trên gel agarose với hai marker A:RM180. B:RM340. M : 1kb.marker 1-23 : genomic DNA của : 1: Cisanggarung; 2: Cisedane; 3: Khazar. 4: Gayabyeo; 5: Iimibyeo; 6: CR203. 7: OM997. 8: PSB RC28; 9: Pusa:10: Te Tep 11: TB154E-TE2; 12:Binam; 13: Domsian; 14: Yuqui-Gu; 15: OMCS94.; 16:OM1706; 17: OM1723; 18: X21; 19: X22; 20: X22; 21: C71; 22: C70;23:Q3 B:RM340*

Thí dụ 2: Đối với một số trường hợp băng hình chạy trên agarose không tìm thể đa hình. Cần phải dùng acrylamide gel. Băng hình polymorphism nhưng khoảng cách rất ngắn, cần phải chạy trên acrylamide gel.

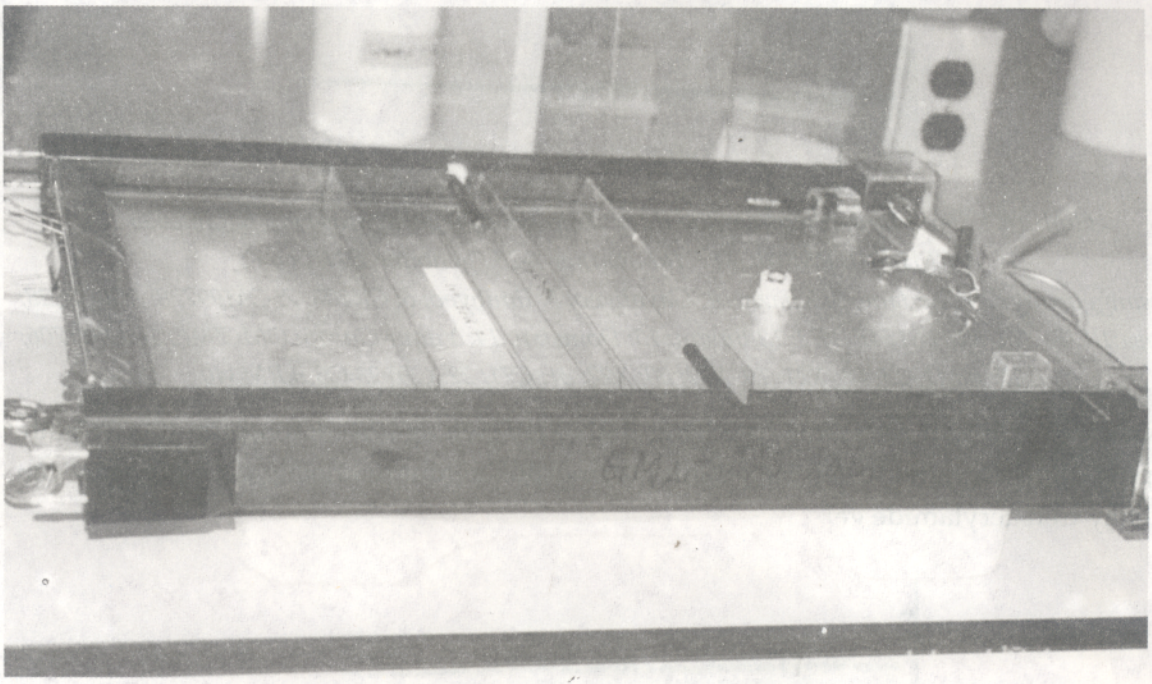


*Hình 16.2: Dùng RM282 phân tích trên điện di và chạy bằng agarose.*

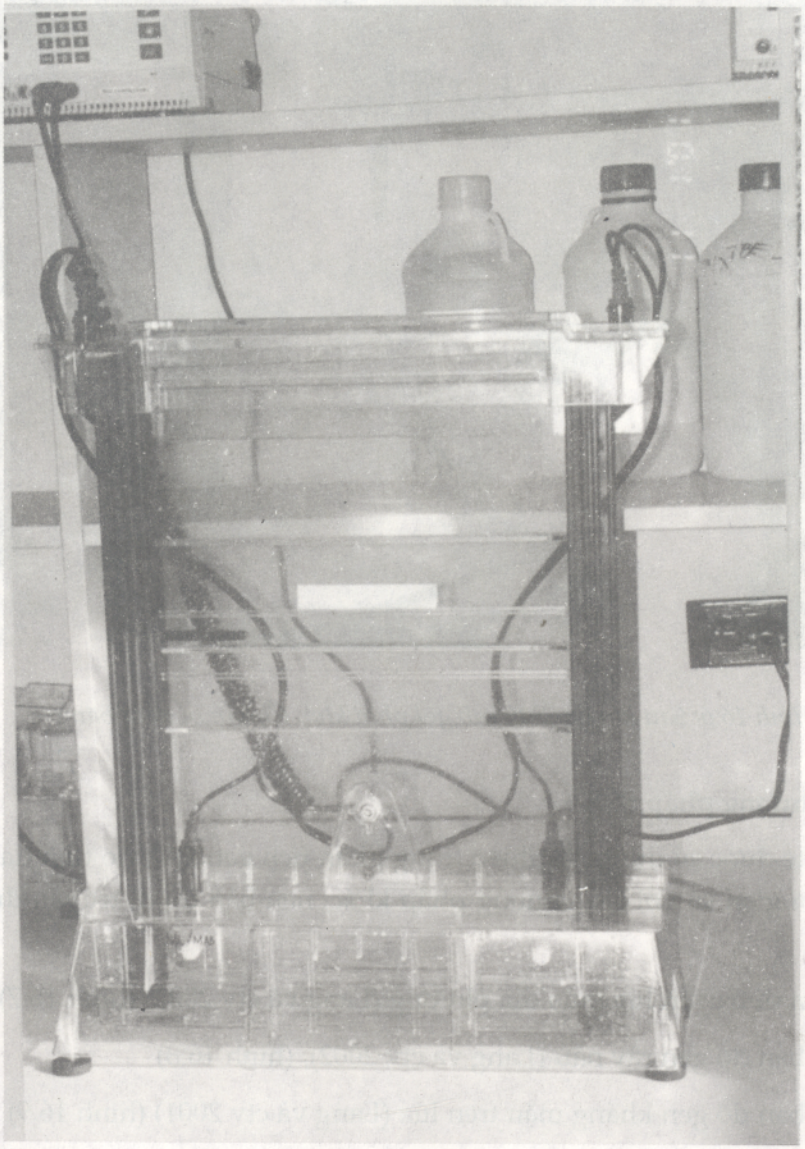



*Hình 16.3: Băng hình chạy trên acrylamide gel .RM282 phân tích 124 giống lúa từ các nước : Nhật, Trung Quốc, Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Mỹ, Iran, Malai, Thai Lan, Philipine, Bangladsh, Miến Điện, Sirlanka, Ai cập, Indonesia, Nepal, Taiwan, Pháp, Peru, Madagascar, Suriname, Hungari, Portugal, Guinea-Bissa, Guinea, Pakistaan Bangladesh*

Dụng cụ cần cho chạy điện di đứng: kích cỡ rất nhiều loại. Đây là giới thiệu điện di kích cỡ lớn nhất và dùng cho phân tích quần thể.



*Hình 16.4: Điện di đứng, đưa gel vào hai khung kính của điện di*



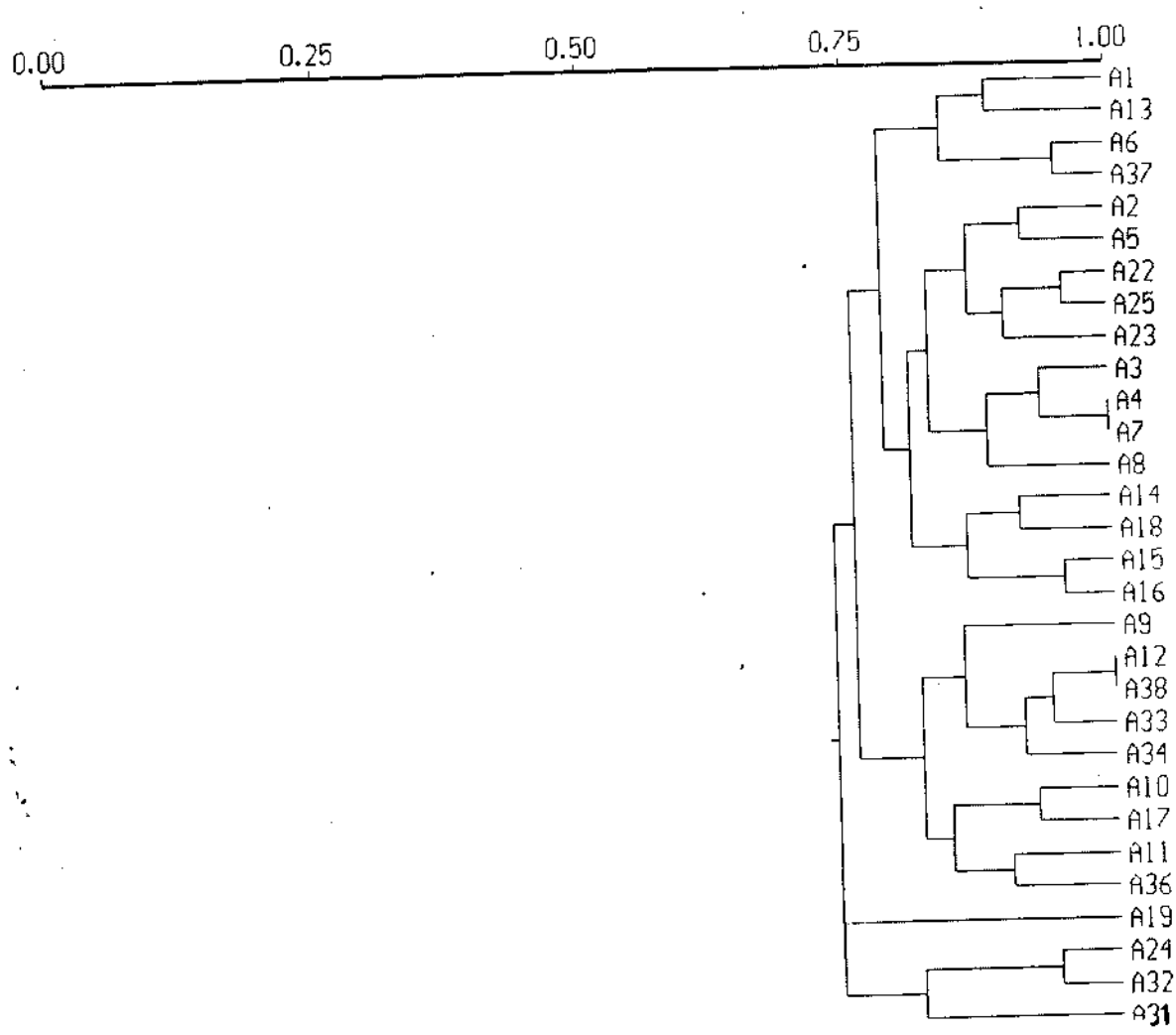
*Hình 16.5: Điện di đã hoàn toàn và chuẩn bị cho cho loading*

*Hình 16.6: Sau khi hoàn thành gel phơi khô. Chuẩn bị đếm băng*

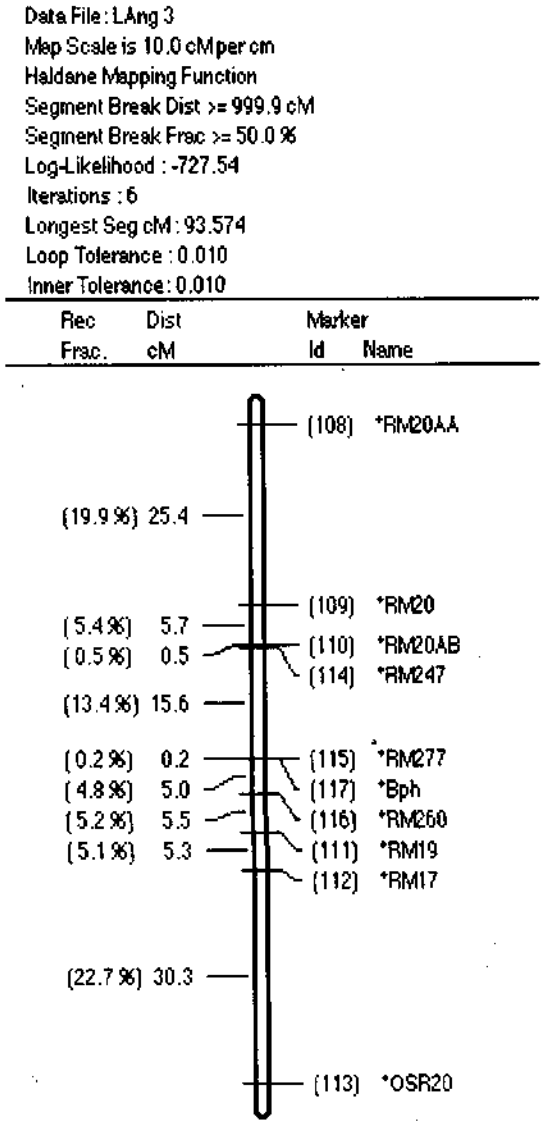
**16.3. Ứng dụng phương pháp SSR**

Microsatellite được sử dụng rất nhiều trong phân tích genome, do tính đa hình phon phú, tiết kiệm thời gian so với các phương pháp khác, nên bản đồ di truyền được sử dụn thành công

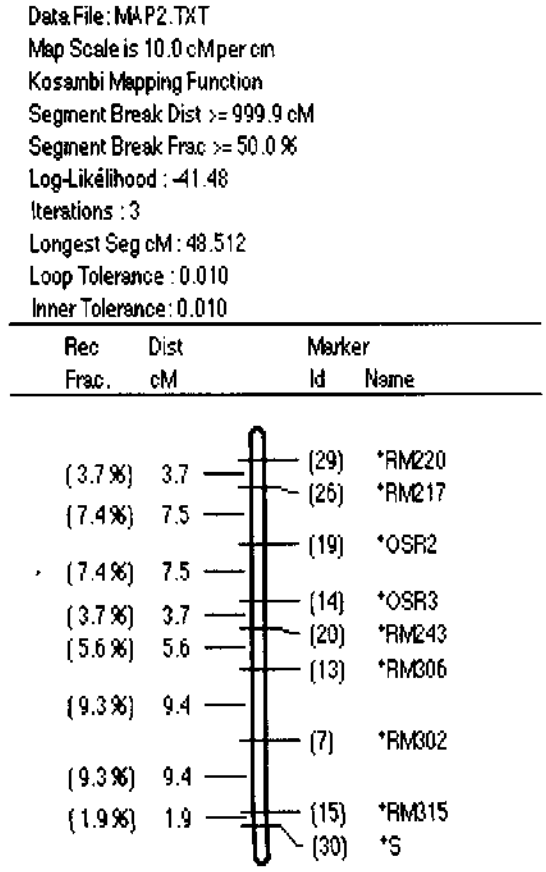
- Phân nhóm di truyền lúa mùa địa phương (Lang và ctv 2002) (hình 16.7)
- Xây dựng bản đồ gen rầy nâu (Lang và ctv 2002), (hình 16.8)
- Xây dựng bản đồ gen kháng mặn trên lúa (Lang và ctv 2001) (hình 16.9)




*Hình 16.7: phân nhóm di truyền lúa mùa dùng microsatellite :*
*1: Nếp Tàu Hương, 2: Nàng Thơm, 3: Thơm Sớm, 4: Nàng Thơm, 5:Nhen, 6: Hai Bông, 7: Nếp Sáp, 8: Cà Đôn, 9: Nếp Mống Chim, 10: Ba Thiệt, 11: Nếp Cá Rô, 12: Năm Lựa 8, 13: Nếp Đài Loàn, 14: Nếp Than, 15: Thằng Còn, 16: Trắng Bồ Câu , 17: Nhen, 18: Nếp mùa sớm, 19: Nếp huyết Rồng, 20: Nếp mỡ, 21: Nếp Lùn, 22: Trắng Tép, 23: Tép Hành, 24: Trắng Phiếu, 25: Trắng Tròn, 26: Lùn Cần, 27: Nàng Gáo, 28: Nếp Bồ Câu, 29: Nếp Phú, 30: Thần nông Lùn, 31: Móng chim Ô, 32: Đuôi trâu, 33: Trời Cho, 34: Nếp Ba Tập, 35: Nếp đỏ, 36: Lem Bụi, 37: Nàng Loan đốc, 38: Lùn Kiên Giang*




*Hình 16.8 : Bản đồ di truyền được xây dựng từ SSR marker trên nhiễm sắc thể 12, xác định gen kháng rầy nâu*




*Hình 16.9: Dùng SSR marker xây dựng bản đồ di truyền gen chống chịu mặn trên nhiễm sắc thể số 1, quần thể lai $BC_2F_2$ từ IR 64/ OM 1706*

## Tài liệu tham khảo

Nguyễn Thị Lang, Z.K.Li, Bùi Chí Bửu, 2001.Microsatellite marker linked to salt tolerance in rice, Omon rice 9: 9-21.

Nguyễn Thị Lang và Bùi chí Bửu, 2002 Ứng dụng marker cho chọn giống gen kháng rầy nâu và bệnh, tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn. (6) 485-487

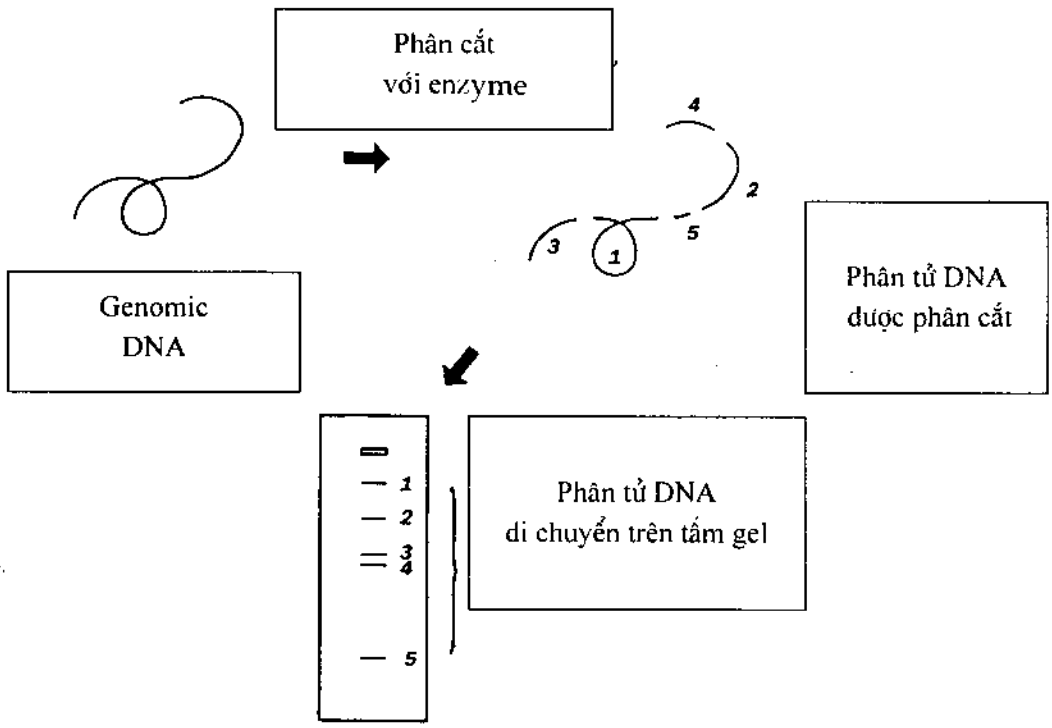
# 17. GIỚI THIỆU KỸ THUẬT RFLP

## 17.1. Mở đầu

Kỹ thuật RFLP (restriction fragment length polymorphism) là kỹ thuật cơ bản trong công nghệ tái tổ hợp DNA.

Thông tin di truyền nằm trong thực vật bậc cao nhờ vào hệ thống DNA sequencing, hay mã di truyền, định vị trên nhiễm sắc thể. Cây được sao bản nhờ sự tự tái bản DNA với tần số rất chính xác, tuy có nhiều cơ chế làm thay đổi DNA. Kết quả thay đổi này do hiện tượng đảo đoạn, thêm đoạn hoặc chuyển đoạn.

Để phân tích genome DNA người ta dùng kỹ thuật RFLP và thực hiện bản đồ liên kết gen




*Hình 17.1*

## 17.2. Dụng cụ và hóa chất

***Đánh dấu phân tử DNA***

LS

| | |
|---|---|
| DTM | 100μM |
| Hepes | 1M |
| OL | 90 units/ml |

Dự trữ -20°C

100μM DTM

Bao gồm

| | |
|---|---|
| DATP | 100mM |
| DTTP | 100mM |
| DGTP | 100mM |
| TM | 19,940μl |

TM:

Thành phần bao gồm

| | |
|---|---|
| Tris-HCl | 2M |
| $MgCl_2$ | 1M |
| 2 Mercapto ETOH | 1M |

Nước cất

1M 2 mercapto ETOH

Trộn 79,8 μl 2 mercapto ETOH với 917,2 μl nước cất

1M Hepes, pH 6,6

Hòa tan 4,8 g hepes trong 20 ml nước cất, pH = 6,6

OL, 90 đơn vị/ml

Hòa tan 500 units primer trong 5600 μl TE buffer (pH 8,0)

Klenow enzyme, 2 units/μl

Al pha 32 -dCTP, pH 8.0

## 17.3. Phương pháp

***A. Kỹ thuật Lai Southern dùng probe có $P^{32}$ đánh dấu***

**Cách thực hiện**

1. Ly trích DNA (xem lại phần ly trích DNA)
2. Phân tử thăm dò (probe) có đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ $P^{32}$

Chuẩn bị 150ng DNA trong 30 μl (tube), thêm vào 1ng lambda *Hin*d III

Tách DNA thông qua đun sôi 100°C trong water bath cho 10 phút, lấy ra và giữ trong đá

Thêm 15 µl của dung dịch label, 2 đơn vị enzyme Klenow và 3µl (30uCi) của đồng vị phóng xạ $P^{32}$ - dCTP. Trộn đều dung dịch.

Ủ dung dịch này trong phòng, điều chỉnh nhiệt độ là 37°C trong 2 giờ.

Hòa tan dung dịch trong 450 µl với TE buffer và thêm vào 45 µl dung dịch 2N NaOH để tách DNA. Đặt dung dịch trong phòng với nhiệt độ trong phòng trong 15 phút

***B.Lai DNA :***

Đun DNA tinh trùng cá hồi (sssDNA, 10mg/ml) ở nhiệt độ 100°C trong water bath trong 15 phút. Đặt mẫu ngay vào đá.

Chuẩn bị làm nóng dung dịch lai ở nhiệt độ 65°C và thêm vào 10µl sssDNA /ml dung dịch

Để dung dịch vào trong hộp lai và đặt một màng lọc (membrane DNA) nhúng vào hộp lai. Chú ý chỉ cần một lượng nhỏ buffer đủ để màng lọc DNA thấm, Chú ý tránh bọt khí, lấy nắp đậy hộp lai và đưa máy lắc đậy kính trong 3 giờ.

Lấy màng lọc DNA ra khỏi hộp lai, thêm probe có đánh dấu vào buffer, lắc và đảo màng lọc cho đều. DNA cho phép lai trong 5 giờ hoặc qua đêm ở nhiệt độ 65°C. Chú ý buffer có chứa probe có thể lưu trữ trong ống nghiệm 50 ml ở nhiệt độ -20°C để sử dụng tiếp tục trong lần lai sau.

Rửa màng lọc với các dung dịch A, B và C đun nóng ở 65°C, rửa trong 15 - 30 phút, chú ý rửa phải đặt trên máy lắc để rửa cho đều.

***C. Chụp hình bức xạ***

Đo hoạt động của DNA bức xạ trên màng lọc.

Số lượng DNA của màng lọc bên trong X-ray film cassette được thể hiện.

Chú ý khi mở cassette phải vào trong phòng tối.

Mở cassette trong phòng tối và lắp đặt X-ray film trực tiếp với bề mặt có chứa DNA trên màng lọc.

Tồn trữ cassettes ở điều kiện nhiệt độ -80°C.

Rửa phim

## 17.4. Ứng dụng

### *17.4.1. Lập bản đồ di truyền trên cây lúa nhờ marker phân tử*

Mc. Couch và ctv (1988) thiết lập bản đồ di truyền nhờ marker phân tử (RFLP) trên cây lúa bao gồm 135 loci. Bản đồ phủ trên 12 nhiễm sắc thể với tổng cộng 1.389cM trên genome cây lúa từ cặp lai IR34583 (indica) và Bulu Dalam (Javanica).

Tiếp theo ba năm sau, bản đồ thứ hai từ quần thể IRAT117 (Japonica) và Apura (indica) được công bố (Mc Couch 1991, Tanksley và ctv 1991). Saito và ctv (1991) thiết lập một bản đồ khác dựa trên cặp lai Kasalath (indica) và Fl134 (Japonica) với 347 RFLP markers, phủ trên 12 nhiễm sắc thể với tổng cộng 1.836 cM với 347 loci.

Causse và ctv (1994) thiết lập một bản đồ khác dùng RFLP markers để xây dựng bản đồ di truyền từ quần thể lai ngược (Backcross) giữa *O.sativa* (indica) và *O..longistaminata.* Bao gồm những markers từ genome cây lúa (RG và RZ), lúa mì (CDO) và lúa mạch (BCD). Với 600 markers phủ trên 12 nhiễm sắc thể, Kurata và ctv (1994) dùng quần thể $F_2$ của Nipponbare(Japonica) và Kasalath (indica) lập bản đồ di truyền gen. Bản đồ được phủ trên 12 nhiễm sắc thể với tổng cộng chiều dài 1.575cM. Vị trí thiết lập bản đồ trên tâm động cũng được thiết lập với 170 RFLP markers (Singh và ctv.,1996).

#### *17.4.1.1. Lập bản đồ gen cho bệnh đạo ôn*

Nhiều gen trội liên quan với tính kháng bệnh đạo ôn đã được chứng minh, cũng như xây dựng bản đồ gen cho tính kháng bệnh này được thiết lập. Trên cơ sở dùng RFLP markers từ dòng đẳng gen Yu và ctv (1991) đã thiết lập hai gen bệnh đạo ôn *Pi-2(t)* trên nhiễm sắc thể số 6 và *Pi-4(t)* trên nhiễm sắc thể số 12 .Hai năm sau (Zhu và ctv 1993) đánh dấu bản đồ gen của bệnh đạo ôn với gen *Pi-zh* dùng RAPD markers và phát hiện với gen này nằm trên nhiễm sắc thể số 8. Sau đó (Wang và ctv 1994) đã thiết lập bản đồ với hai gen *Pi-5* trên nhiễm sắc thể số 4 và *Pi-7* trên nhiễm sắc thể số 11.

Naweed và ctv (1995) đã phối hợp hai phương pháp RFLP và RADP để thiết lập bản đồ và đánh dấu gen *Pi-10* từ nguồn Tongel (giống lúa của Nam Triều Tiên) với hai markers RRF6 (3.8±1.2cM) và RRH18(2.9±0.9cM). Hai markers này liên kết với gen ***Pi-10*** trên nhiễm sắc thể số 5. Mới đây D.H Chen (1999) dùng STS và AFLP markers để thiết lập bản đồ liên kết gen *Pi-44(t)* định vị trên nhiễm sắc thể số 11, hai markers AF348 và AF349 liên kết gen *Pi-44(t)* với khoảng cách di truyền 3.3±1.5cM và 11.0±3.5 cM, theo thứ tự.

#### *17.4.1.2. Lập bản đồ cho gen kháng bệnh bạc lá*

Gen kháng bệnh bạc lá có 19 gene có liên quan với gen kháng bệnh *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* đã được công bố (Ogawa, 1987, Kinoshita, 1991). Gen kháng bệnh bạc lá *xa-5* kháng với nòi 1, 2, 3, 4, 5 (Yoshimura và ctv 1984). Mc Couch và ctv (1991) thiết lập bản đồ *gen xa-5* liên kết với marker RG556, RG207 và RZ390.Mc Couch (1996) đã tìm ra hai microsatellite liên kết với *xa-5*, là RM122 có khoảng cách di truyền 2.1cM, và RM 13 có khoảng cách di truyền 17.9cM. Ning Huang và ctv đã thành công dùng marker RG556 để phát hiện gen kháng di truyền bệnh bạc lá *xa-5.*

Đối với gen *xa-13*, Zhang và ctv (1996) dùng RFLP và RAPD để thiết lập bản đồ trên gen này và xác định ba marker RZ28, CDO 116 và RG136. Marker RG136 có khoảng cách di truyền 3.8cM được áp dụng trong chiến lược MAS.

Gen *xa-21:* Đây là gen trội được tìm thấy từ *Oryza longistaminata* (Khush và ctv 1990) định vị trên nhiễm sắc thể 11. Ronald và ctv (1992) thiết lập bản đồ này với RFLP và ghi nhận hai marker RG103và RAPD 248 cùng với RAPD 818 liên kết với *xa-21* rất chặt. Cây chuyển gen *xa-21* đã được trồng tại IRRI để thí nghiệm.

#### *17.4.1.3. Lập bản đồ gen kháng rầy nâu*

Đối với rầy nâu, việc dùng marker để lập bản đồ gen rất phức tạp và khó khăn . Tuy nhiên năm 1994, nhóm khoa học gia người Nhật đã thiết lập bản đồ gen rầy nâu nhờ RFLP marker và xác định gen này trên nhiễm sắc thể 12. Lang và ctv (1999) tiếp tục phát triển gen này và dùng kỹ thuật STS marker để định vị gen kháng rầy nâu với khoảng cách di truyền 1.7 cM trên quần thể lúa hoang *Oryza australiensis*

#### *17.4.1.4. Lập bản đồ gen kháng sâu đục thân*

Bản đồ di truyền của gen kháng sâu đục thân được nhóm khoa học gia Trung Quốc thực hiện nhờ RFLP marker và xác định gen này định vị trên nhiễm sắc thể 4. (Tan và ctv 1993) liên kết với khoảng cách di truyền 4c.M trên quần thể của lúa lai của Trung Quốc.

### 17.4.2. Marker phân tử trong di truyền và chọn giống lúa

Hiện tại có hơn 2.300 DNA markers phân tử do Trường Đại học Cornell của Mỹ và hơn 600 markers từ Nhật trong chương trình Rice Genome cung cấp. Đây là cơ hội tốt để phát triển đa dạng sinh học di truyền trong phân nhóm các giống lúa. Những markers phân tử này được xem như là công cụ quan trọng trong chọn giống lúa nhờ markers phân tử (marker -assisted selection) đối với các tính trạng quan trọng. Dựa trên bản đồ DNA marker, người ta có nhiều hướng mới để phát triển các clone của gen và bản đồ vật lý trên cơ sơ phối hợp nhiều phương pháp khác đã được chọn lọc (Mc Couch và Tanksley, 1991).

### 17.4.3. Phát triển RFLP marker

RFLP đầu tiên được khám phá nhờ Tanksley và ctv. (1989), từ đó phương pháp này được phổ biến rộng rãi trong phân tích genome. Một số ghi nhận từ phương pháp RFLP như sau :

- RFLP được sử dụng trong chọn giống có ưu điểm hơn dựa trên hình thái học (morphological) và isozymes (Tanksley và ctv,1989, Kochert,1989).

- RFLP marker cho thấy trực tiếp DNA trên màn ảnh, thể hiện tính chất codominant. Điều này có ưu điểm giúp chúng ta dễ nhận dạng cây dị hợp tử và đồng hợp tử.

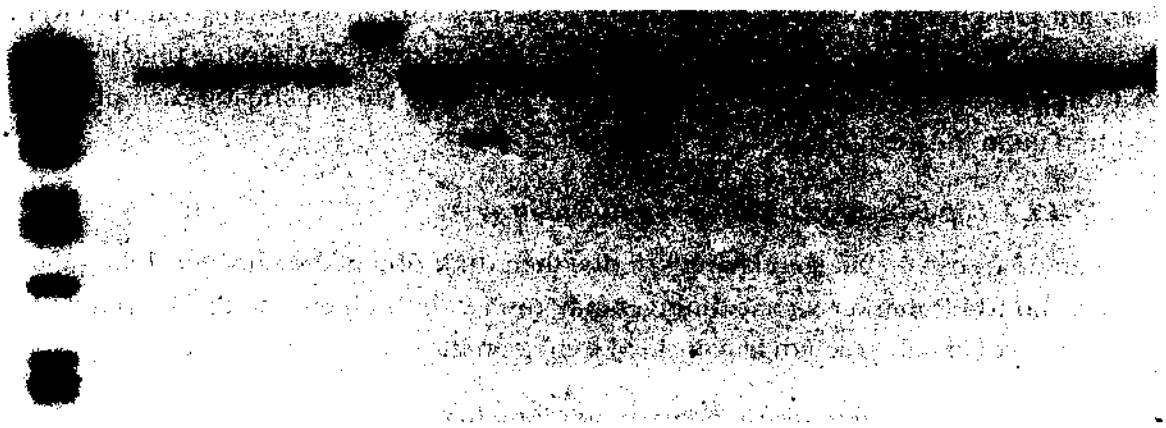
- Biến động các allen trong RFLP marker cao hơn dùng các phương pháp khác.

- RFLP marker có thể được sử dụng với mẫu ly trích DNA ở bất cứ giai đoạn nào.

- Phương pháp thử nghiệm RFLP không bị ảnh hưởng bởi môi trường đối với kiểu gen.

Nhờ ưu điểm của RFLP các nhà chọn giống rất thích áp dụng để phân tích DNA, RNA. Các nhà khoa học có thể đánh dấu gen và lập bản đồ phân tử các tính trạng số lượng và chất lượng. Bản đồ vật lý được thành lập trên người và cây con cũng dựa trên phương pháp này, vì độ chính xác cao của nó.

Phương pháp này dựa trên cơ sở kỹ thuật phân tích Southern hybridization, đòi hỏi số lượng DNA phải nhiều và chất lượng DNA phải cao.



*Hình 17.2: Band hình thông qua RFLP*

**Tài liệu tham khảo**


Causse MA, Fulton TM, Cho Y G, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harring ton SE, Second G, McCouch SR, Tanksley S.. 1994. Saturated molecular map of rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics 138(4): 1251-1271.

Chen. DH, delta Vina M, Inukai T, mackill DJ, Ronald PC, Nelson RJ.1999. molecular mapping of the blast resistance gene, Pi44(t) in a line derived from a durably resistanct rice cultivar. Theor. Appl. Genet. 98:1046-1053

Kochert,G.1989. Introduction to RFLP Mapping and plant breeding Applications. The Rockefeller Foundation, International Program on Rice Biotechnology.

Mc Couch ,S.R,. G. Kochert , Z.H. Yu,Z. Wang, G.S. Khush, W,R. Coffam and S.D Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Apple.Genet. 76:815-829

McCouch SR, SD Tanskley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeing and genetics. P. 109-133. in: Rice biotechnology.

Nguyen Thi Lang, PKSubudhi, SS Virmani, DS Brar and N.Huang 1998. A recessive gene tms-3(t) for thermosensitive genetic male sterility in rice (Oryza sativa L.) Omon rice 1998.29-36.

Nguyen Thi Lang, D.Brar, Gurdev S. Khush, Ning Huang and Bui Chi Buu, 1999. Development of STS markers to inentify brown planthopper resistance in a segregating population. Omon rice (7) 26-34.

Ronald, P.C., B.Albano, R.Tabien, M.L.P. Abenes, K.S. Wu, S.R. Mc Couch and S.D. Tanksley.1992. Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus Xa-21. Mol. Gen. Genet.236:113-120.

Saito, A., M. Yano, N.Kishimoto, M. Nakagahra, A. Yoshimura, K. Saito, S.Kuhara, U.Ukai, M.Kawase, T. nagamine, S. Yoshimura, O.Ideta, R. Ohawa, Y. Hauano, N.Iwata and Sugiura. 1991. Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. Jpn. Jbreeding. 41:665-670

Tanksley, S.D., N.D.Young, A.H.Paterson, and M.W.Bonierbale.1989. RFLP mapping in plant breeding. New tools for an old science. Biotechnology Vol.7:257-264.

Tanksley, S.D., and J.Hewitt.1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato a re-examination. Theor. Appl. Genet. 75:811-823.

Wang GL, Mackill DJ,Bonman M, Mc Couch SR, Champoux M, Nelson R 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1431.

Yu, L.X.and H.T.Nguyen.1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa L)*

Yu ZH, Mackill DJ, Bonman JM, Tanksley SD(1991) Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. Theor Appl Genet 81:471-476.

Zhu L, Chen Y, Ling Z, Xu Y, Xu J (1993) Identification of molercular markers linked to blast resistance gene in rice. In : You CB, Chen ZL Agric Biotechnol. China Science and technology Press, Beijing , China, P213.

Zhang, G.,E.R.Angeles, M.L.Abenes, G.S.Khush and n.Huang.1996. RADP and RFLP mapping for the bacterial blight resistance gene xa-13 in rice. Theor. Appl.Genet.93:65-70.

Wu KS, Tanksley SD. 1993. Abundance, polymorphism, and genetic mapping ofmicrosatellites in rice. Mol. Gen. Genet. 241:225-235

Wang, G., D.J. Makill, J.M. Bonman, S.R. Mccouch, M.C. Champoux,and R.J.Nelson.1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar genetics 136:1421-1434.

# 18. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ISOZYME

## 18.1. Mở đầu

Phần lớn dùng protein marker trong chọn giống là isozyme. Ứng dụng kỹ thuật isozyme còn được gọi là phân tử nhân nhiều băng hình (Marker và Mol 1959). Điện di có thể là tinh bột (starch gel electrophoresis) viết tắt (SGE), Polyacrylamid gel electrophoresis (PAGE), agarose gel, và Cellulose acetate membranes. Phổ biến nhất là SGE và PAGE. Có rất nhiều phương pháp, tuy nhiên chúng tôi giới thiệu phương pháp đơn giản nhất thường áp dụng tại IRRI.

## 18.2. Dụng cụ và hóa chất

Tris citrate
Sodium borate
Tris HCl
Các dung dịch nhuộm tùy theo các enzyme (có bán kèm theo)

## 18.3. Phương pháp

***18.3.1. Ly trích mẫu lá*** non, hoặc hạt nảy mầm 4 ngày, sẽ cho lượng protein cao hơn. Mẫu lá được nghiền trong cối Bio với đũa thủy tinh và dung dịch buffer.

***18.3.2. Dùng giấy Whatman,*** có kích thước theo mong muốn để nhẹ tay và ngấm dung dịch trích. Các lá này được sử dụng trong gel.

### *18.3.3. Chuẩn bị gel*

Dung dịch đệm gọi (buffer) : có ba dung dịch : Dung dịch nhuộm, dung dịch nấu gel và dung dịch chạy điện di. Tùy theo enzyme mà gel có hàm lượng tinh bột khác nhau.

Thí dụ nghiên cứu cho lúa :

Mỗi gel có hệ thống dung dịch I và dung dịch II. Đặt 50% glycerol trong mỗi bình mold. 77g tinh bột đặt vào bình 1000ml và 27,5ml buffer I thêm vào 522,5ml nước cất.

Dung dịch II : 58g tinh bột và 45 ml buffer II thêm 450ml nước cất. Các dung dịch trên phải được đun nóng và đặt vào khay. Chú ý tránh bọt khí.

### 18.3.4. Loading

Mỗi gel mold dùng plastid film cho mỗi đầu. Dùng dao cắt gốc gel theo đường thẳng.

Nhỏ 1% bromphenol blue vào giấy filter (giấy này đã thấm dung dịch ly trích)

Chèn các tấm filter theo dọc đường gel bị cắt theo thứ tự, chú ý tránh chồng các tấm giấy lên nhau. Chú ý trước khi thực hiện nhớ đánh dấu từ trái tới phải của gel.

### *18.3.5. Điện di*

Nối hai cực + và -, và cho chạy với 50mA trong 4 giờ. Chú ý nên để điện di trong phòng mát 4°C

### *18.3.6. Nhuộm*

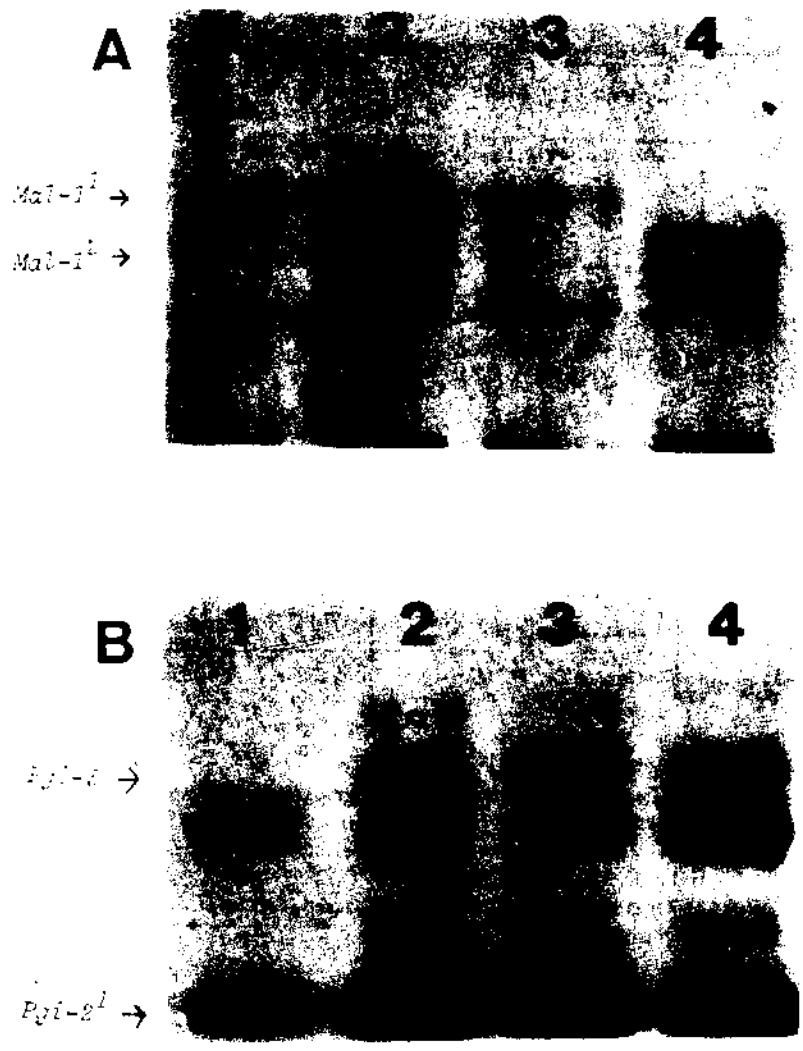
Sau khi chấm dứt chạy điện di, mang gel ra nhuộm trong dung dịch nhuộm

Rửa gel trong acid acetic để loại bỏ màu

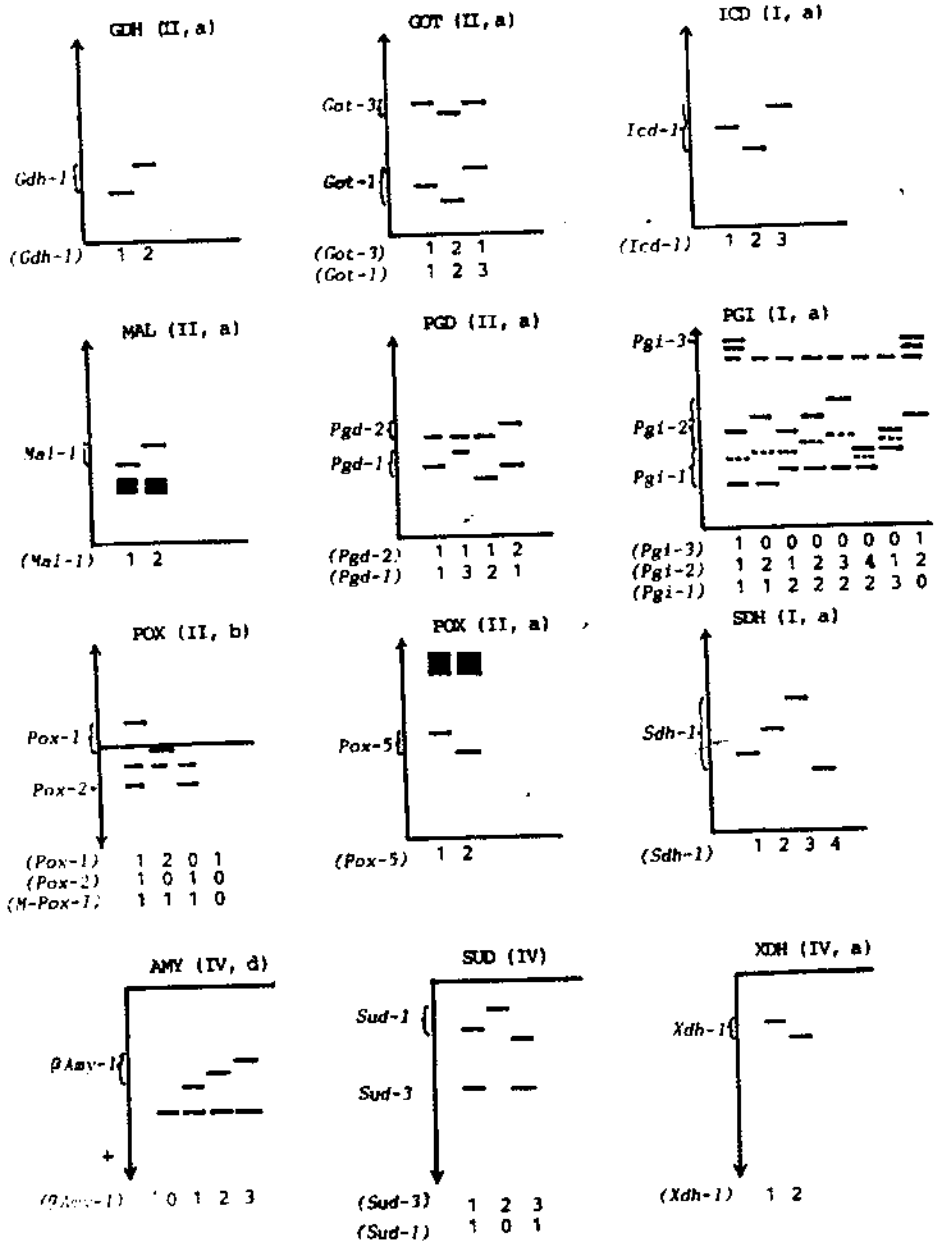
### *18.3.7. Phơi khô gel*

Gel có thể chụp hình sau khi nhuộm, lấy giấy plastic bao gel lại

Hình minh họa cho chạy isozme (hình 18.1), Các kiểu allel trong isozyme (hình 18.2)




*Hình 18.1: Băng hình isozyme*




**Diagramatic representation of zymograms of 19 enzyme species.**

**1) Assay system—I: Starch, gel=tris, histidine, electrode=tris, citrate (ref. 2, 8, 23), II: Starch, gel=tris, citrate, electrode=Na borate (ref. 2, 8, 23), III: Agar (ref. 11), IV: Polyacrylamide (ref. 1).**

**2) Organ used—a: plumule, b: matured leaf, c: emerging leaf at tillering stage, d: germinating seed.**

*Hình 18.2: Kiểu hình isozyme*

### 18.4. Ứng dụng

Nhiều kết quả nghiên cứu thành công trong phân tích isozyme marker

- Trong phân nhóm di truyền cây lúa (Tạo, 1998)

- Phát hiện gen mới trong cây lúa giữa japonica và indica (Morishima.1990) và rất nhiều tài liệu khác phân tích về marker này.

Sự liên kết gen (Ishikawa.1990)

**Tài liệu tham khảo**

Morishima. H, J. C. Glaszmann. 1990 Current status of isozyme gene symbols. Rice genetics Newsletter. Vol 7: 50-57

Marker, C.L and Moller, F 1959 Multiple forms of enzymes, tissues, ontogenetic and species specific pattern. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America 45: 753-756

Ishikawa. R. Analysis of two isozme genr, Mal-1 and Pgi-3 and their frequencing in indica and japonica. Rice genetics Newsletter. Vol 7: 100-103

# 19. KỸ THUẬT AFLP

## 19.1. Mở đầu

Kỹ thuật AFLP viết tắt từ Amplified fragment length polymorphism. Có rất nhiều phương pháp khác nhau, tuy nhiên chúng tôi xin giới thiệu phương pháp đơn giản nhất là : Phân tích AFLP theo Maheswaran (1996)

## 19.2. AFLP thông qua đồng vị phóng xạ

Các giai đoạn sau

Cắt DNA của genome cây trồng

DNA được phân cắt với enzyme *Pst* 1 và *Mse* 1.

Ly trích DNA (xem phần ly trích DNA)

Các bước cho phản ứng:

1. Lấy 20 DNA và 20µl của hai enzyme *Pst* 1 và *Mse* 1 ú trong nhiệt độ 37°C trong 8 giờ trong dung dịch phân cắt (10mM tric Hac, pH 7,5, 10 mM Mg Ac 2 , 50 mM Kac, 5 mM DDT và 0,005% BSA)
2. Nối t DNA : 10µl dung dịch : 5p Mol *Pst* 1, 50p Mol *Mse* 1, 1 µl của 10 mM ATP, 1 unit T4 DNA và 2µl dung dịch nối DNA. Dung dịch được ú nhiệt độ 37°C trong 6 giờ.
3. Chuỗi sequence cả hai enzyme được tổng hợp như sau :

   *Pst* Adapter :

   5′- CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3′

   3′- CATCTGACGCATGT-5′

   *Mse* 1 Adapter :

   5′- GACGATGAGTCCTGAG - 3′

   3′- TACTCAGGACTCAT - 5′

***Khuyếch đại DNA***

Tiền khuyếch đại

Hai primer để khuyếch đại DNA là *Pst* 1 ye61 và *Mse* 1 : Phản ứng như sau :

25µl cho 50 người của primer *Pst* 1 và 50 người của *Mse* 1 primer, 5 µl của 1 mM dNTPs, 2,5 µl của 10X PCR buffer (100 mM Tris- HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ ) 1 của *Taq* polymere và 2µl DNA.

Chu kỳ khuyếch đại là 30 chu kỳ như sau:

| Giai đoạn | | Nhiệt độ | Thời gian | Ghi chú |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 30 chu kỳ | 94 | 30 giây | |
| | | 60 | 30 giây | |
| | | 72 | 1 phút | |
| 2 | | 72 | 5 phút | |

***Chọn sự khuyếch đại***

Sự khuếch đại được sử dụng hai primer cho AFLP, một là *Pst* 1 và khác là *Mse* 1

Mỗi primer có chứa ba base cuối đầu mang 3'.

Thí dụ

*Pst* 1 ( P1) : 5 GACTGCGTACATGCAGCCA-3'

*Mse* 1 (M1) : 5/ GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'

Tách đoạn khuyếch đại

Label với ($P^{32}$ ) dCTP hoặc ( $P^{32}$) ATP.

***Phản ứng PCR :***

Trộn 25 µl thành phần gồm 5µl DNA , 50 người *Pst* 1, 50 *Mse* 1, 0,2 mM cho mỗi dATP, dGTP, dTTP, 4,75 µl của 1mM dCTP, 0,25µl của P32) dCTP, 1 unit *Taq* DNA polymerase và 2,5 µl của 10x PCR buffer.

| Giai đoạn | | Nhiệt độ | Thời gian | Ghi chú |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 chu kỳ | 94 | 30 giây | |
| | | 65 | 30 giây | |
| | | 72 | 1 phút | |
| 2 | 10 chu kỳ | 56 | 5 phút | |
| | 24 chu kỳ | 56 | 30 giây | |

***Chạy điện di :***

Sản phẩm PCR được nhuộm với formamide, 10mM EDTA, 0,005% cho mỗi xylene cyanol và bromophenol blue) nung 3 phút với nhiệt độ 94°C, để vào đá ngay tức khắc.

Trộn ( 2,5 µl) được load vào gel polyacrylamide trong 2 giờ.

Gel được chuyển sang 3mM giấy lọc Whatman, phơi khô 2 giờ và được phát triển X-ray film trong 24 giờ.

Đo đếm băng hình.

## 19.3. Phương pháp AFLP không dùng phóng xạ

Các kit này được bán sán tại công ty

1. Phân cắt DNA

   DNA được phân cắt với enzyme : *Eco*RI và *Mse*I,

2. Nối với các adapters

3. PCR thông qua hai giai đoạn

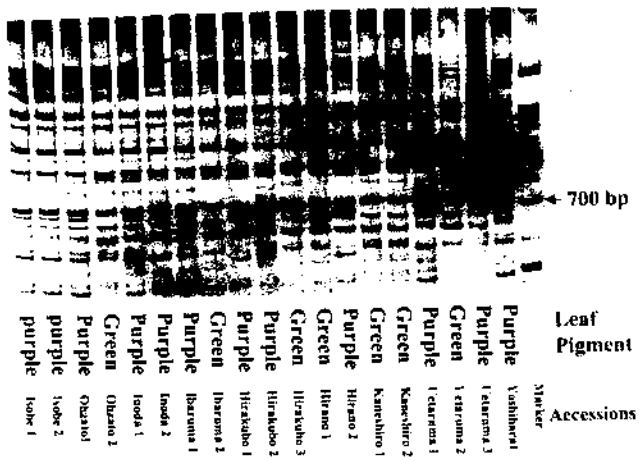
4. Tiền khuyếch đại, primer của *Eco*RI + A/ *Mse* I + C

5. Chọn khuyếch đại : mẫu được chuẩn bị và pha 20- 100 lần từ dung dịch tiền khuyếch đại

6. Chuyển mẫu vào giếng trên polyacrylamide gel.

7. Cuối cùng nhuộm bạc (giống như phương pháp SSR)

Qua hình 19.1 ta thấy băng hình dùng kỹ thuật AFLP có rất nhiều băng




*Hình 19.1: Băng của AFLP*

## 19.4. Ứng dụng

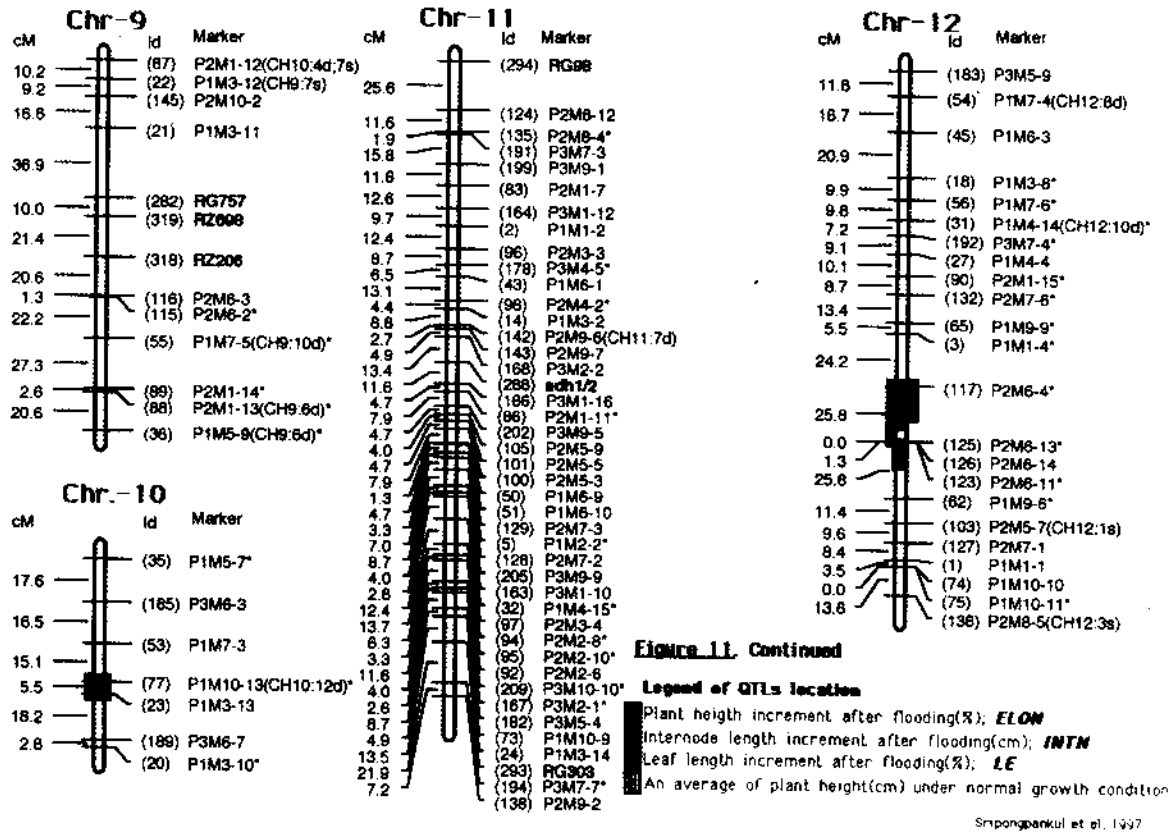
Kỹ thuật AFLP được nhiều nhà khoa học áp dụng: Phân nhóm di truyền, bản đồ gen, cloning, kỹ thuật "finger printing" (in dấu tay)

+ Phân nhóm di truyền gen khoai lang (Liu, 1999)

- AFLP-based cloning được thực hiện trên khoai lang (Liu, 1999)

- Tách được quần thể (Maheswaran, 1996)

- Bản đồ thành công nhất nhờ AFLP là bản đồ gen QTL tìm gen chống chịu mặn (Gregorio, 1997), gen vươn lóng (Krishnapong, 1998) (hình 19.2)




*Hình 19.2.*

## Tài liệu tham khảo


Gregorio, G.B.1997. Mapping for the gene saltolerance.1997. thesis, PHD

Krishnapong Sripongpankul, 1998. Gene mapping and QTL analysis of flood tolerance in rice. Thesis, PHD.

LiuXiao chuan, 1999. AFLP-based gene cloning for anthocyanin pigmentation in Sweet Potato Final report . JIRCAS, Vol 8: 233-255

M. Maheswaran, P.K.Subudhi, S. nandi, J.C.Xu. A.Parco.D.C.Yang. N.Huang. Polymorphsm, distributon and segregation of AFLP in a doubled haploid rice population. TAG 00:000

# 20. KỸ THUẬT SOUTHERN BLOTTING

## 20.1. Mở đầu

Kỹ thuật Southern blotting là kỹ thuật chuyển DNAb từ agarose gel vào một màng lọc (nylon)

Phương pháp Southern blotting (Southern, 1975) đã góp phần rất lớn cho việc nâng cao phân tích genome trong công nghệ sinh học. Kỹ thuật Southern blotting là kỹ thuật quan trọng, là nền tảng cơ bản cho việc giải quyết các vấn đề còn nghi ngờ, khiếm khuyết về cấu trúc gen. Người ta có thể dùng kỹ thuật Southern blotting để áp dụng trong hệ thống acid nucleic không đồng vị phóng xạ hoặc có đồng vị phóng xạ.

Một tiêu biểu trong khi dùng Southern blotting để lai plamid - plamid, người ta cắt DNA bằng enzyme tương ứng rồi chạy điện di. Một plamid (tấm gel) được ly trích để chuẩn bị nhân bản vô tính. Trong kỹ thuật RFLP, trước khi lai người ta cũng phải thực hiện Southern blotting. Ngoài ra phân tích Southern còn cho biết chính xác vị trí của các gen trong các kỹ thuật như SSR, STS, RAPD.

## 20.2. Hóa chất

Agarose

Trizma base

Acid acetic glacial

NaOH

HCl

EDTA

*Dụng cụ:*

Bể đựng

Giấy parafine

Giấy Whatman

Máy lắc

## 20.3. Phương pháp

### *20.3.1. Chạy điện di trên gel*

1. Sửa soạn agarose gel từ 0,8-1% nồng độ agarose và chạy với dung dịch 1X TAE. Thể tích tùy thuộc vào kích cỡ gel. Thí dụ trong thí nghiệm này cần 18x30cm$^2$ gel, cần chuẩn bị 300ml agarose cho dung dịch.

2. Đựng dung dịch agarose gel trong microwave khoảng 5-10 phút, sau đó để nguội nhiệt độ 50°C trước khi thêm vào 5µl ETBr (10mg/ml)

3. Chuẩn bị parafilm và các giấy file

4. Loading DNA vào gel và chạy điện di thời gian kéo dài với hiệu thế 40Volts

5. Sau khi chạy điện di xong, chụp hình trên UV, để phát hiện DNA

### *20.3.2. Cách đánh giá DNA trên gel*

1. Nếu DNA trên gel xuất hiện phẳng và thể hiện phân cắt băng rất rõ, DNA hoàn toàn được phân cắt

2. Nếu DNA trên gel xuất hiện không phẳng và thể hiện phân cắt băng rất rõ, DNA không hoàn toàn phân cắt

3. Nếu phân cắt DNA trên hình thấy rất lợt. Chúng ta cần tăng số lượng DNA gấp đôi

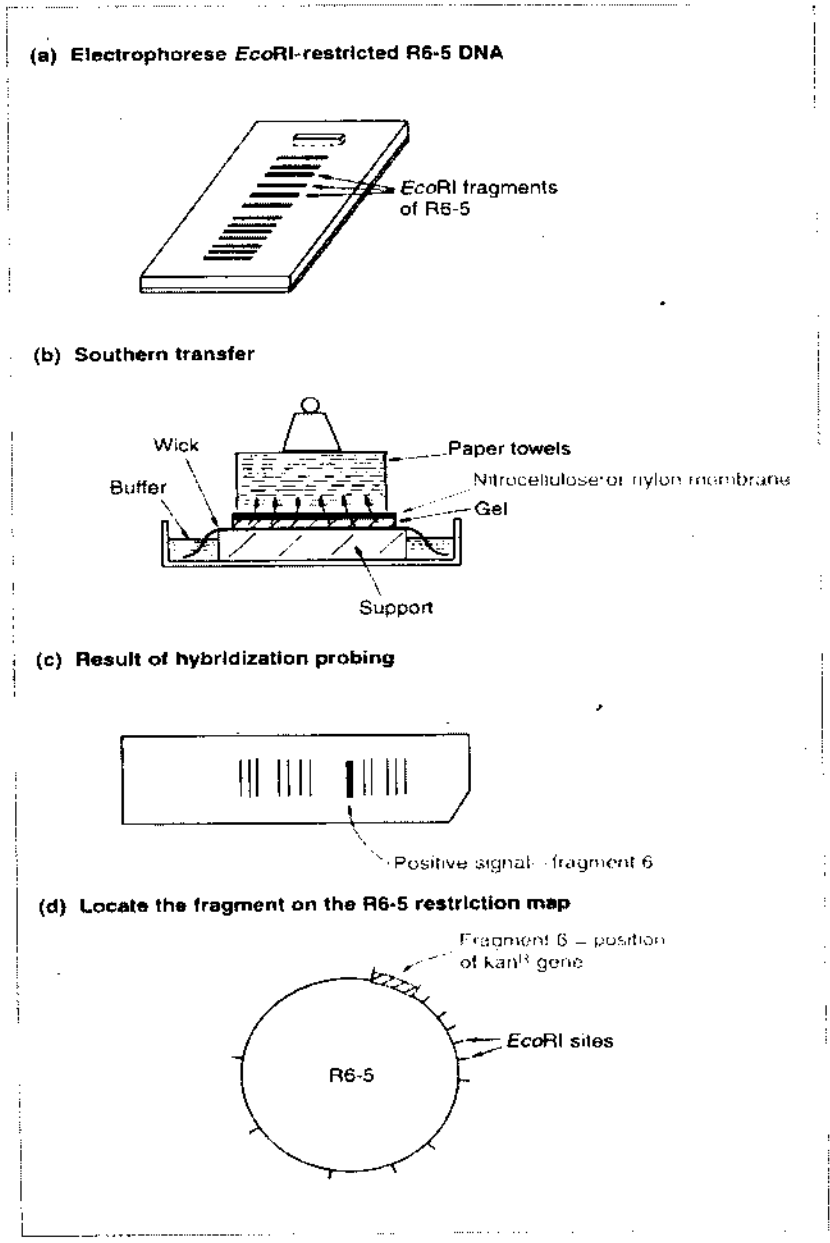
### *20.3.3. Xử lý gel*

1. Sau khi gel chạy điện di xong, lấy nó ra khỏi máy điện di và cho vào dung dịch 0,25M HCl, lắc đều trong 10 phút. Khi nào đổi màu thì ngưng.

2. Mang gel ra và rửa gel trong nước cất, để sang dung dịch 0,4M NaOH trong thời gian 20 phút trên máy lắc

### *20.3.4. Phân tích Southern*

- Đổ đầy 0.4M NaOH vào bể, đặt lên hai tấm giấy Whatman
- Đặt gel lên tấm giấy Whatman, chú ý lúc này tránh bọt khí
- Cắt một tấm (hybond N+) giống với kích thước của gel, dùng một mảnh parafine đặt chặn các đầu gel (tránh DNA di chuyển ra ngoài)
- Cắt một tấm Whatman đặt trên tấm gel
- Dùng khoảng nửa gram giấy đặt trên tấm Whatman
- Đặt một quả cân nặng trên khoảng 1 kilogram
- Thời gian theo dõi qua đêm




*Hình 20.1: Các bước của kỹ thuật Southern Blotting*

## Tài liệu tham khảo

Southern E.1975. Detection of specific sequencing among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. bio 98,503-517

# 21. PHƯƠNG PHÁP NORTHERN BLOT

## 21.1. Mở đầu

Giống như phương pháp Southern blot , tuy nhiên phương pháp Northern blot dùng để xét nghiệm RNA, còn phương pháp Southern blot phục vụ xét nghiệm DNA.

## 21.2. Dụng cụ

Agarose

Formaldehyde

Máy điện di

Ethidium bromide

SSC

Calf thymus DNA

## 21.3. Phương pháp

1. Nấu 1,2% agarose formaldehyde gel, để nguội và đổ vào khung chứa gel. Trộn 1,5% agarose 2,63g BRL agarose với 1,75ml 10X helpers buffer, và nước cất để cuối cùng thể tích là 145 ml, để nguội và đổ vào formaldehyde gel.
2. Rửa các dụng cụ cần thiết bằng nước cất và cồn 70%
3. Chuẩn bị RNA (số lượng khoảng 20μg) được load trên gel, ngâm gel trong nước cất có pha ethidium bromide trong 10 phút.
4. Cho gel vào đĩa thủy tinh phẳng. Bên ngoài chung quanh được bao phủ giấy parafine và giấy Whatman
5. Thêm 20X SSC (3M NaCl, 0,3 M Na 3, citrate, pH 7) vào giấy lọc
6. Đặt gel lên giấy thấm, chú ý ghi nhãn cẩn thận tránh nhầm lẫn
7. Cắt giấy nitrocellulose bằng kích thước gel
8. Nhúng ướt tấm nitrocellulose và phủ tấm này trên gel. Chú ý tránh bọt khí
9. Cắt 3 - 5 mảnh giấy Whatman đặt trên gấy nitrocelluclose
10. Lấy một gram giấy thấm đặt trên giấy Whatman
11. Lấy một quá cân 1 kg đè lên giấy thấm
12. Quá trình blot được qua đêm
13. Sáng hôm sau, lấy giấy bỏ vào thùng. Thu lại giấy nitrocellulose
14. Rửa filter trong dung dịch 2X SSC trong 10 phút, nhớ lắc nhẹ
15. Bao giấy nhôm tấm filter và sấy ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ
16. Mẫu filter có thể chuẩn bị cho lai

# 22. PHƯƠNG PHÁP WESTERN BLOTTING

## 22.1. Mở đầu

Phương pháp Western blotting được dùng trong việc xét nghiệm protein. Băng protein từ polyacrylamide gel được chuyển vào giấy lọc.

Xét nghiệm hoạt động gen Chitinase protein hoặc Bt protein được áp dụng tại nhiều phòng thí nghiệm chuyển nạp gen cây lúa. Cây chuyển gen đã thành công, đối với gen Chitinase có độ lớn khoảng 35 kD và gen BT protein khoảng 65kD.

## 22.2. Phương pháp

### *22.2.1. BT protein*

1. Chọn mẫu. Chọn khoảng 0,8 gram lá tươi từ cây chuyển gen, cắt ra thành nhiều mảnh.
2. Một số lượng dung dịch ly trích.
3. Nghiền mẫu trong cối, chuyển sang ống nghiệm 1,5ml.
4. Ly tâm hai lần (lần đầu 10 phút, lần thứ hai 5 phút) sau mỗi lần lấy supernatant đưa vào ống nghiệm mới.

### *22.2.2. Đánh giá protein*

1. Chuẩn bị với 50 phản ứng
2. Lấy pipet 2, 4, 6, 8 µl BSA vào trong giếng, tạo 10 µl nước cất
3. Lấy pipet đựng 2µl protein ly trích, bỏ vào giếng, thêm vào 10µl nước cất
4. Thêm 200µl phản ứng cho tốt
5. Đậy và ủ trong 30 phút
6. Đọc giá trị hấp thu trên máy ở độ dài sóng 550nm
7. Chuẩn bị đường chuẩn hấp thu BSA
8. Dùng tiêu chuẩn đường cong để quyết định nồng độ protein

### *22.2.3. Chuẩn bị mẫu*

1. Lấy 50µg dung dịch protein
2. Thêm vào 6X dung dịch với thể tích (40µl tổng số, thêm 5µl của 6X buffer)
3. Làm nóng trong 2 phút, ở water bath, chuyển sang hộp đựng đá ngay lập tức.

### *22.2.4. Chuẩn bị gel*

1. Chuẩn bị gel và đổ đầy vào khung với 1X SDS buffer
2. Load 30- 40 µl mẫu, chạy gel : 20mA (trên), và 30aM (gel dưới)
3. Trong lúc chạy gel, chuẩn bị chuyển dung dịch
4. Cắt tấm giấy Whatman với kích thước 3MM, 7,0 x10cm và nitrocellulose NCM (0,2µm) là 6X9 cm
5. Sau khi chạy, chuyển gel.

### *22.2.5. Chuyển blotting*

1. Ngâm gel và NCM trong 1 X dung dịch chuyển tối thiểu 15 phút. Cắt miếng nhỏ
2. Chuyển blot ở nhiệt độ 4°C
3. Đặt vào thùng và chuyển nó vào trong phòng.

### *22.2.6. Tách và rửa*

*1. Rửa,* ngâm NCM trong 50ml, PBS hoặc TBS trong 5 phút

| | |
|---|---|
| PB dung dịch | (0,2M PB pH 7,2 $NaH_2PO_4$) |
| PBS dung dịch | (10mM PB, 0,9% NaCl) |
| PBS | 600ml |
| PB stock | 30ml |
| NaCl | 5,4g |

*2. Blocking*

Sau khi rửa, NCM ở 45°C và block dung dịch, ủ 1-2 giờ trong phòng

Dung dịch Blocking

PBST (TBST) sữa (0,05% Tween 20, 5,0% sữa ) 500ml PBST sữa cho hai tấm

| | |
|---|---|
| PBS | 500ml |
| Tween 20 | 0,25ml |
| Milk | 25g |

*3. Kháng thể (antibody) sơ cấp*

Thêm vào 3µl chitinase (hoặc 9µl Bt) trong 45ml. PBS- BSA. Nhúng NCM ở 45°C ủ trong 1-2 giờ sử dụng PBS, nếu sử dụng TBS phải mất 24 - 36 giờ.

PBS (0,3%BSA, 100ml cho hai tấm)

| | |
|---|---|
| PBS | 100ml |
| BSA | 0,3g |

Rửa

Đầu tiên bỏ antibody, ly tâm rửa giấy lọc với 100ml. sữa PBST trong 4 lần

*4. Cột, nối kháng thể*

Thêm vào 6µl kháng thể (alkaline phosphatase trong 20 ml PBS-BSA (1: 3500-400). NCM vào dung dịch trong 1 giờ, hoặc thêm 30 µl cho kháng thể thứ cấp (Conhugated peroxidase / antibody) trong 45 ml TBS- BSA (1: 1500). Nhúng NMC vào dung dịch qua đêm.

*5. Rửa*

Rửa giấy lọc với 100ml PBST (TBST) ba lần mỗi lần 10 phút

*6. Rửa lần cuối*

Rửa giấy lọc với 50 ml PBS (TBS) trong 5 phút.

***22.2.7. Rửa màu***

Alkaline phosphatase

1. Chuẩn bị 40 ml dung dịch trong hai tấm : Thêm 0,4mL A và o,4 ml B tới 40µl AP develop màu
2. Nhúng giấy lọc vào dung dịch, ủ 10- 40 phút
3. Dừng ngay tức khắc khi màu xuất hiện, nhúng trong nước hai lần
4. Phơi khô giấy và giữ trong polyester

Hệ thống Perodidase

1. Cân Na12mg HRP và hòa tan trong 4µl MOH
2. Thêm 20ml TBS và 12 µl $H_2O$. Cách develop màu giống như giai đoạn trên.

***22.2.8. Chitiase protein***

*A. Chuẩn bị mẫu,* cách làm tương tự như Bt protein

*B. Làm gel*

1. Sau khi bỏ lượt ra, cố định trong 1X DSD buffer
2. Load mẫu
3. Chạy 20-30mA cho hai giờ
4. Trong lúc chạy gel cắt các mảnh giấy lọc

*C. Blotting*

1. Sau khi chuyển sẽ vặn chặt lại. Lắc 30mL dung dịch Blocking (3% BSA trong 1X TBST) ở nhiệt độ 60 phút
2. Ngâm hai lần với 30ml TBST và lắc trong 5 phút, bỏ TBST
3. Thêm 30ml TBST và kháng thể (1: 1000, hoặc 1:1500 hoặc 1: 2000) thêm 30 µl của 1% merthiolate
4. Lắc chậm trong hai giờ
5. Bỏ antibody và ngâm với 30mL TBST
6. Rửa với 25ml TBST trong 5 phút, lập lại 5 lần
7. Thêm 30ml TBST và 30µl của 10% merthiolate + 20µl của Peroxidase/ antibody IgG. Lắc ở nhiệt độ trong phòng
8. Ngâm với 25ml 1X TBS. Rửa với 25mL 1X TBS trong 5 phút
9. Thêm dung dịch phát triển màu. Để vào dung dịch phát triển màu trong 10 phút.
10. Bỏ dung dịch phát triển màu, rửa với nước cất ba thần. Phơi khô với giấy và đậy giấy nhuộm và plastic. Dự trữ ở điều kiện nhiệt độ -20°C

## 22.3. Dung dịch và phản ứng

***Dung dịch ly trích mẫu***

0,5M Tris HCl pH 7,0

10% glycerol

0,1 mM PMSF (phenylmethyl sulphonyl fluoride)

***Dung dịch mẫu:***

12,5 mM Tris, pH 6,8, 20% glycerol, 2% SDS, 0,001% bromphenol blue (BPB), 2% M 2-ME

2x 10ml dung dịch

4ml nước cất, thêm 0,152g Tris + 2ml glycerol + 0,2 g SDS + 0,2ml 2-ME + 0,1 mg BPB. pH 6,8 với HCL, lên phản ứng 10ml

***5X SDS cho dung dịch điện di***

Hoà 15,1 Tris base, 72g NaCl trong 400 ml nước cất. pH 7,9 với 2,7ml HCl, đưa thể tích lên 500ml

**1x TBS** : Hòa 100ml của 10X TBS tới 1 lít

**TBST** : Thêm 100ml của 10x TBS, 0,5ml Tween trong 1 lít

**Blocking** : hòa 0,9 g BSA trong 3ml TBST

***Phát triển màu :***

Hòa 12 mg của HRP với 4ml ethanol. Trộn dung dịch 20ml 1X TBS và thêm 12 µl nước

*Anode buffer 1:* Để chuẩn bị 500ml, cần thêm 18,1 Tris plus trong 100ml của methanol tới 350 ml nước cất, pH 10,4 với 10N Na OH và thêm nước vào cho tới 500ml

*Anode buffer 2:* Để chuẩn bị 500ml dung dịch : thêm vào 1,51 g Tris, 100 methanol, 350 ml nước cất, pH 10.4 với 10N NaOH, đổ nước thêm cho thể tích là 500ml

***Cathode buffer :***

1. Để chuẩn bị cho 500ml, hòa 1,51 g Tris, 2,62 g 6- aminocaproic acid trong 100ml methanol, 350 ml nước cất, pH 9,4 với NaOH, thêm nước vào cho tới 500ml

2. 30% acrylamide 0,8% bisacrylamide : hòa 30g acrylamide và 0,8 g bis acrylamide trong 100ml nước cất.

3. Lọc qua 0,2 mm filter và dự trữ 4°C

4X Tris / SDS ph8.8 : hòa tan 18,2 g Tris base và 0,4 g SDS trong 80 ml nước cất. pH 8,8 với HCl và cần thể tích 100ml.

4. Lọc và dự trữ trong 4°C

10% ammonium persulfate:

5. Hòa 0,1 g ammonium persulfate trong 1 ml nước cất

**12% tách gel**

| Thành phần | 2gel |
|---|---|
| 30% acrylamide 0,8% bisacrylamide | 6,4ml |
| 4X tris /SDSpH 8,8 | 4ml |
| Nước cất | 5,6ml |
| 10%APS | 53,4µl |
| TEMED | 10,6µl |

**4% Stacking gel**

| Thành phần | 2gel |
|---|---|
| 30% acrylamide 0,8% bisacrylamide | 0,533ml |
| 4X tris /SDS pH 6,8 | 1ml |
| Nước cất | 2,467ml |
| 10% APS | 31,5 µl |
| TEMED | 6,3µl |

# 23. ĐÁNH DẤU DNA

## 23.1. Giới thiệu

Phương pháp này nhằm phục vụ cho kỹ thuật lai DNA và đây là giai đoạn đầu trong phân tích nhiễm sắc thể. Trong kỹ thuật RFLP, khi dùng đồng vị phóng xạ người ta cũng cần đánh dấu các probe. Do tiếp xúc với đồng vị nên việc đánh dấu nên có phòng cách ly và mỗi ngày phải kiểm tra độ phóng xạ trong phòng. Nếu cần phải mang mặt nạ để tránh ô nhiễm cho bản thân và người chung quanh.

## 23.2. Dụng cụ và hoá chất cần thiết

Nick Translation labeling

Random primer labeling kit

Biotin 14 dATP

Biotin -16 dUTP

Digoxigenin -11 dUTP

## 23.3. Cách thực hiện

Có hai phương pháp sử dụng trong kỹ thuật này

1. Phương pháp thông dịch (translation)
2. Phương pháp dùng primer một cách ngẫu nhiên với Biotin 14 -dATP hoặc Biotin -16-dUTP

Cá hai phương pháp đều phải cần 1 µg DNA được phân cắt bất cứ enzyme nào và sau đó dùng DNA được đánh dấu.

Những DNA được đánh dấu được xem như thể probe, còn được gọi là lai in-situ

Để quyết định hiệu quả của đánh dấu người ta thực hiện các bước sau đây:

1. DNA (1 µl) được pha với nồng độ 50ng, 5,0ng, 0,5 ng và các DNA được blot trên một miếng file nhỏ gọi là (nitrocellulose membrane) hay Hybond N+, Amersham). Màng lọc được phơi khô ở nhiệt độ trong phòng (RT) và sấy 80°C trong 30 đến 60 phút.
2. Tấm màng lọc được phơi được chuyển vào một túi gọi là (túi lai : hybridization bag) chứa 3% BSA (Bovine serum allumin) dung dịch buffer 1 (0,1 M Tris HCl với pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM $MgCl_2$ , 0,05% Triton x100) và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ 42°C với máy lắc. Sau đó nó được chuyển sang một túi mới có chứa 0,2% avidin alkaline phosphatase (AP) trong buffer 1 và ủ trong 10 phút ở RT.

3. Màng này lọc được rửa ba lần trong dung dịch buffer 1, thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT) và lắc trên máy. Sau đó rửa ba lần với dung dịch 2 (0,1M tris HCl pH = 9,5, 1M NaCl, 5 mM $MgCl_2$) ở nhiệt độ trong phòng, trong 10 phút. Chú ý giai đoạn này phải lắc thật nhẹ.

4. Màng lọc được chuyển vào một túi mới chứa NBT và BCIP (10µl mỗi loại) trong dung dịch 3 (0,1M Tris HCl pH = 9,5, 0,1 M NaCl, 5 mM $MgCl_2$), chú ý túi được bọc với giấy nhôm và ủ ở nhiệt độ trong phòng, thời gian 3 giờ, và nhanh nhất 15 phút, tùy thuộc vào dấu hiệu xuất hiện những vệt lai. Phản ứng màu sẽ dừng lại sau khi rửa bởi nước cất. Màng lọc được phơi khô trong tối và chụp ảnh.

**23.4. Ứng dụng**

- Phục vụ cho kỹ thuật RFLP
- Phục vụ cho GISH
- Phục vụ cho phương pháp FISH
- Phục vụ cho nhân bản vô tính
- Ly trích một gen
- Kiểm tra cây chuyển gen

# 24. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH KIỂU NHÂN (KARYOTYPE)

## 24.1. Phân tích kiểu nhân trên lúa hoang

Đối với lúa hoang, có nhiều đặc tính phong phú, Oryza *autraliensis* ( 2n=24 EE kháng rất cao đối với rầy nâu (BPH), và bệnh bạc lá (BB). O. *brachyantha* (2n=24FF) kháng bệnh đạo ôn, bạc lá và rầy nâu *O. rufipogon* có nguồn gen kháng phèn rất tốt. Các genome này hạn chế khi chuyển gen sang lúa thường. Tuy nhiên với kỹ thuật di truyền hiện đại người ta có thể cứu sống phôi mầm để chuyển gen này vào lúa thường.

### *24.1.1. Phân tích lúa hoang*

*Bảng 1:* **Số mẫu được điều tra thu thập (1995 - 2001) tại Ngân hàng gen Viện Nghiên cứu Lúa ĐBSCL**

| Species | Accession | Địa điểm điều tra |
|---|---|---|
| *Oryza rufipogon* | 96 | Đồng Tháp Mười |
| *Oryza rufipogon* | 55 | Cần Thơ |
| *Oryza rufipogon* | 14 | Bạc Liêu |
| *Oryza rufipogon* | 2 | Long An |
| *Oryza rufipogon* | 12 | Đồng Tháp |
| *Oryza rufipogon* | 11 | Tiền Giang |
| *Oryza rufipogon* | 5 | Bến Tre |
| *Oryza rufipogon* | 23 | Kiên Giang |
| *Oryza rufipogon* | 6 | An Giang |
| *Oryza rufipogon* | 2 | Vĩnh Long |
| *Oryza rufipogon* | 1 | Trà Vinh |
| *Oryza rufipogon* | 6 | Cà Mau |
| *Oryza afficinalis* | 13 | Việt Nam |
| *Oryza afficinalis* | 3 | Thái Lan |
| *Oryza afficinalis* | 2 | IRRI |
| *Oryza australiensis* | 1 | chưa rõ nguồn |
| *Oryza glaberima* | 1 | chưa rõ nguồn |
| *Oryza ridleyi* | 1 | IRRI |
| *Oryza punctata* | 2 | Kenya |
| *Oryza brachyantha* | 1 | IRRI |
| *Oryza nivara* | 1 | Myanmar |
| *Oryza nivara* | 7 | India |
| *Oryza nivara* | 2 | Thái Lan |
| *O.longistaminata* | 1 | IRRI |

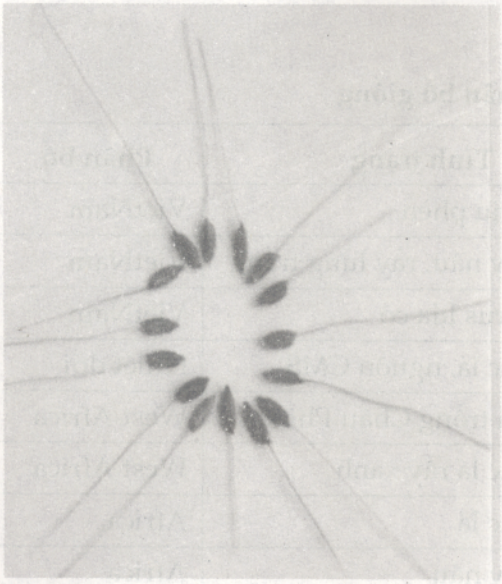
| | | |
|---|---|---|
| O.*minuta* | 3 | IRRI |
| O.*latifolia* | 1 | IRRI |
| O.*barthii* | 1 | IRRI |
| O.*punctata* | 2 | IRRI |
| O.*glaberrima* | 1 | IRRI |
| O.*alta* | 1 | IRRI |
| O.*grandiglumis* | 1 | IRRI |
| **Tổng số** | **285** | |

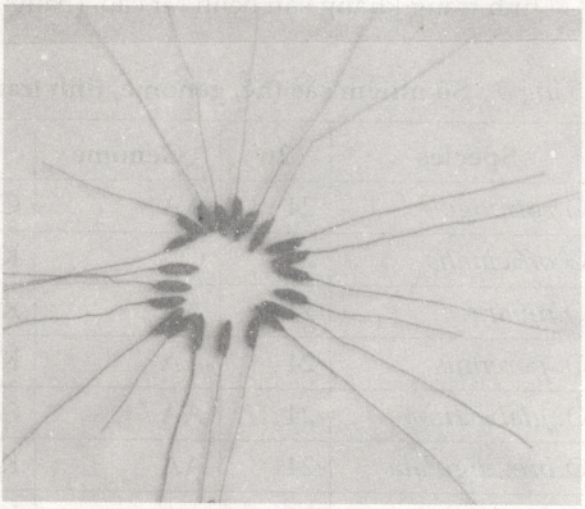
**24.2. Phân tích hình thái**

Dựa vào hình thái bên ngoài đánh giá các hình thái bông, màu sắc hạt trên ba giống lúa tính *O. rufipogon, O.officinalis và O.autraliensis* như bảng 2. Có điều giống nhau của b loài trên là trục bông xòe và mở, hạt có râu rất dài.

*Bảng 2 :* **Đánh giá hình thái một số đặc tính *O. rufipogon, O.officinalis và O.autraliensis***

| Tính trạng | *O.rufipogon* | *O.officinalis* | *O.autraliensis* | Ghi nhận |
|---|---|---|---|---|
| Bông | 9 | 9 | 9 | 9: mở |
| Nhánh sơ cấp | 0 | 0 | 1 | 0: không có<br>1: nhẹ |
| Xoè bông | 1 | 1 | 1 | 1: xoè |
| Trục bông | 1 | 1 | 2 | 1: Thẳng;<br>2: nghiêng |
| râu | 9 | 9 | 9 | 9: dài |
| Màu râu | 070 | 020 | 052 | 0.20: seaticaw<br>0.52: nâu<br>0.70: đó |
| 100 hạt w (gr) | 1.41 | 0.76 | 1.34 | |
| Chiều dài hạt (mm) | 6.18 | 3.38 | 4.55 | |
| Chiều rộng (mm) | 1.70 | 1.69 | 2.07 | |
| Bông | 3 | 3 | 3 | 3: thụ (75-90%) |
| Vỏ hạt | 070 | 070 | 070 | 070: đó |
| Phôi | 1 | 1 | 1 | 1: cứng glutinous (nonwaxy) |





*O. nivara* *O. rufipogon*

*Hình 24.1: Phân biệt hạt O. nivara và O. rufipogon*

Một vài hình ảnh cho thấy sự phân biệt các loài lúa rất dễ thông qua hình dạng cây lúa


*Hình 24.2. Một vài hình ảnh lúa hoang O. punctata và OM 3536 lúa cải tiến để phân biệt dạng hình*

Phân tích trên các loài lúa hoang du nhập và tại Việt Nam, hầu hết các loài này có nh tính trạng kháng sâu bệnh rất cao. (Bảng 3)

*Bảng 3 :* **Số nhiễm sắc thể, genome, tính trạng và phân bố giống**

| Species | 2n | Genome | Tính trạng | Phân bố |
|---|---|---|---|---|
| O.*rufipogon* | 24 | AA | Chống chịu phèn | VietNam |
| O.*officinalis* | 24 | CC | Kháng rầy nâu, rầy lưng trắng | VietNam |
| O.*nivara* | 24 | AA | Kháng virus lúa có | VietNam |
| O. *perennis* | 24 | AA | Kháng bạc lá, nguồn CMS | Nhiệt đới |
| O. *glaberrima* | 24 | AA | Giống lúa trồng Châu Phi | West Africa |
| O.*breviligulata* | 24 | AA | Kháng bạc lá rầy xanh | West Africa |
| O.*longistaminata* | 24 | AA | Kháng bạc lá | Africa |
| O. *punctata* | 24,28 | BB,BBCC | Kháng rầy nâu | Africa |
| O.*minuta* | 48 | BBCC | Kháng đốm vằn, bạc lá | Philippines |
| O.*latifolia* | 48 | CCDD | Kháng rầy nâu | Central America |
| O. *australiensis* | 24 | EE | Kháng rầy nâu, bạc lá | |
| O.*perrierri* | 24 | unknown | | Madagascar |
| O.*brachyantha* | 24 | FF | Kháng sâu đục thân | Africa |
| O.*ridleyi* | 48 | HHJJ | Kháng bạc lá, sâu đục thân, đạo ôn | Asia |
| O.*granulata* | 24 | GG | Chống chịu điều kiện bóng rợp | Asia |

### 24.3. Kỹ thuật phân tích kiểu nhân

Do tính chất lúa hoang rất quan trọng nên việc phân tích nhiễm sắc thể lúa hoang rất cần thiết, tạo điều kiện tốt cho nghiên cứu tiếp theo.

Phân tích kiểu nhân được chuẩn bị từ nhiễm sắc thể tế bào soma

Chuẩn bị nhiễm sắc thể tế bào soma

Vật liệu

Hóa chất

Dung dịch citrat, pH = 4,6

- 0,01M citric acid monohydrate
- 0,01M Tris sodium citrate dihydrate

Enzyme

- Celulase Onozuka
- Pectolyase

2% aceto carmine

- Carmine
- Glaical acetic acid

Dụng cụ

Kính hiển vi

Các lame

Chai, lọ đựng dung dịch

Cách làm

1. Rễ lúa được dùng làm vật liệu thí nghiệm
2. Lấy rễ lúa từ ngoài đồng hoặc trong nhà lưới, rửa sạch rễ
3. Cắt rễ từ 2-3 cm
4. Để đoạn rễ này vào dung dịch. Cố định 30 phút với dung dịch 8 hybdoxyquinoline và cồn / acid acetic acid với tỉ lệ (3:1) trong 24 giờ.
5. Sau khi qua giai đoạn cố định, rễ sẽ được rửa hai lần trong dung dịch nước cất
6. Rửa tiếp tục trong dung dịch citrat với pH = 4,6 (0,01M acid monohydrate citric, $C_6H_8O_7$. $H_2O$ và tri sodium citrate dihydrate, $C_6H_5O_7$ $Na_3$ $2H_2O$).
7. Cắt rễ thành đoạn mỏng khoảng 1 - 2mm và ngâm trong dung dịch enzymatic macetation (3% celluclose "Onozuka R-10 + 2% pectolyase Y 23 trong dung dịch citrate) trong 30 - 60 phút tùy thuộc từng loài lúa hoang.
8. Sau đó rửa nước để di chuyển enzme 5-10 phút để đoạn rễ trên tấm kính mỏng
9. Nhỏ thêm vài giọt cồn: acid acetic với tỉ lệ ( 3:1)
10. Tấm kính mỏng này được hơ khô với nhiệt độ trong phòng và nhuộm 2% dung dịch aceto carmine trong 15 phút
11. Chụp hình

Phân tích số liệu

Ghi nhận chiều dài hấp thu (AL)

Chiều dài tương đối (RL)

Tỉ lệ của nhánh nhiễm sắc thể

AL = chiều dài chính xác của nhiễm sắc thể trên kính hiển vi (μm)

$$RL = \frac{\text{Chiều dài của mỗi nhiễm sắc thể}}{\text{Tổng số chiều dài của tất cả nhiễm sắc thể (μm)}}$$

$$AR = \frac{\text{Chiều dài đoạn dài của nhiễm sắc thể}}{\text{Chiều dài của đoạn ngắn nhiễm sắc thể}}$$

Phân nhóm nhiễm sắc thể

Metacentric

Sub- metacentric

Sub- telocentic

**24.4. Ứng dụng**

Phương pháp này giúp xác định chiều dài của nhiễm sắc thể trên bố mẹ và con lai, phân nhóm theo vị trí các kiểu nhiễm sắc thể. Đây là chìa khóa quan trọng trong việc nghiên cứu tiếp theo giai đoạn giảm nhiễm của nhiễm sắc thể.

# 25. KỸ THUẬT GISH

## 25.1. Mở đầu

Kỹ thuật GISH còn gọi là lai trong ống nghiệm (In stitu hybridization using genomic). Muốn thực hiện giai đoạn này chúng ta cần phải chuẩn bị nhiễm sắc thể tế bào sô ma từ rễ. Muốn du nhập gen lạ từ loài hoang dại vào cây trồng, người ta phải thực hiện lai in-situ ở giai đoạn phân bào giảm nhiễm (meiotic) và làm nâng cao tần số tái tổ hợp giữa nhiễm sắc thể cây trồng và loài hoang dại. Thành công nhờ vào sự giảm nhiễm của nhiễm sắc thể, và nó phải chứng minh được sự hiện diện của chromatin lạ trong thế hệ sau. Đối với phương pháp cổ truyền, người ta chỉ phân tích đồng hợp tử hoặc dị hợp tử, khó có thể tách được trong giai đoạn giảm nhiễm. Phương pháp in situ hybridization trong genome được xem như proble chứng minh được giai đoạn giảm nhiễm và chúng được quan sát thông qua nhiễm sắc thể.

Phương pháp chuẩn bị nhiễm sắc thể tế bào soma đã được giới thiệu ở phần 24.

## 25.2. Vật liệu

Lai

- Detek Hrp -AEC

Các hóa chất cho dung dịch

- 0,1 m phosphate pH = 7

  $Na_2HPO_4$ 7 $H_2O$ (1M)

  $NaH_2PO_4H_2O$ ( 1M)

  Thanh trùng

- 1,5 M NaCl
- 3% gelatin
- 1% triton x 100

50% Dextran Sufate

20x SSC pH = 7,0

- Trisodium citrate dihydrate (0,3M)
- Sodium chloride (3M)

Hòa tan rồi thanh trùng

10 x PBS pH = 7,4

- NaCl

- $Na_2HPO_4 7H_2O$
- $NaH_2PO_4$
- Pha tan và thanh trùng

10μg/μl SSS DNA giữ -20

10μg/μl RNase

5μg/μl Persin

Hòa tan 5mg persine

PBS buffer với 50mM $MgCl_2$

- 10 xPBS buffer
- 1M$MgCl_2$

Hòa tan trong nước cất (42,5 ml)

1% Formaldehyde

37% Formaldehyde

10 x PBS buffer

1M $MgCl_2$

Hòa tan trong nước cất (41,0ml)

10 x BT buffer

- Sodium bicarbonate (42,0g)
- Tween-20 (2,5ml)
- Hòa tan trong 450 ml nước cất

50% formamide x2SSC

- Formamide
- 20 xSSC

1% avidin FITC

Fluorescein Avidin DCS

1% BSA trong 4 x SSCT

1% bio anti avidin D

Biotinylated anti avidin D

1% BSA trong 4x SSCT

1mg / ml DAPI

4, 6 diamidino 2 phenylindole

1mg/ml PI

Propidium iodide

Dụng cụ

Phòng cấy

Tủ nhiệt điều chỉnh nhiệt độ

Phòng vô trùng

Các dụng cụ cần thiết

Giấy H+

Slide

Phim

Kính hiển vi

**25.3. Cách thực hiện**

Bước tiếp theo chuẩn bị cho lai

1. Slide được phơi khô trước khi lau cồn 70%, 80%, 95% và 100% mỗi loại cần 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.
2. Lai được trộn chung với 50% deionized Formamide, 2 xSSC (citrate, 0,3 M NaCl, 0,03 M tri sodium citrate dihydrate, pH 7,0), 10% dextran sulfat, 2,3 µl label proble (50ng/u). Trộn chất lai trong giai đoạn tách DNA cho 10 phút ở 80-100°C và mang mẫu đưa vào đá tức khắc cỡ trong 5 -10 phút.
3. 40 µl chất proble được trộn để chuẩn bị cho giai đoạn đầu gọi là pre-dehydrated và được đậy một cái ly thủy tinh.
4. Nhiễm sắc thể và DNA proble được tách đồng thời, lúc này đưa sang phòng ở nhiệt độ 70-80°C và ủ trong 10 phút.
5. Chuyển tức khắc sang slide 37°C
6. Slide này cho lai trong 15 -20 giờ

***Rửa chất lai***

1. Sau khi lai và đậy bằng ly , lấy ly ra và rửa slide trong dung dịch 2xSSC trong 5 phút, 2xSSC trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C, 2x SSC ở nhiệt độ bình thường trong 5 phút và 1x PBS (phosphate buffer [0,13 M sodium chloride, 0,007M sodium phosphate dibasic, 0,003M Sodium phosphate monobasic, pH 7,4]) ở nhiệt độ trong phòng, thời gian 5 phút.

2. Slide được ủ trong nhiệt độ 37°C, thời gian 60 phút

3. Làm ấm phòng với 500µl/ slide Detek- hrp để tách phản ứng (0,01M phosphate buffer, 0,15 M NaCl, 0,3% gelatin, 0,025% Triton X-100, 5µl Deteck- hrp). Phải bao slide với giấy parafilm

4. Sau đó slide được rửa 1 x PBS trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng ủ.

***Phát triển với phản ứng màu***

1. Sau khi rửa slide với PBS, slide được nhuộm với 500µl màu, trộn (125 µl x cho phản ứng, 10µl 3 amino 9 ethylcarbazole (AEC), 875 µl $H_2O$) cho mỗi slide

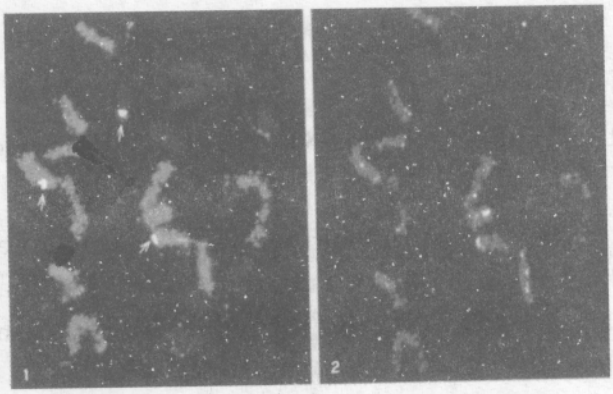
2. Ủ trong nhiệt độ phòng tối và nhiệt độ 37°C trong 30 phút

3. Slide được rửa trong dung dịch 1x PBS

4. Nhuộm với 2% giemsa trong 2 phút

5. Phơi slide cho khô

6. Chụp ảnh




*Hình 25.1 : Nhiễm sắc thể của lúa thông qua phương pháp gish*

## 25.4. Ứng dụng GISH

- Dùng kỹ thuật GISH để chứng minh genome của bố mẹ trong khi lai giữa *Hordeum chilense* và *Secale africanum*.

- Dùng để chứng minh autopolyploid từ allopolyploid (Bennet ,1992)

- Nghiên cứu và đánh giá di truyền quần thể của polyploid (Chen và Armstrong 1994)

- Chứng minh các genome trong cây trồng thí dụ genome CC, BB, AA.

## Tài liệu tham khảo

Bennett, S.T., Kenton, A.Y, and bennett, M.D. 1992. Genomic in situ hybridization reveals the allopolyploidy nature of Milium montianum. Chromosomea 101: 420-424

Chen, Q and Armstrong, K. 1994, genomic in situ hybridization in Avena sativ . genome 37: 607-612

# 26. KỸ THUẬT FISH

## 26.1. Mở đầu

Kỹ thuật FISH viết tắt từ chữ fluorescence in-stitu hybridization, là một công cụ rất quan trọng trong phân tích và ứng dụng di truyền tế bào di truyền phân tử. Các ứng dụng bao gồm nghiên cứu genome của bố mẹ và cây lai, phân tử kiểu nhân, điều tra phân tích trong nhân các tổ chức và mã di truyền cho bản đồ vật lý cả hai giai đoạn phân bào giảm nhiễm và dẳng nhiễm. FISH bao gồm lai DNA hoặc RNA probes. Kỹ thuật này được Gall và Pardue (1969) phát triển. Ban đầu người ta dùng đồng vị phóng xạ đánh dấu để phát hiện nhiễm thể lai. Kỹ thuật này gặp nhiều khó khăn trong việc áp dụng, đòi hỏi điều kiện phòng thí nghiệm trang bị hệ thống an toàn đối với phóng xạ. Để giải quyết khó khăn trên, kỹ thuật huỳnh quang để lai in situ đã ra đời nhằm giải quyết các thiếu sót trên, sử dụng "Biotin labeled" cho mã di truyền DNA, người ta có gắng cải tiến và phát triển kỹ thuật thêm fluorescence in situ hybridization (FISH) ngày càng hoàn thiện hơn.

## 26.1. Hóa chất và dụng cụ cần thiết

Cồn

**SSC**

Tri- Sodium citrate dihydrate

Sodium Chloride(3M)

BSA (Bovine serum albumin

Tween 20

Avidin FITC (Flurescein isothiocyanate)

DAPI (4-6 diamidino 2 phenylindole)

$NaHCO_3$

Pesine

Formaldehyde

Formamide

4xSSCT

4x SSC +0,05% Tween 20

Máy móc

Cân

Máy water bath

Tủ lai

Tủ hút chất độc

Tủ ấm

Tủ lạnh sâu -20°C

Chai, lọ cần thiết

**26.3. Phương pháp**

***Bước 1 :***

Phương pháp FISH phải dùng các đặc tính trong lúa lai

Dùng các enzyme để phân cắt (*Acc*II, *Hap*II, *Hae*III)

Đánh dấu bằng primer ngẫu nhiên

Làm tinh khiết DNA thông qua phương pháp kết tủa bằng cồn

Phơi khô pellet DNA và hòa tan DNA trong 20µl HB 50 (50% formamide, 2 xSSC, 1x PBS)

***Bước 2:***

1. Mỗi slide phải nhỏ vào 300µl RNase (1mg/ml) ở điều kiện nhiệt độ 37°C trong 60 phút.
2. Rửa slide ba lần với 2x SSC, ba phút và 0,01M HCl trong hai phút
3. Ủ ấm ở nhiệt độ 37°C với 100µl pepsin (5µg/ml) trong ba mươi phút
4. Slide được rửa ba lần với nước cất và hai lần với 2X SSC trong ba phút
5. Trước khi cố định 15 formaldehyde trong 10 phút nhiệt độ trong phòng
6. Rửa slide với 1X PBS và 2X SSC trong 5 phút, nhiệt độ trong phòng
7. Rửa cồn (70%, 95%, 100%) trong 5 phút cho mỗi lần rửa.

***Bước 3: Lai***

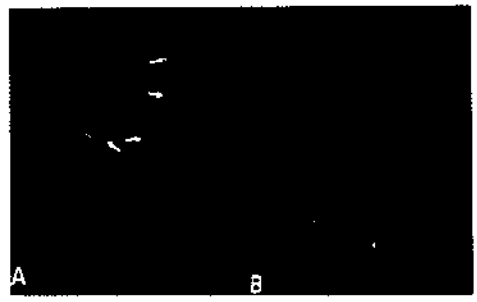
1. Dung dịch lai bao gồm 50-150 ng phân tử "label probe", 50% formamide, 2x SSC, 2SSC, 1µg sonicated Salmon sperm (SSS). DNA được đun nóng nhiệt độ 80-100°C trong 10 phút,
2. Đặt ngay mẫu vào đá trong 5 phút
3. Lấy 15µl cho mỗi slide
4. Sau khi phơi khô 30 phút, đoạn dài của nhiễm sắc thể phải được probe hóa và đun ở nhiệt độ 70-80°C trong 10-15phút .
5. Chuyển slide để lai trong khoảng 15 - 20 giờ, dưới điều kiện nhiệt độ 37°C.

***Bước 4: Rửa***

1. Slide được cố định với formamide/ 2x SSC, 2x SSC trong 10 phút với 42°C
2. Rửa hai lần, 0,1xSSC ở nhiệt độ 60°C và 4 xSSC ở °C, trong 10 phút.
3. Lấy 5% Bovine serum albumin (BSA) trong 4xSSCT (4; SSC + 0,05 % Tween 20 dùng trong 5 phút)
4. Sau khi loại bỏ BSA, 70µl của 1% Avidin -FITC (Fluorescein isothiocyanate) được thêm vào và ủ nhiệt độ 37°C trong 60 phút
5. Thêm vào 100µl block dung dịch (5% goat serum 4xSSCT) trong 5 phút ở nhiệt độ 37°C và 70 µl của 1% Biotinylated Anti, avidin D ở 37°C trong 60 phút
6. Slide được rửa ba lần với 1x BT 0,1M $NaHCO_3$, 0,05% Tween- 20, pH 8,3 trong 10 phút, nhiệt độ 37°C
7. Nghiệm thức tiếp theo là thực hiện với 70% cồn của 1% avidin FITC (Fluorescein Avidin DCS) ở 37°C trong 60 phút
8. Tiếp tục thêm vào 100µl của 5% BSA trong 5 phút
9. Slide được rửa sạch với 1x dung dịch BT trong hai lần, và rửa lại một lần 2XSSC ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút
10. Rửa trong tối với ethanol (70%, 95%, 100%) trong ba phút, phơi khô trong phòng
11. Dếm số băng nhuộm được bởi 20µl của 2ug/ml của DAPI (4,6 diamidino-2 phenylindole
12. Slide được đậy bởi một ly thủy tinh
13. Slide giữ trong tối ở nhiệt độ 4°C

***Bước cuối:***

Chụp ảnh




*Hình 26.1: Nhiễm sắc thể được lại theo phương pháp FISH*

### 26.4. Ứng dụng

Khi lai xa giữa cây hoang dại và cây trồng, sự khác biệt genome thường xảy ra . Việc ứng dụng FISH đầu tiên thực hiện để nghiên cứu di truyền tế bào cây lúa (Leitch và ctv 1991), để xác định vị trí lặp lại DNA trên nhiễm sắc thể. Kỹ thuật FISH đã được áp dụng trên bản di truyền nhiễm sắc thể của lúa mì (Leitch, 1991) và thuốc lá (Kenton, 1993)

## Tài liệu tham khảo


Gall, J.G and Pardue, M.L 1969. Formation and detection of RNA - DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad.Sci.USA 63:378-383

Kenton, A, Parakonny, A.S, Gleba, Y.Y and bennet, M.D.1993. Characterization of the Nicotiana tabaccum L.genme by molecular cytogenetics. Mol. Gen.Genet .240: 159-169.

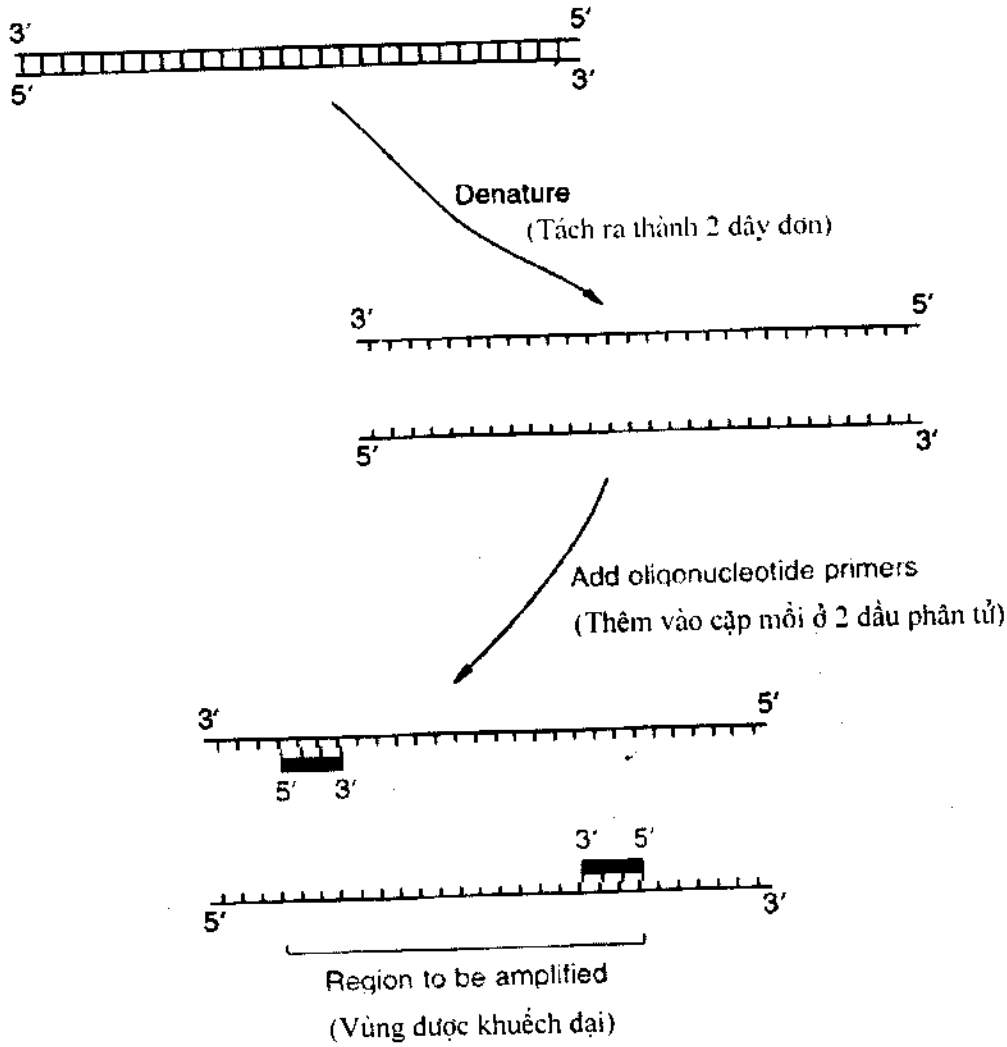
Leitch, I.J.Leitch, A.R and Heslop Harrison, J.S. 1991. Physical mapping of plant DNA sequencing by simultaneous in situ hybridization of two differently labeled fluorescent probes. Genome 34: 329-333.

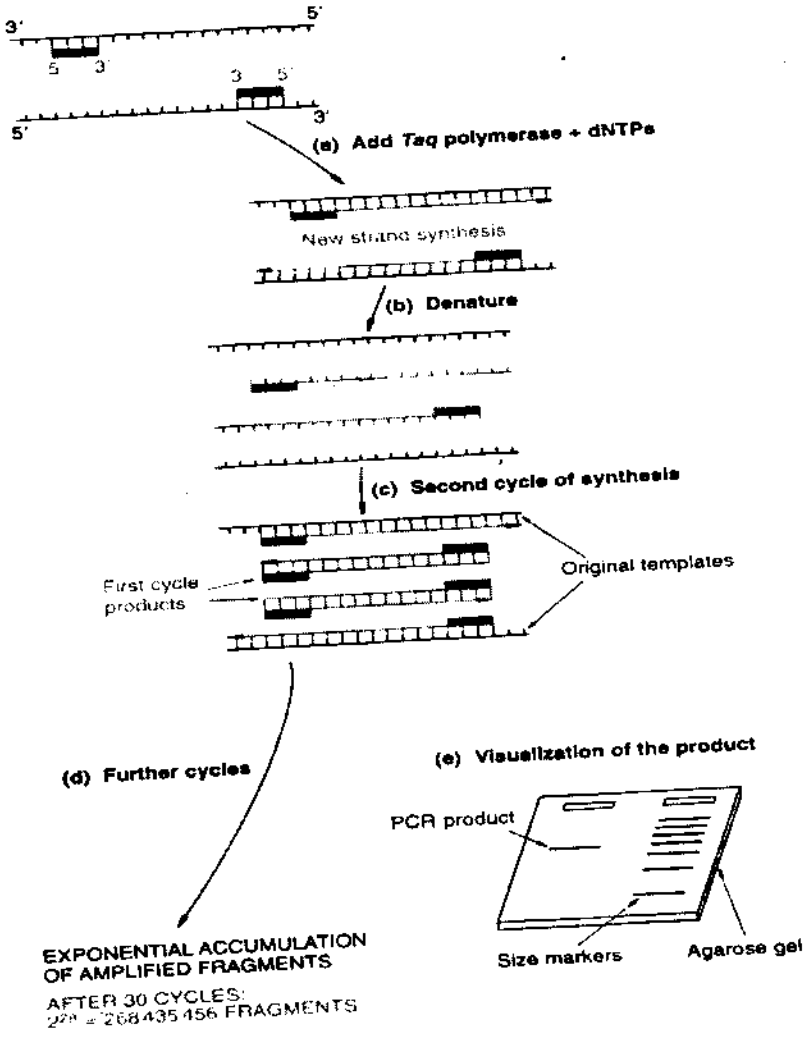
# 27. KỸ THUẬT PCR

## 27.1. Khái niệm

PCR viết tắt từ chữ polymerase chain reaction là phương pháp nhân nhanh một đoạn DNA trong ống nghiệm. Theo lý thuyết có ba đoạn acid nucleic, một đoạn đôi DNA được khuyếch đại và hai sợi đơn primer oligonucleotid sẽ chạy xung quanh đoạn DNA, thêm vào là thành phần protein (DNA polymerase, dNTP và một dung dịch muối.

Trộn đều dung dịch và sau đó làm nóng 94°C sau giai đoạn làm nóng thì tiếp tục làm lạnh. Giai đoạn này thường lặp lại chu kỳ từ 25 đến 30 lần, kết quả tổng hợp và sao chép hàng nghìn đoạn DNA.






## 27.2. Tiêu chuẩn để khuyếch đại DNA

Dung dịch :

- Nước thanh trùng
- 100 mM $MgCl_2$
- 10x buffer để khuyếch đại (không có MgCl)
- 2mM 4dNTP
- 50μM oligonucleitide primer 1 và 2
- 15μg/ml DNA
- 2.5 *Taq* polymerase
- 1 giọt dầu

Dụng cụ:

Máy PCR
Ống nghiệm 1.5 ml
Ống nghiệm 0,2 hoặc 0,5 ml
Pipepman

1. Chuẩn bị pha dung dịch $MgCl_2$

| Ống nghiệm | Nước | 100mM $MgCl_2$(µl) |
|---|---|---|
| 1 | 9.0 | 0.0 |
| 2 | 7.5 | 1.5 |
| 3 | 6.0 | 3.0 |
| 4 | 4.5 | 4.5 |
| 5 | 3.0 | 6.0 |
| 6 | 1.5 | 7.5 |
| 7 | 0.0 | 9.0 |

2. Chuẩn bị pha cocktail: cho 1 phản ứng là 20µl

| | |
|---|---|
| DNA | 1µl |
| 10xPCR buffer | 2µl |
| MgCl2 | 1.5µl |
| Primer1 | 1µl |
| Primer2 | 1µl |
| DNTP | 1µl |
| *Taq* | 0.5µl |
| Nước | 12µl |
| | 20µl |

3. Đặt các dung dịch vào máy PCR, nhớ bỏ 1 giọt dầu.
4. Thiết lập chương trình phần mềm cho PCR

Thông thường có các giai đoạn sau

| Giai đoạn | Tên giai đoạn | Chu kỳ | Nhiệt độ (°C) | Thời gian |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Làm nóng | | 94 | 5′ |
| 2 | Làm nóng | 30 | 94 | 1′ |
| 3 | Lai | 30 | 55-60 | 30′ |
| 4 | Chuyển | 30 | 72 | 30′ |
| 5 | Chuyển | | 72 | 5 |
| 6 | Lưu trữ | | 4 | |

Nói chung số chu kỳ tùy thuộc vào phương pháp khác nhau

### 27.3. Phương pháp PCR trong giải mã di truyền

Trong giải mã di truyền cũng cần phương pháp PCR .

Cách làm:

Giai đoạn pha dung dịch

| | |
|---|---|
| 1. Labelled primer | 5 µl |
| 10X *Taq* sequencing | 4µl |
| 2. Template DNA và nước | 26µl |
| *Taq* DNA polymerase 2,5U/µl | 0.5µl |
| | 36µl |

Chuẩn bị 4 mã di truyền

Toàn bộ thể tích µl

| Thành phần | Tube A | Tube C | Tube G | Tube T |
|---|---|---|---|---|
| A | 2 | | | |
| C | | 2 | | |
| G | | | 2 | |
| T | | | | 2 |
| Chuẩn bị trộn phản ứng | | | | |
| | 8 | 8 | 8 | 8 |
| | 10 | 10 | 10 | 10 |

Chương trình sử dụng PCR trong DNA sequencing

| Giai đoạn | Tên giai đoạn | Chu kỳ | Nhiệt độ (°C) | Thời gian |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Làm nóng | | 95 | 3′ |
| 2 | Làm nóng | 30 | 95 | 30″ |
| 3 | Lai | 30 | 55 | 30′ |
| 4 | Chuyển | 30 | 72 | 1′ |
| 5 | Chuyển | | 72 | 5 |
| 6 | Lưu trữ | | 4 | |

## 27.4. Tạo ra sản phẩm PCR

Muốn có sản phẩm PCR tốt cần phải có những bước sau :

DNA (nồng độ DNA phải đúng và sạch)

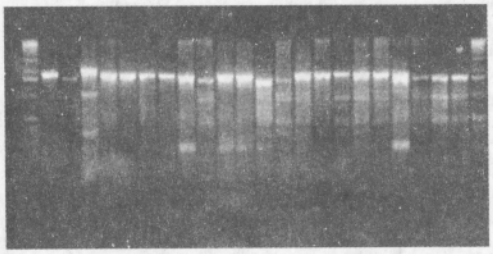
Primer phải hoạt động tốt. Nếu primer không tốt sẽ thể hiện nhiều băng

Lượng *Taq* vừa đủ, không nhiều, không thiếu (phải làm các xét nghiệm điều chỉnh)

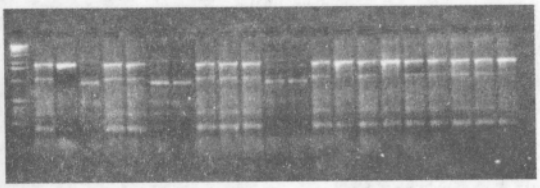
Số lượng chu trình, và nhiệt độ trong quá trình chuẩn bị cho PCR

Sau đây là một số trường hợp băng hình không tốt do sai lầm trong các trường hợp trên.

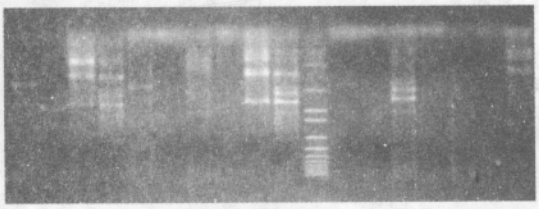
Thí dụ 1: Primer không đúng (thiết kế không đúng)



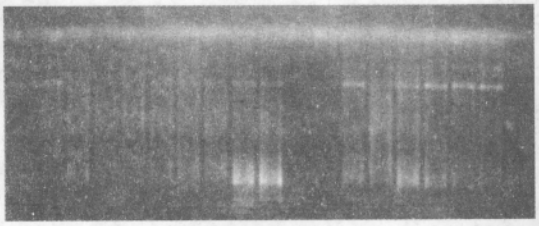
Thí dụ 2: Quá nhiều *Taq* polymerse



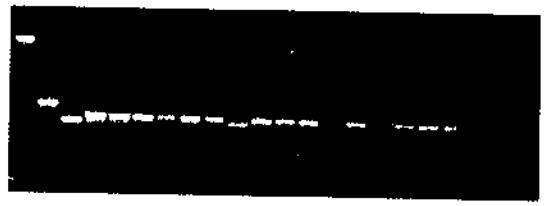
Thí dụ 3: DNA quá nhiều



Thí dụ 4: DNA bị tạp



- Thí dụ 5: Liều lượng thích hợp cho PCR, băng hình thể hiện rất rõ



### 27.5. Phương pháp thiết kế primer

Để thiết kế primer cho tốt cần chú ý các điểm chính sau

1. Oligo nucleotide không có quá nhiều T hoặc A
2. Tùy vào phần mềm của chương trình thiết kế trong máy tính
3. Có kinh nghiệm trong việc thiết kế primer
4. Chuỗi mã primer (mã di truyền không quá ngắn)
5. Nhiệt độ trong khi tách và tổng hợp primer phải hợp lý
6. Nếu mã di truyền thiết kế là 20 base thì nhiệt độ phải là

Td = 4 (G+C) + 2 (A+T)

Thí dụ sau đây là chuỗi mã di truyền

DNA sequence of RG140.

F

1 GAGCTCGCCC GGGGATCCTCTAGAGTCGAC CTGCAGGTAG CTGGTCAAAT
51 CCTCAGGTGA TTTTGTTAGC TCATATTTTG GTAAATAATT **CCATATGTAC**
**101** **ATAGTAGCACCTGCTCCACC** ATTTGAGTGG AGTGTCATAT ATAGGTGAAG
151 TACTTGAATT ACTCACTTCG TCCCAAAATA AGTGCAGCTG TGTAGTTCAC
201 CGGTTGCACT TATTTTAGGG TGGAAGGAGT ATATATTAAG CATTATTGGG
251 AAGATGATTT CCTCCTAATC CACAAGTTTT TTTTCACAAG TTTATATGTT
301 ATACC

R

1 GCCAAGCTTG GGCTGCAGGG CCACACCCAC ATATGCCCAT GCACATCCAT
51 CCATCGTCCG GCTTCACCTA TGGTTTTTCA GATTCACTTC ACACA**TCCCT**
101 **AGTTTGTGCT ACTCCTAGCT** ACAAATTGAA ATTCCATATT GGCATCTCAT
151 TGTTCATTTC AGGCCTCAAT ATTGGGCCCT CCAGCCAGCC AGTACGTATG
201 TCCTAGTGTC TCATGCTAFT CAACAATGAC AGGACATTGG TAAGTTACCC
251 AGTCTGTCTG TTCTGAAGAC ACAGGAATTT TACAGCATTT TTACACACAA

*Hình 27.1: Chuỗi mã di truyền của marker RG 140 được DNA sequencing (giải mã di truyền), mã di truyền này nằm trên nhiễm sắc thể số 1 liên kết với gen Rf-3 (gen phục hồi phấn hoa)*

Và kết quả thiết kế là đoạn primer như sau : 5′ .....3′ F (viết tắt của chữ forward) và 5′...3′ R (viết tắt của chữ reverse)

Vị trí base tô đậm

Kết quả hình, sau thi khuếch đại PCR

**27.6. Chu kỳ khuyếch đại**

Chu kỳ được xây dựng trong chương trình PCR rất quan trọng, nếu thiết kế sai chu kỳ phản ứng PCR sẽ không tốt

a. Số chu kỳ

Thường dùng là 30 chu kỳ cho quá trình khuếch đại PCR. Nếu thêm nhiều chu kỳ thì phản ứng rất chậm và năng suất thu hoạch cho các băng không cao. Nhìn chung số chu kỳ tùy thuộc vào phương pháp và đối tượng sử dụng.

b. Nhiệt độ cho thời kỳ lai với primer (annealing): tùy thuộc vào primer mà chúng ta điều chỉnh nhiệt độ (56 - 60°C)

c. *Taq* polymeraes : *Taq* polymerase có thể 2-4kB (trên phút), tức 35-70 base trong một giờ, vì thế 1kB, 1 phút với nhiệt độ 72°C sẽ thành công cho quá trình khuếch đại.

d. Chú ý nếu 20 mer với thành phần GC trên 60% thì phải tính toán nhiệt độ trong quá trình sắp xếp polymere.

Sau đây là một số hóa chất cơ bản chuẩn bị dung dịch cho PCR

*Bảng 1:* **Hóa chất và liều lượng dung dịch**

| Thứ tự | Thành phần chung | $MgCl_2$ (mM) |
|---|---|---|
| I | 50mM KCl | A = 0,75 |
| | 10mM Tris HCl pH 8,4 | B = 1,50 |
| | 0,01%gelatin | C = 2,25 |
| | 0,1%Triston x 100 | D = 3,00 |
| | | E = 3,75 |

| | | |
|---|---|---|
| II | 40mM NaCl | F = 0,75 |
| | 10mM Tris HCl pH 8,4 | G = 1,50 |
| | 0,01 gelatin | H = 2,25 |
| | 0,1% Tritson x 100 | I = 3,00 |
| | | J = 3,75 |
| III | 10mM $(NH_4)SO_4$ | K = 0,75 |
| | 10mMKCl | L = 1,50 |
| | 10mM Tris HCl pH = 8,4 | M = 2,25 |
| | 0,01 gelatin | N = 3,00 |
| | 0,1% Tritson x 100 | 0 = 3,75 |

Ngoài ra còn các hóa chất cần thiết như phần 1 của bài này

**27.7. Phương pháp chung**

*a. Khởi hành ghi nhãn cẩn thận trên tube cho PCR*

Dùng pipettman lấy 25µl cho mỗi phản ứng trọng đó 15 phản ứng

Mỗi phản ứng chú ý nhỏ một giọt dầu trước khi đưa mẫu vào máy

Chuẩn bị trộn dung dịch như sau:

| | |
|---|---|
| Primer 1 | 4 µl |
| Primer 2 | 4µl |
| DNTP | 16µl |
| DNA | 4µl |
| Nước | 327µl |
| *Taq* (5U/µl) | 1,6µl |

Chú ý trộn đều

*b. Máy Thermalcycler*

**27.8. Ứng dụng**

Kỹ thuật PCR có khả năng phục vụ rất rộng : xét nghiệm trong y khoa, xét nghiệm bệnh cho cá, người, cây con. Nó là nội dung kỹ thuật phân tử tiếp theo các kỹ thuật RAPD, AFLP, STS , SSR và các kỹ thuật trong nhân bản vô tính, hoặc giải mã di truyền, kiếm chứng gen trong PCR. Nhiều nhà di truyền và chọn giống đã phát hiện thành công các gen nhờ kỹ thuật PCR như gen kháng bệnh đạo ôn, rầy nâu, bạc lá, kháng mặn, mùi thơm v.v...

# 28. KỸ THUẬT DNA SEQUENCING

## 28.1. Giới thiệu

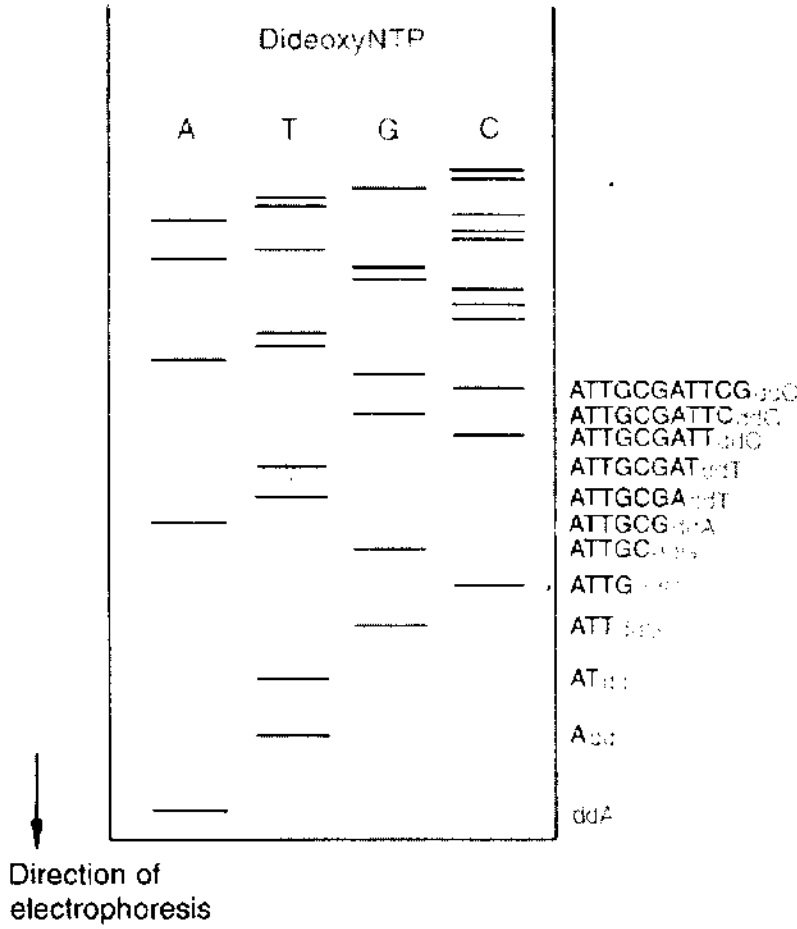
Kỹ thuật đọc chuỗi ký tự DNA là nội dung rất quan trọng trong công nghệ sinh học, giúp chúng ta biết được mã di truyền (DNA sequencing). Với kỹ thuật này, chúng ta có thể sắp xếp mã di truyền trong một đoạn DNA. Giải mã di truyền đã có rất lâu đời, tuy nhiên mãi đến năm 1970 các phương pháp mới được ứng dụng nhiều và công nghệ này ngày càng hoàn thiện hơn. Phương pháp thường dùng nhiều là phương pháp của A. Maxam và W.Gibert.

## 28.2. Phương pháp Sanger -Coulson (chuỗi nucleotides)

Phương pháp này đòi hỏi sợi đơn DNA, và thường dùng trong nhân bản vô tính (clone), sử dụng vector M13. Phương pháp bao gồm : tổng hợp enzymatic của sợi thứ hai DNA và bổ sung trong dây DNA nền (template)

1. Primer: Bước đầu tiên của phương pháp này là tổng hợp sợi ngắn oligonucleotide trên phân tử M13. (hình 28.1). Primer này hoạt động khởi đầu bổ sung chuỗi phản ứng tổng hợp của đoạn DNA polymers I
2. Tổng hợp của sợi bổ sung: Phản ứng tổng hợp bao gồm thêm enzymes với 4 deoxynucleotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
3. Bước tiếp là chạy điện di
4. Đọc chuỗi ký tự DNA

Quan sát trên hình, người ta sẽ đọc thứ tự các base.




*Hình 28.1. Các bước đọc mã di truyền bằng phương pháp Sanger-Coulson*

## 28.3. Giải mã di truyền trên máy DNA sequencing

*28.3.1. Chuẩn bị DNA :* DNA cho chạy Sequence cần phải tinh khiết

- Kiểm tra nồng độ DNA trước khi chạy sequencing
- Chuẩn bị probe
- Cho chạy PCR để kiểm chứng probe
- Pha probe vào DNA theo nồng độ thích hợp

Đánh dấu primer

- 5X Kinase buffer và primer, chú ý bỏ ngay vào đá
- Dùng pipett lấy 5µl thành phần sau:

| Thành phần | Thể tích | Số lượng |
|---|---|---|
| Sequencing primer | 2µl | 1pmol |
| 5x kinase buffer | 1µl | |
| (γ 32 P ) ATP | 1µl | 2pmol |
| T 4 polynucleotide | 1µl | 1unit |

*Chú ý:* Primer M13/pUC có 23 base kiểm chứng. Lấy 1,5µl primer phối hợp với 0,5Ul nước cất bỏ vào tube.

- Dậy tube và lắc nhẹ, ủ nhiệt độ 37°C trong 10 phút
- Ủ trong 55°C trong 5 phút, đặt tube ngay trong đá

*28.3.2. Phản ứng mã di truyền*

- 5µl labeled primer ở giai đoạn 1 thêm *Taq* polymerase với 4 base trộn vào từ 1 DNA template.
- Chuẩn bị nước cất, 1 số lượng nhỏ DNA trộn vào (điều này tùy thuộc vào kích thước của plamid hay cosmid hay BAC). Nếu DNA nhỏ hơn 33kb thì chỉ cần 33ng /kb của chiều dài cho phản ứng PCR
- Từ thể tích trên ta có thể tính toán 26µl DNA dùng cho phản ứng này
- Trong giải mã di truyền cũng cần áp dụng phương pháp PCR.

*28.3.3. Cách pha dung dịch*

Giai đoạn pha dung dịch

| | |
|---|---|
| 1. Labelled primer | 5 µl |
| 10X *Taq* sequencing | 4µl |
| 2. Template DNA và nước | 26µl |
| *Taq* DNA polymerase 2,5U/µl | 0.5µl |
| | 36µl |

Chú ý đối với phản ứng kiểm chứng, lấy 10µl l của 10µg/ml pUC 18 DNA cho vào nước cất

- Các tube được đậy, trộn đều đưa vào đá

*28.3.4. Chuẩn bị 4 mã di truyền*

Toàn bộ thể tích µl

| Thành phần | Tube A | Tube C | Tube G | Tube T |
|---|---|---|---|---|
| A | 2 | | | |
| C | | 2 | | |
| G | | | 2 | |
| T | | | | 2 |
| Chuẩn bị trộn phản ứng | | | | |
| | 8 | 8 | 8 | 8 |
| | 10 | 10 | 10 | 10 |

*28.3.5. Chương trình sử dụng PCR trong DNA sequencing*

| Giai đoạn | Tên giai đoạn | Chu kỳ | Nhiệt độ | Thời gian |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Làm nóng | | 95 | 3′ |
| 2 | Làm nóng | 30 | 95 | 30″ |
| 3 | Lai | 30 | 55 | 30′ |
| 4 | Chuyển | 30 | 72 | 1′ |
| 5 | Chuyển | | 72 | 5 |
| 6 | Lưu trữ | | 4 | |

*28.3.6. Chuyển ADN mẫu vào các giếng của máy*

- Làm nóng sequencing tube 90°C. Load 4µl cho mỗi giếng
- Gel được phát triển và đọc trên máy thông qua vi tính (hình 28.2)

Qui trình được tóm tắt sau (hình 28.3); Định hướng cho mã di truyền (hình 28.4)

Đọc kết quả (hình 28.5 và 28.6)

DNA sequences từ clone pKS1 chứa OPF18

DNA sequences of F18F

**5'ttcccgggtt ccactaggat 3' F18F primer**

1 ttcccgggtt ccactaggat ttataggttt tttttgccgg atatccccga gcatactaag

61 cctttttttt ttcatactaa gtctttttg tgtgtgtgtg gaatccgcgg ctgctgcgac

121 aggggggac attgtaatgg ctacttcgga gccatctgtc aatcaggccc ctgctacttc

181 ggagccgtct gtcaatcagg cccttccttc tgtcaaacag gcccctgcta cttcggagcc

241 gtctgtcaat caggccctac cttctgacgt agctaaggaa gcaggcaaag ctgacgtagc

301 taaggaagca ggcaaaggcg cgggcttctt ctcgtctctt tttggatgcc tctgttcttc

361 acagaagtag gagtaaacag agagtgatct atgccctggc tgggcagagc gagggatagg

**F18MF 5'ag agagtgatct atgccctg 3'**

421 gtgctttctt tctatatgga taggtgggtc ttcccttcct atctctcttt tcttttgtta

481 ggaaggttag tcatcatgcc ccgaactagg tgttattgaa aactaatccc tgtctgggtt

541 agagtgtttg gggtagtgca ttgaccttac tcagtttatt agtgcgcttg cttgcagaga

601 gtaaatggct gtagtgaaac tccgtgacta ggtgatagct tgagtaggag gaaatagtgc

661 atggactaat acact

----------middle portion----------

DNA sequences of F18R

1 aagcaagcta ccttgcttgc attcgttaaa cggtagcttc cgcgcccttc ctgcctgctg

61 aaattgatgt gaatgatcgt gtcttcgaca tcaatttcag tctgattaga tatgtcattg

121 aaacaaatcc gttttgtctc tgttttcttt tcggatgagc cagccgatcc taacagaatt

181 tttgaggagc cggacgacga agcctcaaaa tcagataaag attctccgac gcgaccggac

241 ttcaactata tttttttt (some more)

402 tccccagctt ccacggtccg cttaccgagg aagagatgcg ggaggaccca gggccagagc 461

**3' GGGGTCGAA GGTGCCAGGC G 5' F18MR primer**

462 aagttgggtt ggggtataga gccgtaagcg cggtgggggt gacagaggat gtgctcgtac 521

522 ggttcatagt tgggtatgat attctcgtgg attgttggga acgtcctcta tattcgaaat 581

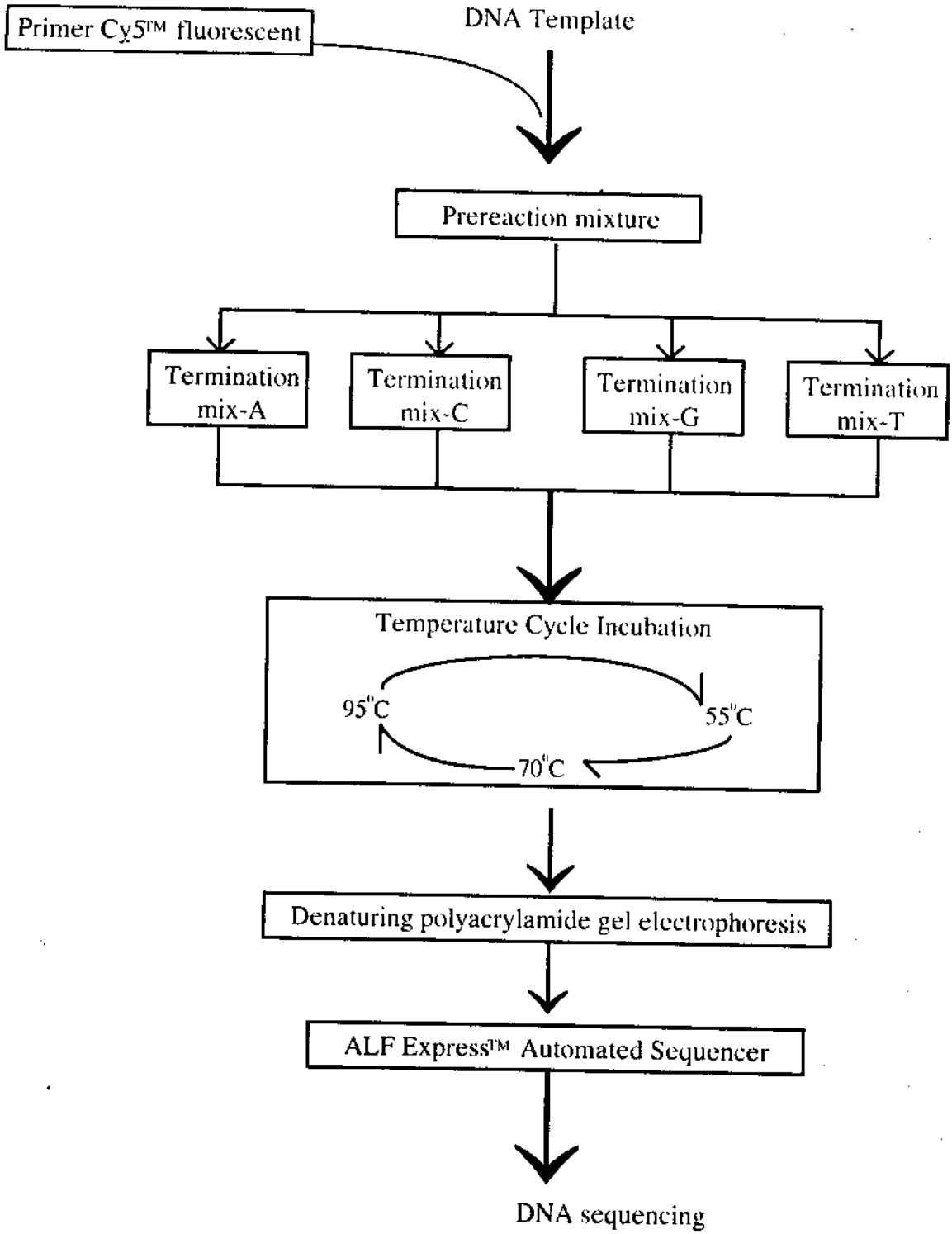
582 atgcctttct aggagcatta cgatctgcag ctcaaatggt cccttatgaa gtctctattg 641

642 gtcttattct tattgtgcgc cttgtgagca cgtttggatc cgcgaaggca atcgctcgga 701

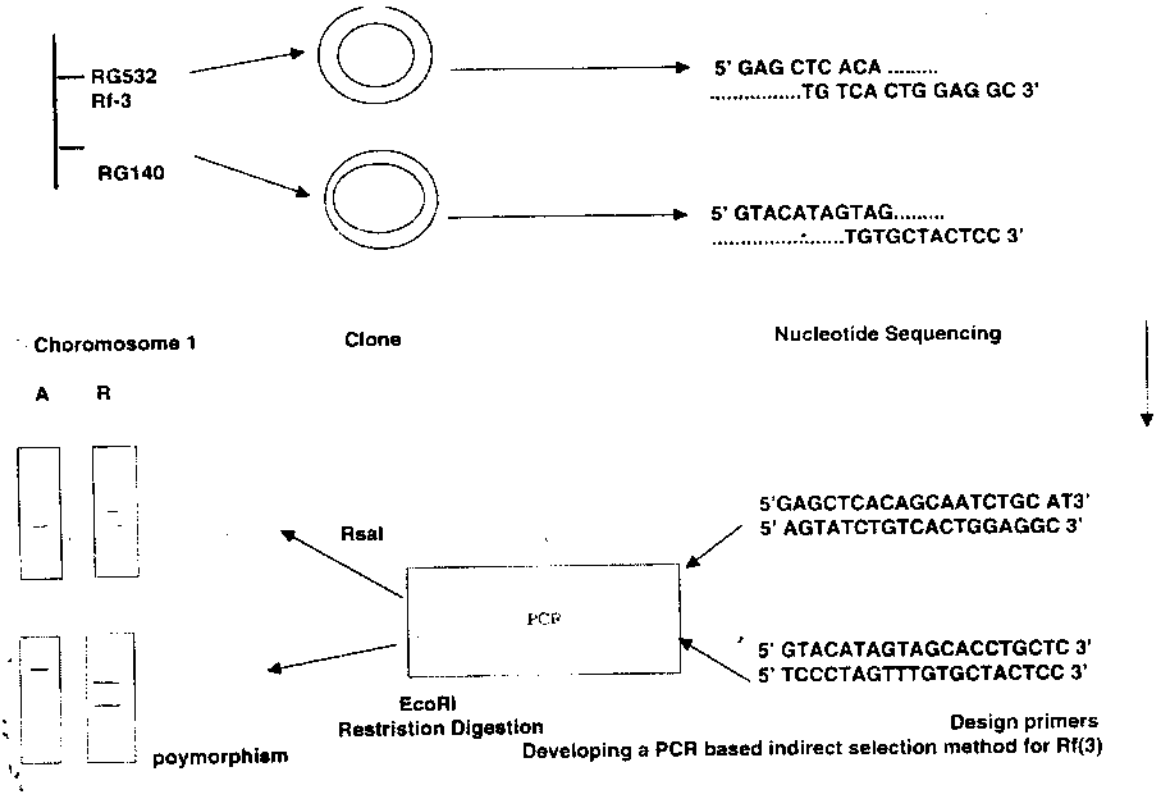
702 tcttccccta acccaacccg ggaa 725

**F18R 3' GGGGAT TGGGTTGGGC CCTT 5'**

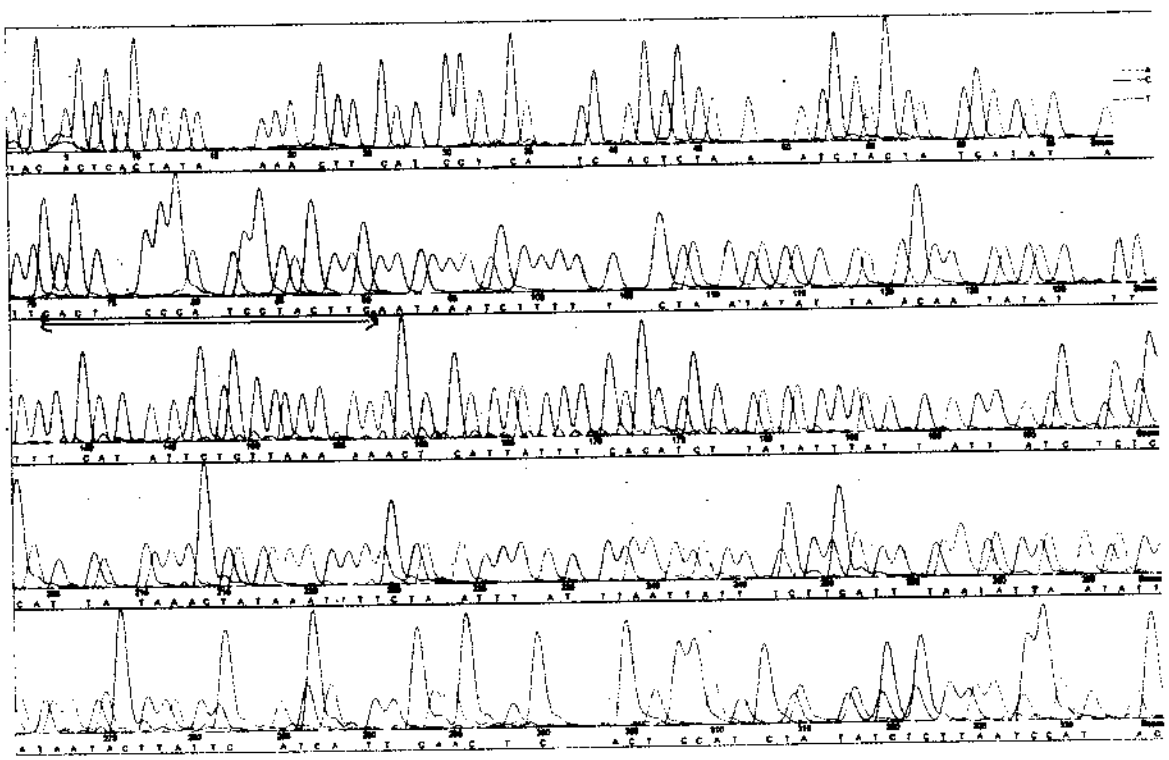
*Hình 28.2: Mã DNA từ F18 được đọc*



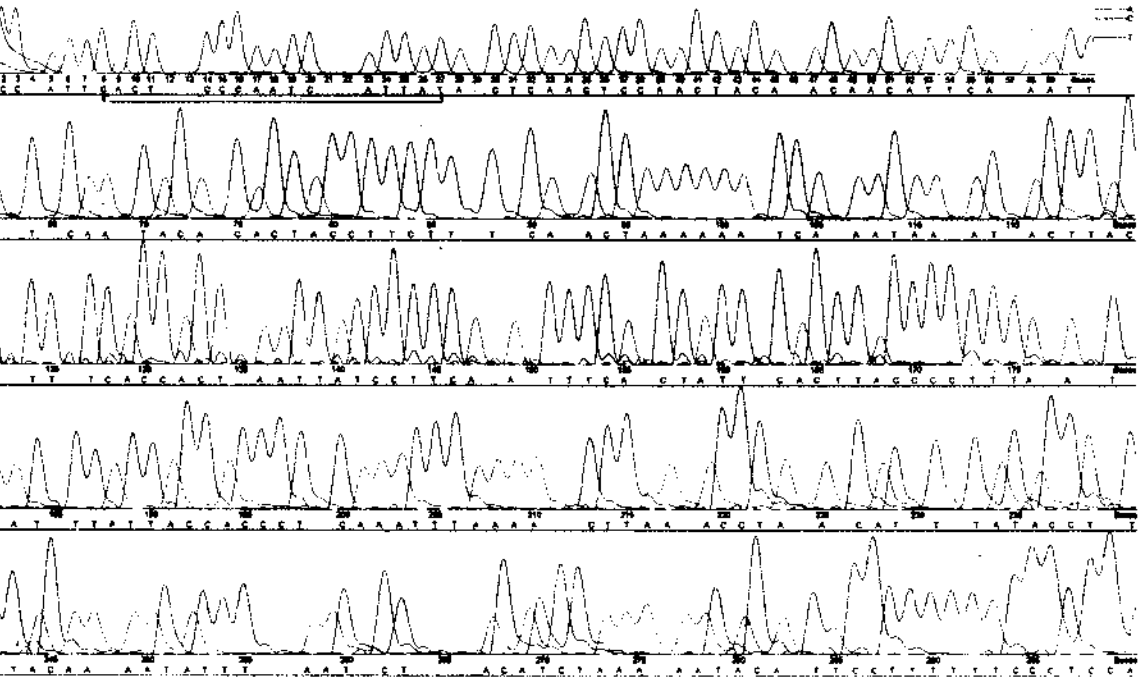

*Hình 28.3: Qui trình đọc mã DNA*




*Hình 28.4: Qui trình định hướng cho một gen có thể đọc được mã và thiết kế primer*



*Hình 28.5: Giải mã di truyền F trên OK 5*



*Hình 28.6: Giải mã di truyền R trên OK 5*

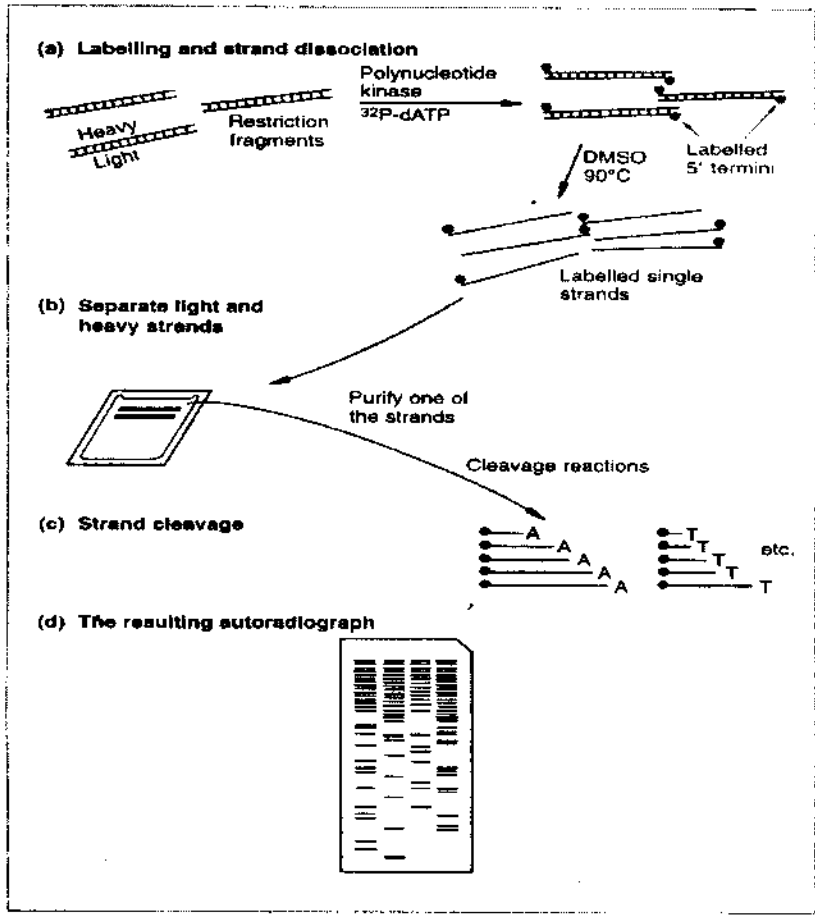
## 28.4. Phương pháp Maxam -Gilbert (phương pháp hóa học)

Phương pháp này cũng tương tự như phương pháp Sanger và Coulson. Tuy nhiên phương pháp này không cần nhân bản vô tính M13 và cần sợi đôi DNA, không cần primer, bởi vì với phương pháp này không tổng hợp sợi mới DNA. Phương pháp này cần DNA đánh dấu và dùng một số hóa chất rất độc.

Phương pháp như sau:

1. Bước đầu tiên là cần DNA dây đôi và DNA có đánh dấu với nhóm phophor đồng vị, sau đó làm nóng ở 90°C. Quá trình này tách DNA thành sợi đơn (hình 28.7). Chạy diện di ta sẽ thấy các sợi tách ra, sợi chứa nhóm purine nucleotides thì sáng và nặng hơn.

2. Sau khi chụp ảnh ta thấy kết quả như trên hình.




*Hình 28.7: Tách DNA thành sợi đơn*

# 29. PLASMID

## 29.1. Giới thiệu

Plasmid là những phân tử DNA vòng, xoắn đôi, có tính chất tự tái bản. Plasmid có trong các vi khuẩn, xem như phần tử có tính chất ngoài nhiễm thể (extrachromosomal), còn có tên là "supercoiled DNA" do cấu trúc xoắn đôi đặc biệt của nó. Nói chung, tất cả các vi khuẩn đều có plasmid. Một vài plasmid mang thông tin di truyền từ tế bào này sang tế bào khác (gọi là F plasmid); những plasmid khác mang các bộ gen đặc biệt dùng trong những cơ chế không cần thiết, được gọi là "degradative plasmid" ; và một vài plasmid không có gen chức năng, có tính tạm thời, được gọi là "cryptic plasmid". Plasmid có qui mô kích thước thay đổi, từ nhỏ hơn 1 đến 500 kb. Mỗi plasmid đều có một chuỗi mã di truyền (sequence) mang chức năng như một nguồn của tính chất tự tái bản DNA (replication). Nếu không có vị trí nguồn này (ORI), DNA không thể tái lập lại trong tế bào cây chủ.

Vài plasmid được thể hiện thông qua 10 đến 100 bản sao trong tế bào chủ, được xem như : plasmid có số bản sao cao. Plasmid khác có 1-4 bản sao / tế bào, được xếp vào nhóm plasmid có số bản sao thấp. Trong trường hợp có hai hoặc nhiều loại plasmid khác nhau không thể ở chung trong cùng một tế bào chủ, người ta gọi đó là plasmid thuộc nhóm đơn, không tương hợp (incompatibility). Những plasmid từ những nhóm không tương hợp như vậy có thể được xử lý cho vào cùng một tế bào. Sự cùng hiện hữu này (coexistence) độc lập với số bản sao của những plasmid riêng biệt. Một vài vi sinh vật được tìm thấy có từ 8 đến 10 plasmid khác nhau. Trong trường hợp này, mỗi plasmid có thể thực hiện nhiều chức năng khác nhau và có bản sao riêng của nó, mỗi thứ thuộc nhóm không tương hợp. Một vài plasmid chỉ có thể tái lập lại trong tế bào của một loài đặc biệt nào đó mà thôi, được gọi là sự chuyên biệt về nguồn lập lại. Những plasmid khác ít có tính chuyên biệt này, nó có thể tái lập lại trong nhiều loài vi khuẩn. Do đó, người ta xếp loại plasmid thành hai nhóm: nhóm có phổ ký chủ hẹp và nhóm có phổ ký chủ rộng.

Với tính chất tự tái bản, plasmid có một bản chất quan trọng là một vectơ mang DNA đã được tạo dòng (cloned). Tuy nhiên, plasmid thường thiếu nhiều điểm quan trọng khác, cần thiết cho một cloning vectơ có chất lượng tốt. Những đặc điểm ấy là: (1) kích thước nhỏ rất cần thiết, bởi vì hiệu quả của việc chuyển DNA ngoại sinh vào *E. coli* sẽ giảm đi một cách có ý nghĩa so với plasmid có kích thước lớn hơn 15 kb; (2) tính đồng nhất (đơn) về các vị trí xác định men endonuclease hoạt động, nơi đó dòng DNA sẽ được gắn vào; (3) một hoặc nhiều hơn marker di truyền có tính chọn lọc đối với tế bào nhận dòng DNA ngoại sinh. Từ đó, các cloning vector là những plasmid như vậy, sẽ đảm đương công việc được gọi là công nghệ lắp ghép gen.

## 29.2. Cloning vectơ là Plasmid pBR322

Một trong những nghiên cứu xuất sắc và được ứng dụng rộng rãi là plasmid pBR322. Vectơ tạo dòng này được ký hiệu bằng chữ "p" để chỉ plasmid, ký hiệu BR là tên của F. Bolivar và R. Rodriguez - hai nhà nghiên cứu tìm ra plasmid này, và số 322 là ký hiệu của nhà nghiên cứu đặt ra. Plasmid pBR322 có qui mô về kích thước là 4361 bp. Nó mang hai gen kháng với thuốc kháng sinh: một đối với ampicilline (ký hiệu là *Amp*$^r$), một đối với tetracycline (ký hiệu là *Tet*$^r$). Plasmid này cũng có vị trí đồng nhất của *Bam*HI, *Hind*III, và *Sal*I ở trong gen *Tet*$^r$,vị trí *Pst*I ở trong gen *Amp*$^r$. Vị trí *Eco*RI nằm ở chỗ không có tín hiệu di truyền nào. Nguồn của sự tái lập lại (origin of replication) chỉ có chức năng trên *E. coli*. Số bản sao rất cao của *E. coli* được duy trì, và không ở trạng thái sẵn sàng để chuyển sang bacteria khác.

Làm thế nào để pBR322 hoạt động như một cloning vectơ ? Phân tử pBR322 là một DNA vòng kín, thuần khiết. pBR322 được cắt với một restriction enzyme, tại nơi có chứa gen kháng với thuốc kháng sinh, tạo ra DNA dây đơn, thẳng, dạng sticky end (đầu dây so le khác với dạng blunt end là đầu dây bằng nhau). Phân tử dây thẳng này được kết hợp với DNA của một nguồn lạ nào đó. DNA này được cắt ra bằng một restriction enzyme giống như enzyme đã được sử dụng trên plasmid, để có hai đầu thuộc dạng sticky end tương ứng (như ngàm của hai thanh gỗ khớp với nhau). Hỗn hợp DNA này được xử lý bằng men T4 DNA ligase, với sự có mặt của ATP. Trong điều kiện như vậy, hàng loạt các phối hợp khác nhau sẽ được tạo ra, chứa đựng cả plasmid DNA vòng nguyên thủy. Để giảm thiểu các liên kết không mong muốn, plasmid có gắn DNA mới sẽ được xử lý bằng enzyme alkali phosphatase, nhằm loại ra nhóm phosphate 5' từ DNA plasmid dây thẳng. Nhờ vậy, T4 DNA ligase không thể gắn với đầu của dây thẳng DNA plasmid đã được phản phosphoryl hóa (dephosphorylated). Tuy nhiên, hai cầu nối phosphodiester được tạo ra bởi T4 DNA ligase sau phản ứng nối kết và tạo vòng (circularization) của DNA đã xử lý alkaline phosphatase, đủ sức giữ cả hai phân tử dính nhau lại (DNA mới và plasmid), cho dù có sự hiện diện của hai nick (nối gốc OH và OH). Sau khi chuyển nạp xong, các nick sẽ được hàn lại bởi hệ thống DNA ligase của tế bào chủ.

## 29.3. Đặc tính cơ bản của Plasmid

Plasmid phân bố rất rộng trong sinh vật hạ đẳng (prokaryotes), kích thước thay đổi từ $1 \times 10^6$ daltons đến $200 \times 10^6$ daltons.

Một vài tính trạng về kiểu hình do gen mang plasmid: kháng thuốc kháng sinh, sản xuất ra chất kháng sinh, phân hóa hợp chất có mùi thơm, sản xuất heamolysin, lên men đường, sản xuất enterotoxin, kháng với kim loại nặng, sản xuất bacteriocin, kích thích khối u thực vật , sản xuất hydrogen sulphide.

Cryptic plasmid là plasmid có tính trạng kiểu hình chưa được biết.

Plasmid có thể được chia ra làm hai loại: conjugative (tiếp hợp) và nonconjugative (không tiếp hợp) tùy thuộc vào nó có mang hay không mang gen chuyển nạp, gọi là *tra* genes, gen này kích hoạt sự phân cắt tế bào của vi khuẩn

Plasmid cũng được chia trên cơ sở số bản sao (copy) trên tế bào nhiều: "relaxed plasmid", và ít, hoặc bị giới hạn : "stringent plasmid".

Conjugative plasmid thường có trọng lượng phân tử cao, xuất hiện một đến ba copies / nhiễm thể. Trong khi non-conjugative plasmid có trọng lượng phân tử thấp, xuất hiện nhiều copies / nhiễm thể.

## 29.4. Sự thuần khiết của Plasmid DNA

Điều kiện tiên quyết cho kỹ thuật cloning là sự thuần khiết của plasmid DNA. Đó là vấn đề thuộc về phương pháp. Điều kiện lý tưởng có được khi mỗi tế bào bị vỡ, đủ để cho phép plasmid DNA thoát ra, mà không bị tạp quá nhiều DNA ở nhiễm thể. Các DNA nhiễm thể có phân tử lớn sẽ được loại bỏ, nhờ ly tâm với vận tốc lớn.

Phương pháp Vinograd : ly tâm trong dung dịch CsCl, có chứa ethidium bromide (EtBr).

Phương pháp Birnboim và Doly : quan sát trong phổ pH rất hẹp (12.0 - 12.5) trên dây đơn DNA thẳng.

ĐẶC TÍNH CẦN THIẾT CỦA PLASMID TRONG KỸ THUẬT CLONING

Có ba đặc tính:

- Trọng lượng phân tử thấp
- Khả năng thăm dò các tính trạng chọn lọc trên tế bào chủ
- Có cloning site đủ cho một lượng lớn restriction enzyme

## 29.5. Những Plasmid khác trong kỹ thuật Cloning

Plasmid pBR322 được xem dùng vectơ trong kỹ thuật cloning rất phổ biến. Nó chỉ có một ít vị trí cloning có tính đồng nhất (cloning sites), việc sử dụng nó cần một qui trình có tính chọn lọc về thời gian. Vì vậy, người ta cần phải phát triển thêm những hệ thống khác. Thí dụ **plasmid pUC19** có 2686 bp, chứa gen kháng ampicilline, β-galactosidase gene (*lacZ'*) trong cơ chế operon về lactose của *E.coli*, gen *lac*I sản xuất ra repressor protein - điều tiết sự thể hiện của *lacZ'*, một đoạn mã ngắn có nhiều cloning site (như *Eco*RI, *Sac*I, *Knp*I, *Xma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I, *Hind*II, *Acc*I, *Bsp*MI, *Pst*I, *Sph*I, *Hind*III), và nguồn của sự tái lập lại từ pBR322.

Qui trình chọn lọc của pUC19: tế bào mang pUC19 chưa được cải tiến được phát triển trong môi trường isopropylthiogalactoside (IPTG) - một inducer trong *lac* operon. Sản phẩm của gen *lacI* không thể kết dính với vùng hoạt động của promoter - operator của gen *lacZ'*, cho nên gen *lacZ'* trong plasmid được chuyển mã và giải mã. Protein *lacZ'* phối hợp với protein đã được mang tín hiệu di truyền của DNA nhiễm thể, để tạo ra một β-galactosidase lai và hoạt động mạnh mẽ. Cuối cùng chất còn lại 5-bromo-4-chloroindolyl-β-galactosidase (X-gal) trong môi trường, sẽ bị thủy phân bởi β-galactosidase lai này, cho ra một sản phẩm màu xanh lơ. Trong điều kiện như vậy, các colonies có chứa pUC19 chưa cải tiến sẽ xuất hiện màu xanh này.

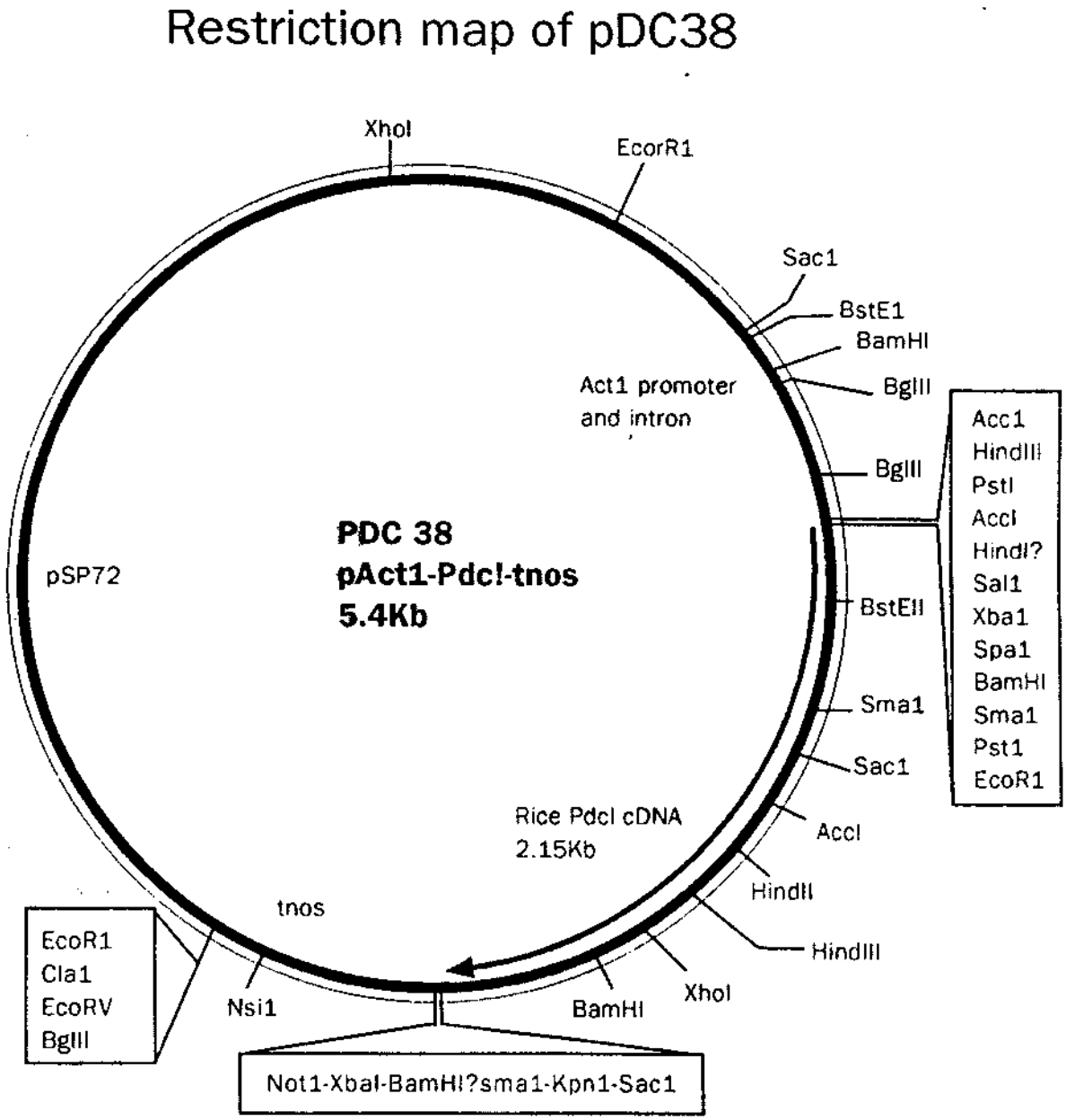
Trong thí nghiệm tạo dòng bằng pUC19, phân tử DNA của sinh vật (source DNA) được cắt bằng restriction endonuclease để có điểm tương ứng cho kỹ thuật cloning sequence. Phân tử DNA này được kết với pUC19. Người ta xử lý pUC19 bằng restriction endonuclease giống như đối với DNA. Sau đó, người ta cho xử lý với alkaline phosphatase. Sau khi gắn chúng vào bằng T4 DNA ligase, phản ứng kết hợp được thực hiện, do sự chuyển nạp vào tế bào chủ. Tế bào chủ có thể tự tổng hợp một phần β-galactosidase để kết hợp với sản phẩm của *lacZ'* gen, tạo ra enzym chức năng. Tế bào chủ này được đặt sang môi trường có chứa ampicillin, IPTG, và X-gal. Những tế bào không được chuyển nạp, không thể phát triển trong môi trường có ampicillin. Tế bào có plasmid được tái lập chu kỳ, sẽ phát triển được trong môi trường ampicillin, bởi vì nó có thể tạo ra β-galactosidase chức năng, nó sản xuất ra các colonies có màu xanh lơ. Trái lại, tế bào chủ mang cấu trúc "plasmid-cloned DNA" sẽ cho ra colonies màu trắng, trên môi trường này. Bởi vì, DNA được gắn vào vị trí restriction endonuclease trong nhiều chuỗi mã của dòng sẽ đột phá khả năng đọc của gen *lacZ'* và ngăn cản việc sản xuất protein *lacZ'* chức năng, tạo ra hệ quả là không có một β-galactosidase lai nào được sản xuất. Sự vắng mặt β-galactosidase làm cho X-gal trong môi trường không chuyển đổi thành hợp chất màu xanh. Colonies màu trắng (positive) sẽ được thanh lọc ngay sau đó, để xác định xem cái nào mang chuỗi mã DNA cần thiết cho nghiên cứu.

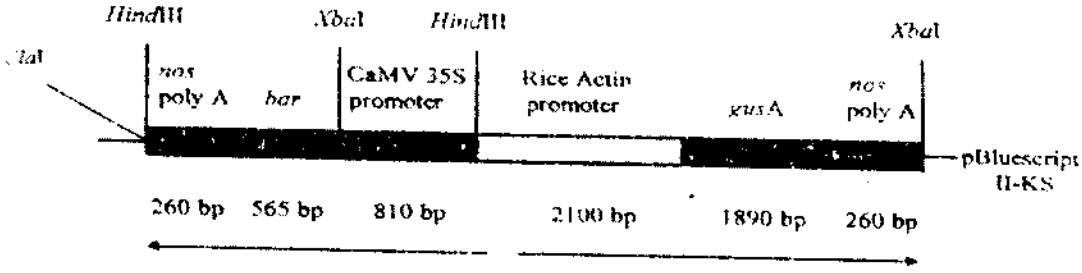
Bổ sung với pBR322 và các series của pUC plasmid, nhiều cloning vectơ khác cũng đã được xem xét. Nguyên tắc chung bao gồm hai yêu cầu cơ bản như sau cho kỹ thuật recombinant DNA là:

- chọn cloning site
- cách nào dễ nhất để xác định tế bào có cấu trúc "plasmid-cloned DNA"

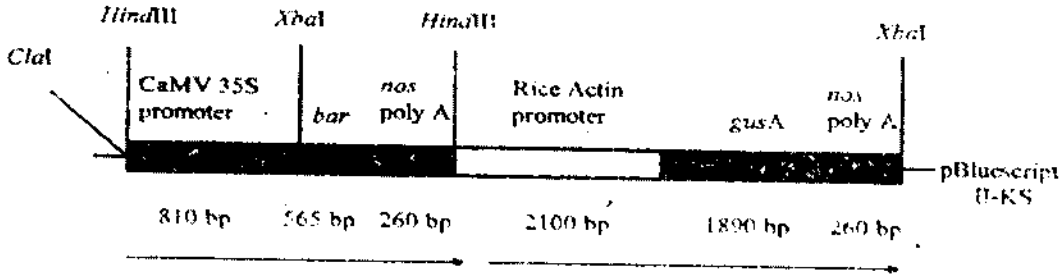
Vị trí của restriction endonuclease là chức năng cực kỳ quan trọng trong nghiên cứu recombinant DNA

Các plasmid thường dùng trong nghiên cứu : hình 29.1.

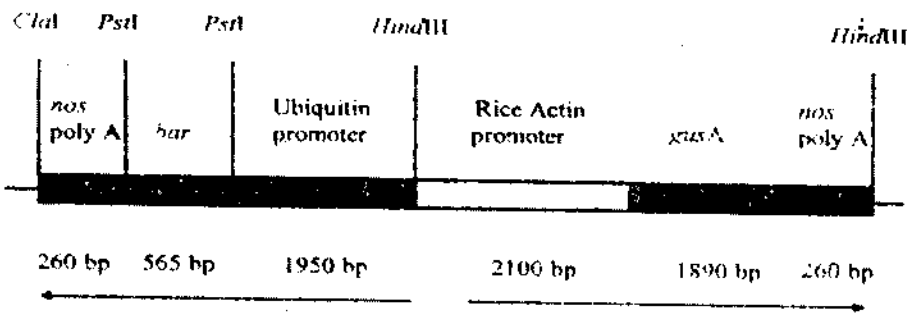





**pAG35Bar(A)- 8.85 kb**




**pAG35Bar(S)- 8.85 kb**

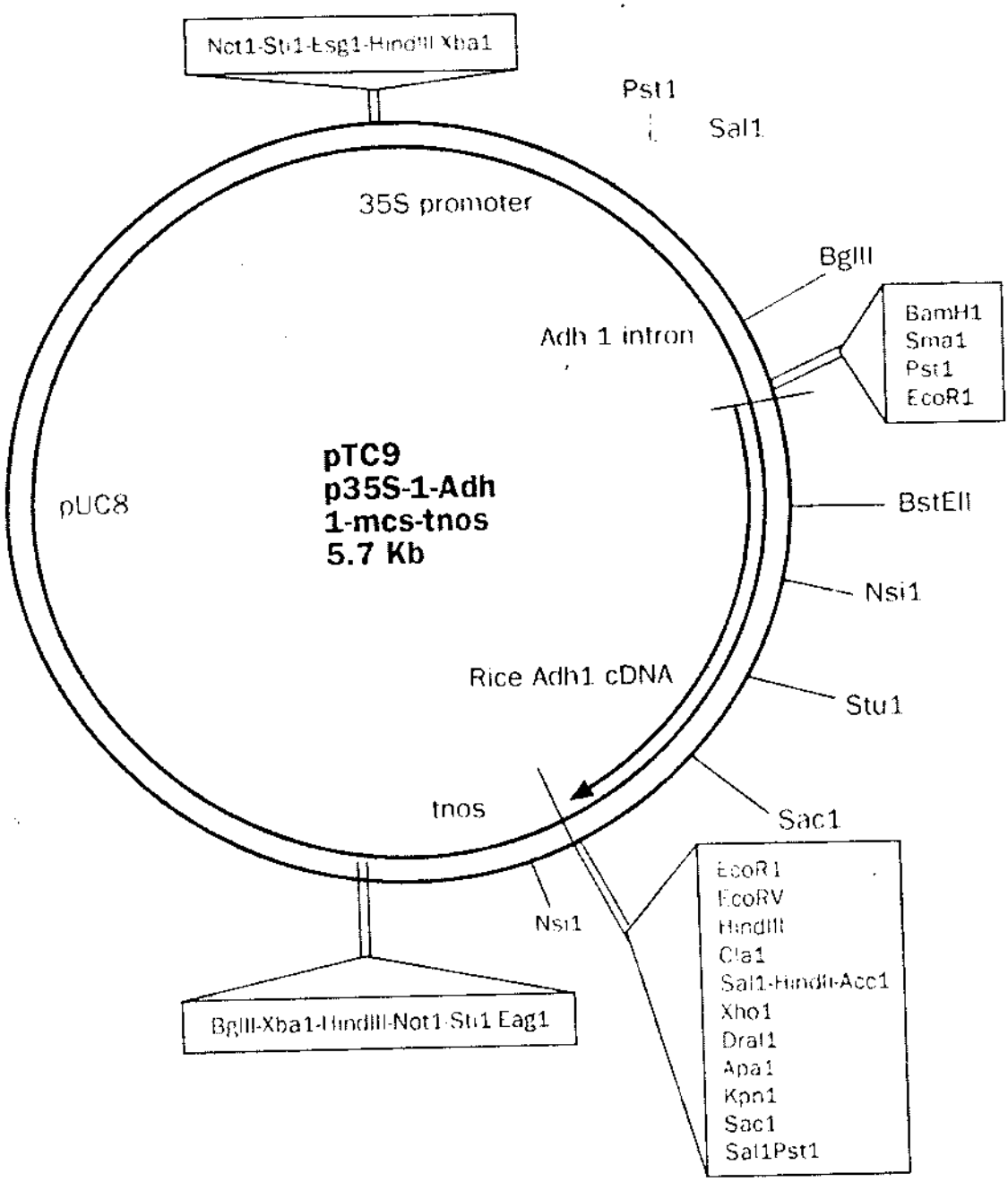


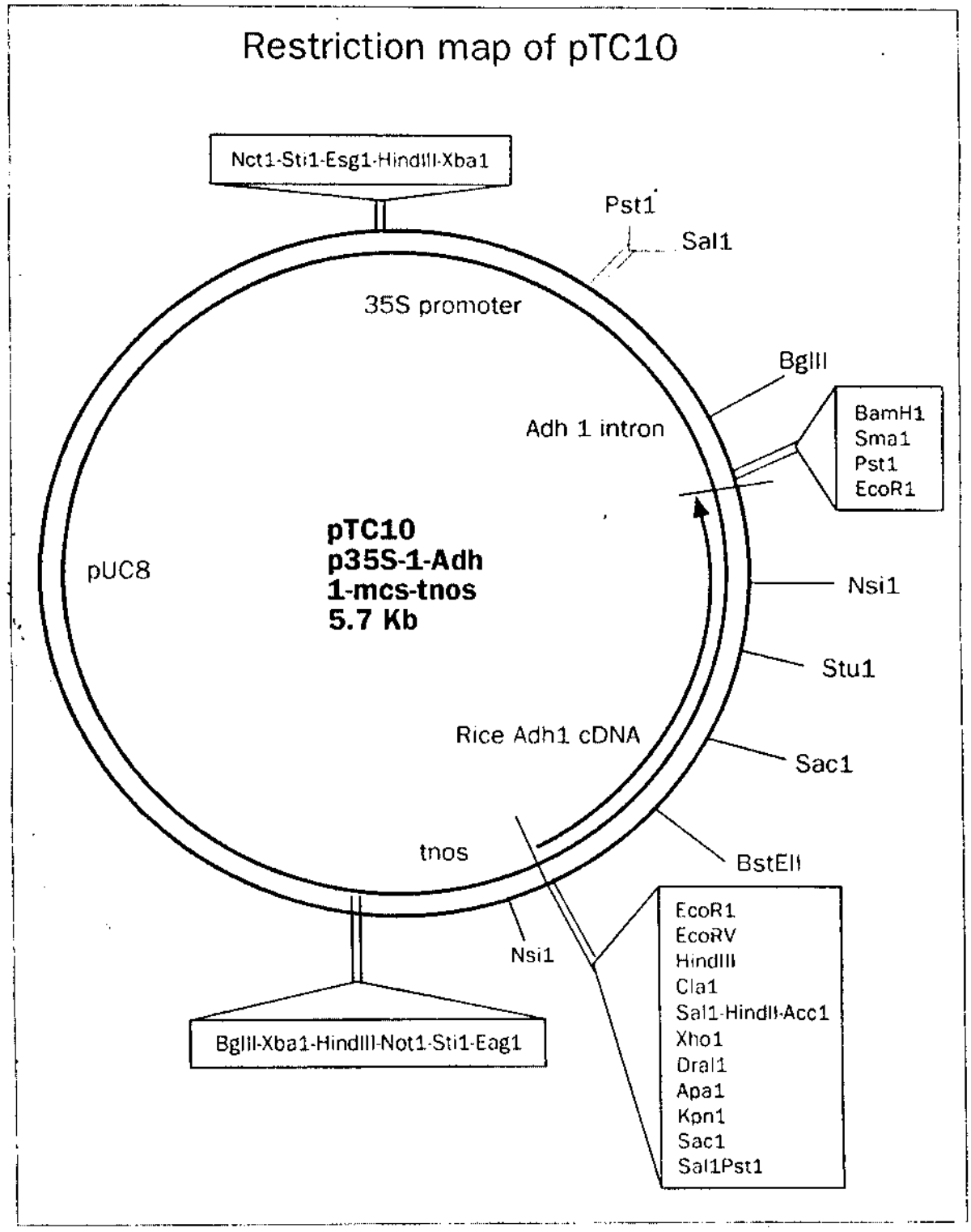

**pAGUB- 9.85 kb**

*Hình 29.1: Ba plasmid (Hiei và ctv 1994)*

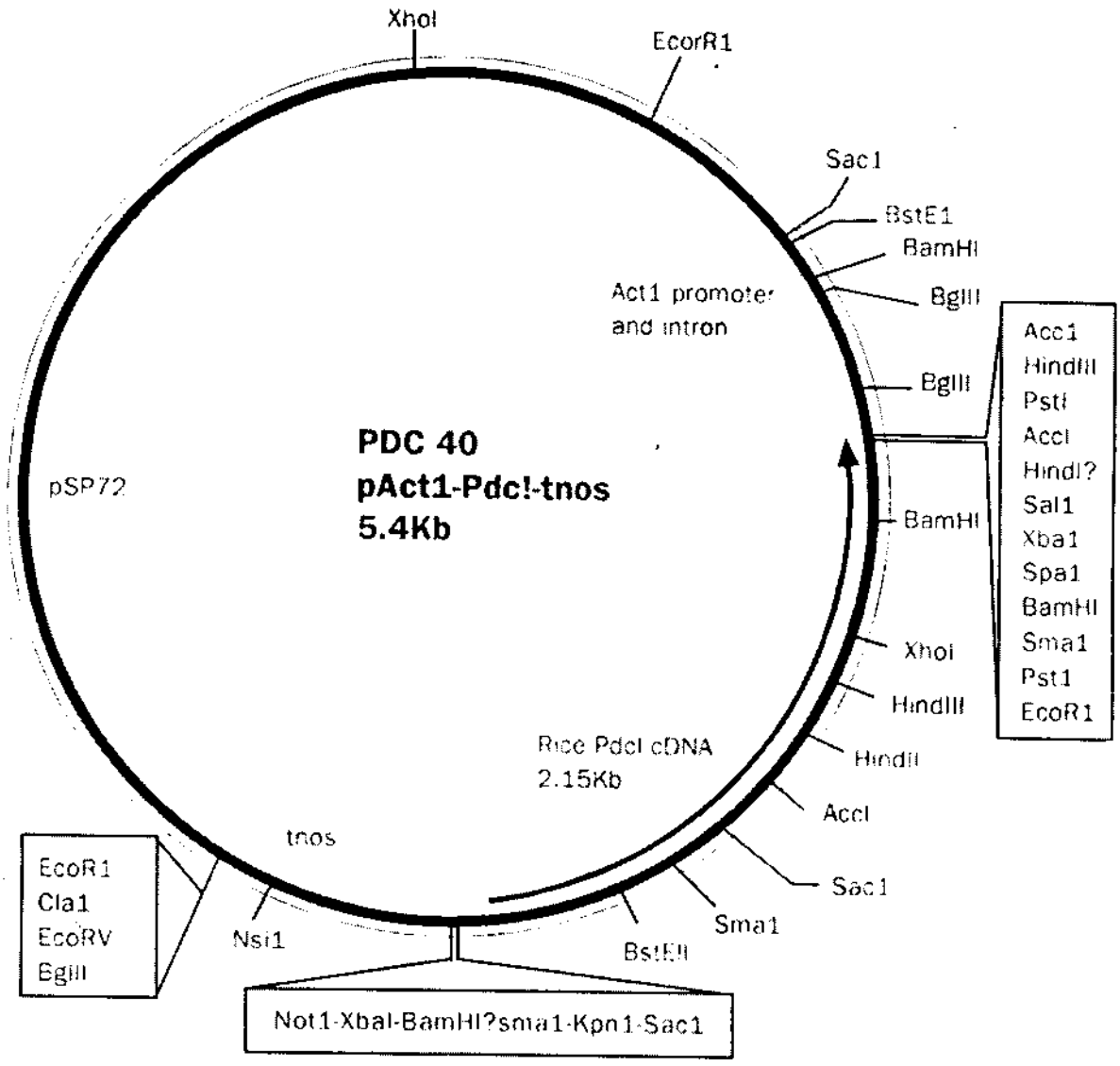
Hình 29.1 cho thấy mỗi plasmid cho gene gus A, với encode cho B Glucuronidase (GUS) được kiểm soát bởi promoter hoạt động của cây lúa

# Restriction map of pTC9




Restriction map of pTC10
Nct1-Sti1-Esg1-HindIII-Xba1
Pst1
Sal1
35S promoter
BglII
BamH1
Sma1
Pst1
EcoR1
Adh 1 intron
pTC10
p35S-1-Adh
1-mcs-tnos
5.7 Kb
pUC8
Nsi1
Stu1
Rice Adh1 cDNA
Sac1
tnos
BstEII
EcoR1
EcoRV
HindIII
Cla1
Sal1-HindII-Acc1
Xho1
DraI1
Apa1
Kpn1
Sac1
Sal1Pst1
Nsi1
BglII-Xba1-HindIII-Not1-Sti1-Eag1

# Restriction map of pDC40




**Tài liệu tham khảo**


Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. 1994. efficient transformation of rice mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boudaries of the T-DANA plant J. 6: 271-282

# 30. ESCHERICHIA COLI

## 30.1. Giới thiệu

*Escherichia coli* là vi khuẩn với bộ nhiễm sắc thể có khoảng 3 triệu basepairs(bp). Thường chúng có thể phát triển trên môi trường giàu carbon như glucose và muối có nitrogen, phosphourus, và kim loại, *E.coli* phát triển rất nhanh, nhất là trên môi trường giàu dinh dưỡng cung cấp tế bào với amino acid, vitamine, v.v...

Khi *E.coli* phát triển trong môi trường lỏng, một số lượng tế bào được phân lập trong môi trường vô trùng. Sau một thời gian, thì gọi là *lag*, vi khuẩn bắt đầu phân chia. Trong môi trường giàu dinh dưỡng, một chuỗi đôi được hình thành trong 20-30 phút. Giai đoạn phase này gọi là *log* phase (có thể phân chia giai đoạn này *log* sớm, *log* trung và *log* muộn)

## 30.2. Chuẩn bị môi trường và dụng cụ cho nghiên cứu vi khuẩn

Môi trường mini

Các chất cần cho môi trường này như sau :

***5X M 9/lít***

30g $Na_2PO_4$

15g $K_2PO_4$

5g $NH_4Cl$

2,5g NaCl

15mg $CaCl_2$

***5x M63/lit***

10g $(NH_4)2SO_4$

68g $KH_2PO_4$

2,5 mg $FeSO_4 7H_2O$

pH với KOH = 7

***5x A/lit***

5 g $(NH_4)_2SO_4$

22,5 g $KH_2PO_4$

52,5 g $K_2HPO_4$

2,5 g sodium citrate $2H_2O$

***Môi trường Giàu dinh dưỡng***

***Môi trường H/lít***

10g tryptone

8g NaCl

***LB lambda broth/lit)***

10g tryptone

2,5 g NaCl

***Môi trường LB/lit***

10g Tryptone

5g yeast extract

5 g NaCl

1 ml 1N aOH

***NZC broth/lít***

10 g NZ amine A

5 g NaCl

2g Mg $Cl_2$ 6 $H_2O$

5ml của 20% casamino acid

***Superbroth/lit***

32 g tryptone

20 g yeast extract

5g NaCl

5ml 1N NaOH

***Tryptone broth/lit***

10g tryptone

5g NaCl

***2x TY/lít***

16g tryptone

10g yeast extract

5 g NaCl

*TYGPN/lít*

20tryptone

10g yeast extract

10ml 805 glycerol

5g $Na_2HPO_4$

10 g $KNO_3$

*Môi trường rắn*

Từ môi trường lỏng chuyển sang môi trường rắn chúng ta cần phải bổ sung lượng agar

*H plate/lít*

10g tryptone

8g NaCl

15g agar

*Lambda plate/lít*

10g tryptone

2,5 g NaCl

10 g agar

*LB plate/lít*

10 g tryptone

5 g yeast

5 g NaCl

15 g agar

1ml 1N NaOH

*Thêm vào các hóa chất*

Antibiotic

Ampicillin 50μg/ ml

Tetracycline 12μg/ml

C1c antibiotic

Galactosides

Xgal tới 20μg/ml

IPTG 0,1mM

Các galactosides

# 31. CHUẨN BỊ TẾ BÀO (E. COLI, DH E5 α)

## 31.1. Mở đầu

Thư viện tế bào DH E5 α đã được chuẩn bị trong thư mục, những tế bào này theo sau là phân tử cDNA sử dụng vector pUC hay pBR322 để chuyển hay giao đến tế bào ngoại lai. Một số marker cung cấp bổ sung cho gen β-galactosidase từ pUC hoặc các vector tương đương.

## 31.2. Phương pháp

1. Quần lạc (Colony) đơn của tế bào *E.coli* (DH 5 α) được ú trong 5ml Luria broth (LB) và trồng trong môi trường 37°C qua đêm với máy lắc (225rpm).
2. 2ml quần lạc phát triển qua đêm được cấy trong môi trường 200ml của LB trong 500ml và trồng cho tới khi độc OD đạt giá trị 0,5 (ở 660nm)
3. Tế bào được đưa vào đá lạnh
4. Ly tâm 1000rpm tại 4°C trong 15 phút
5. Thêm vào ml dung dịch CM 1 buffer
6. Trộn mẫu (để trong đá) trong 20 phút, ly tâm 1000rpm ở điều kiện 4°C trong 10 phút
7. Pellet được đưa vào dung dịch CM 2 buffer

Tế bào dự trữ trong -20°C

***CM 1buffer***

100mM Sodium acetate pH 5,6

50mM $MnCl_2$

5mM NaCl

***CM 2 buffer***

10mM Sodium acetate pH 5,6

5% (v/v) glycerol

70mM $CaCl_2$

5mM $MnCl_2$

***LB Broth***

10% của Bacto Tryptone

5g Yeast Extract

Nước

***LiCl buffer***

5ml 1,0M Tris pH 7,5

2,23 g EDTA ( 62,5mM)

0,4ml triton X-100 (0,4%)

10,6g LiCl crystals (2,5M)

Nước 100ml

***Chuyển vi khuẩn***

| Thành phần | Số lượng |
|---|---|
| DH 5 α tế bào | 500ul |
| PUC 19 Monomer 90,01ug/ml) | 10ul |

***Môi trường***

SOC

| | | |
|---|---|---|
| Bactotrytone | 2% | 2,g |
| Yeast Extract | 0,5% | 0,5g |
| NaCl | | 1ml |
| KCl | 2,5nM | 0,25ml |
| $MgCl_2$, $MgSO_4$ | 20mM | 1ml |
| Glucose | 20mM | 1ml |
| $H_2O$ cất | | cho tới 100ml |

**Phương pháp :**

1. Một stock dung dịch chứa pUC19 (0,01μg/ml) cung cấp cho việc chuyển gen có hiệu quả.
2. Chuẩn bị mẫu để trong đá
3. Di chuyển tế bào competent từ -70$^0$C đặt vào đá trong 5 phút
4. Nghiền tế bào, cho 100μl tế bào vào polypropylene tubes
5. Để vào đá
6. Thêm 5μl tới 1 100μl tế bào
7. Phản ứng hòa tan 5 lần trong 10mM Tris HCl pH 7,50 và 1mM NA 2 EDTA, thêm 1-5 μl. Trộn nhẹ
8. Ủ trong đá 30 phút
9. Làm nóng tế bào 54 giây trong 42$^o$C trong nước, nhớ không được lắc
10. Để vào đá trong 2 phút
11. Thêm 0,8ml SOC
12. Ly tâm vào 225 rpm (37$^o$C trong một giờ)
13 . Hòa tan phản ứng chứa plasmid DNA 1: 10 với SOC

Trải 100μl trên dung dịch LB hoặc YT với 100μg/ml ampicilline và 50 μg/ml X-gal

14. Hòa tan phản ứng cần thiết thêm như giai đoạn 12
15. Ủ qua đêm

# 32. CHUẨN BỊ PHÂN TÍCH DNA VI KHUẨN

## 31.1. Mở đầu

Trong phần này, chúng tôi muốn giới thiệu các kỹ thuật làm tinh khiết DNA của vi khuẩn, tế bào cây, và tế bào động vật .

Muốn có mẫu DNA tinh khiết cần qua các bước sau

## 31.2. Vật liệu

Ly trích nhờ Phenol và kết tủa bởi cồn trên DNA

Vật liệu

25:24:1 phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol

3M sodium acetate pH 5,2

100% cồn trong đá

70% cồn

TE buffer

## 31.3. Phương pháp

Ly trích phenol

1. Thêm vào bằng thể tích tương đương với ba chất phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol trong dung dịch DNA
2. Rung (vortex) trong 10 phút
3. Để yên 15 giây ở nhiệt độ trong phòng
4. Loại bỏ DNA tạp
5. Nếu mẫu kết tủa trắng thì lập lại giai đoạn từ 1 - 4

Kết tủa ethanol

6. Thêm vào 1/10 vol của 3 M sodium acetate, pH = 5,2
7. Thêm 2,5 vol của 100% cồn, trộn trong 5 phút
8. Rung (vortex) 5 phút
9. Một lượng nhỏ pellet kết tủa, do đó lấy pipette hút bỏ chất lỏng bên trong tube
10. Thêm 1ml cồn 70% trộn vài lần
11. Loại bỏ cồn bên dưới là pellet
12. Phơi khô pellet
13. Hòa pellet với TE

# 33. PHÂN CẮT MỘT PHẦN VÀ KÍCH THƯỚC CỦA PHÂN TỬ DNA

## 33.1. Mở đầu

Có hai loại phân cắt, phân cắt toàn phần và phần cắt một phần, trong giới hạn của phương pháp này thực hiện phân cắt một phần để thực hiện trong các bước tiếp theo trong thiết lập ngân hàng gen.

## 33.2. Dụng cụ và phản ứng

Điện di

0,5x TBE

UV

100mM PMSP dung dịch

Buffer 10mM Tris (pH 8,0), 50mM EDTA

5% Bleach

Incubator

10x *Hin*dIII

LMP agarose

## 33.3. Phương pháp

1. Mẫu DNA được đưa vào TE buffer (1/100 của 100mM PMST ở nhiệt độ 50°C trong hai giờ.
2. 1x *Hin*dIII buffer nhiệt độ trong phòng sau 1 giờ.
3. Bỏ buffer hoàn toàn. Đun 65°C trong 15 phút. Cẩn thận trong 10 phút
4. Thêm 10-15 unit *Hin*dIII, để 37°C, thêm 10µl 0,5EDTA
5. Đun agarose và chuẩn bị gel (1% agarose + 0,5 XTBE) để cứng trong 30 phút.
6. 2 lít dung dịch rửa 5% điện di trước khi cho chạy PFGE

   Hai lít nước cất rửa lại trong 20 phút, bỏ tất cả nước thay vào 0,5TBE và lạnh 30 phút
7. Chuyển mẫu NDA vào giếng
8. Chạy điện di

   chạy trong 18 giờ v/cm 4,5, nhiệt độ 11°C
9. Di chuyển gel sau khi chạy điện di, ngâm trong ethidrium bromide trong 30 phút
10. Kiểm tra dưới UV
11. Chụp hình

## 33.4. Ứng dụng

Ứng dụng plasmid, phục vụ cho kỹ thuật Southern blot và cloning

# 34. PHƯƠNG PHÁP MINI PLAMID BAC

## 34.1 Mở đầu

BAC (bacterial artifical chromosome) là một hệ thống để thiết lập thư viện genomic. Kích thước BAC khoảng 100-300kb (Shizuya và ctv 1992). Hệ thống BAC rất cần thiết trong khi xây dựng bản đồ vật lý. Việc ly trích DNA của plamid có phần khác hơn ly trích DNA của cây, đòi hỏi các bước chuẩn bị đúng thời gian, đảm bảo tế bào kết tủa tốt.

## 34.2. Vật liệu

Dung dịch 1:

| | |
|---|---|
| Glucose | 1,8g |
| 1M Tris 9 pH 8,0) | 5ml |
| 0,5m EDTA | 4ml |

Dung dịch II:

| | |
|---|---|
| 10% SDS | 0.5ml |
| 5N NaOH | 0.2ml |
| Nước | 4.3ml |

Dung dịch III:

| | |
|---|---|
| 5M KOAC | 3ml |
| Glacia acetic acids | 1.25ml |
| Nước | 1.42ml |

## 34.3. Phương pháp

1. Thu thập các colony được ủ trong 1LB ml chứa 12,5µg/ml chloramphenicol và ủ tế bào trong nhiệt độ 37°C, lắc 250rpm
2. Chuyển dung dịch qua tube mới và ly tâm 10.000 vòng trong 30 giây
3. Loại bỏ supernatant và đưa tế bào vào 300µl dung dịch I chứa 5mg/ml lysozyme. Ủ trong đá trong 5 phút
4. Thêm 300µl dung dịch II, đảo vài lần. Ủ trong đá 10phút
5. Thêm dung dịch III và ủ trong 10 phút
6. Ly tâm ở vận tốc 10.000rpm trong 5 phút

6. Chuyển supernatant vào tube, thêm 600µl chloroform: isoamyl alcohol (24:1) và đáo nhiều lần. Ly tâm 10.000 rpm trong 5 phút. 850 ml supernatant chuyển qua tube mới thêm vào 600µl isopropanol. Ủ nhiệt độ trong phòng.
7. Ly tâm 10.000 rpm trong 500µl của 70% cồn lạnh.
8. Bỏ suprnatant và rửa pellet với 500µl cồn 70% trong ba lần. Phơi khô DNA pellet trong 15-20phút.
9. Thêm vào 40µl TE và hoà pellet. Tồn trữ mẫu ở điều kiện nhiệt độ 4°C

**Tài liệu tham khảo**

Shizuya H, birren B, Kim UJ, Manicino V, slepak T, Tashiri Y, Simon M 1992. Cloning and stable maintenance of 300kb fragments of human DNA in Ercherichia coli using an F- factor based vetor. Proc Natl Acad Sci USA 89:8794-8797

# 35. CHUẨN BỊ TẾ BÀO VI KHUẨN

**35.1. Mở đầu**

Trong công nghệ gen cần chuẩn bị ba loại DNA

(1) DNA của tế bào chung xem như là nguồn vật liệu cho quá trình thực hiện từ gen tới cloning.

(2) DNA tinh khiết gọi là plamid DNA, đóng vai trò vectơ

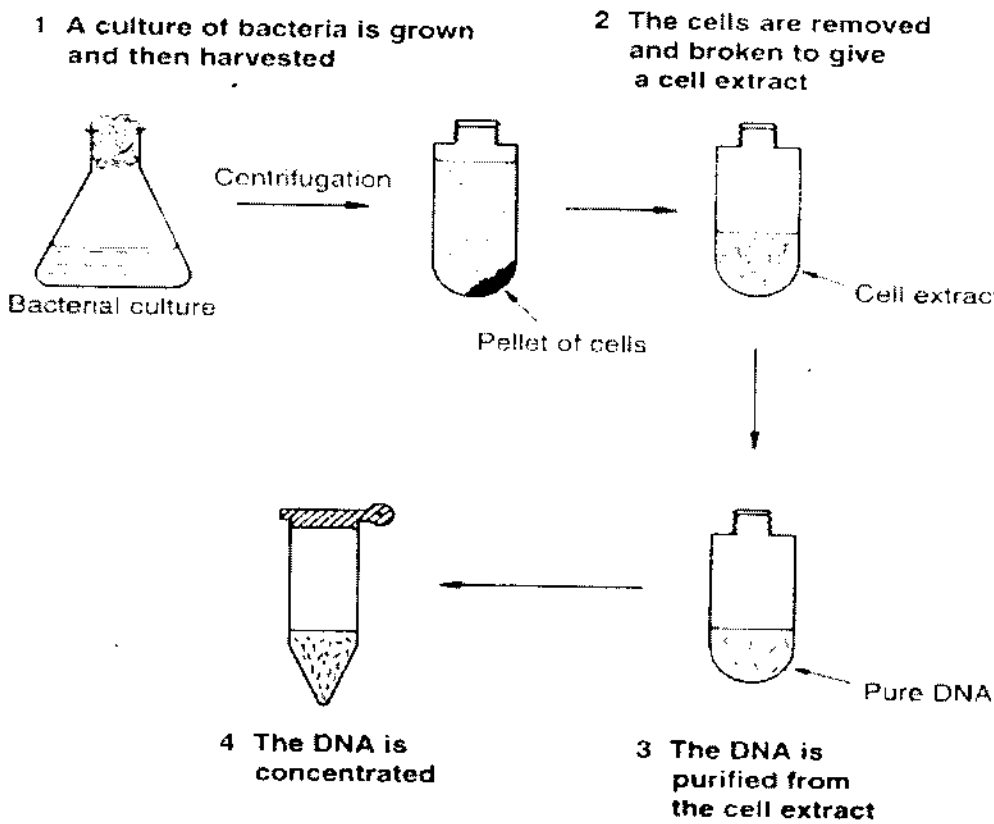
(3) DNA thực khuẩn thể (phage) dùng trong kỹ thuật cloning thông qua phage

**35.2. Phương pháp**

***Thực hiện các bước sau***

1. Cấy vi khuẩn cho phát triển và thu hoạch
2. Tế bào phá vỡ phóng thích ra DNA
3. Ly trích tế bào
4. DNA mục tiêu

Những bước căn bản của chuẩn bị DNA từ vi khuẩn (hình 35.1)




*Hình 35.1: Chuẩn bị DNA từ vi khuẩn*

**35.3. Các thành phần chính trong môi trường cấy vi khuẩn**

| Thành phần | G/l |
|---|---|
| 1. Môi trường M 9 | |
| $Na_2HPO_4$ | 6.0 |
| $KH_2PO_4$ | 3.0 |
| NaCl | 0.5 |
| $NH_4Cl$ | 1.0 |
| $MgSO_4$ | 0.5 |
| Glucose | 2.0 |
| $CaCl_2$ | 0.015 |
| 2. LB (Luria Bertani) | |
| Tristone | 10 |
| Yeast extract | 5 |
| NaCl | 10 |

# 36. PHÂN LẬP COLONY ĐƠN

## 36.1. Mở đầu

Quan trọng nhất là vi khuẩn phải tinh khiết, vi khuẩn nầy được tách và chuyển sang môi trường nuôi cấy để dùng các colony nầy trong nghiên cứu tiếp. Thêm vào đó khi tách vi khuẩn trên đĩa petri điều cần lưu ý là các colony phải có hình thái và màu xác minh chặt chẽ trước đó. Điều nầy để sử dụng và kiểm chứng lại vi khuẩn có đúng với vi khuẩn ban đầu hay không? Bởi vì vi khuẩn rất dễ dàng lẫn tạp.

## 36.2.Vật liệu

Đĩa L agar

Chuỗi E.Coli trên dĩa petri rắn hay lỏng

Đèn cồn và hột quẹt

Que cấy

Tủ ấm (37°C)

## 36.3. Phương pháp

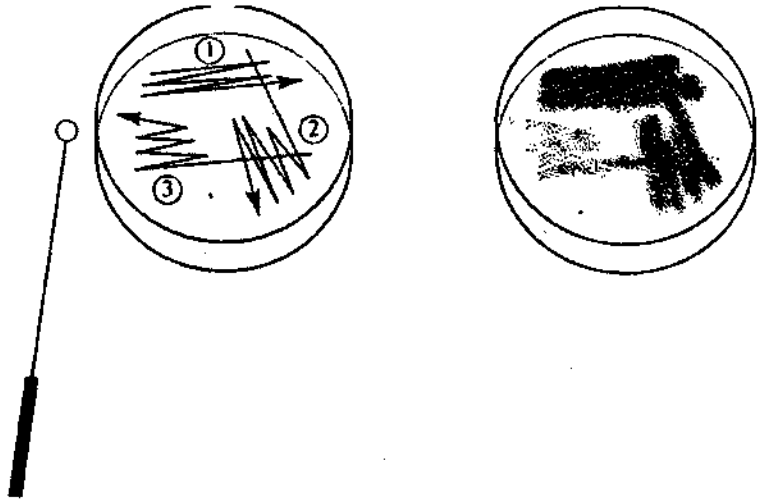
1. Cầm cây cấy hơ lên lửa đèn cồn cho tới khi que cấy đó, di chuyển que cấy sang cho nguội dần. Để cho chắc chắn que cấy nguội và sạch để nhẹ trên bề mặt của thạch (thanh trùng) mà không có vi khuẩn, (Hình 36.1)
2. Dùng que cấy nhặt một số lượng nhỏ vi khuẩn, chuyển sang môi trường lỏng để cấy và nuôi chúng.
3. Chú ý tách và trải đều trên bề mặt của thạch, di chuyển trên bề mặt của thạch qua 4 lần
4. Trở lại đưa que cấy thanh trùng trên đèn cồn và tiếp tục cấy sang môi trường đĩa mới
5. Thanh trùng que cấy
6. Ủ vi khuẩn ở nhiệt độ 37°C qua đêm

Sang hôm sau colony của vi khuẩn mọc đều và tách ra từng colony một, nếu không thấy colony thì phải cấy lại.

Có thể tách colony từ một colony, một vi khuẩn có thể tách từ 8 đến 12 lần để lấy được colony đơn trên cùng một đĩa petri.

**Kiểm tra tinh khiết của kỹ thuật trên**

Kiểm tra dung dịch làm bằng tay mà không bị tạp




*Hình 36.1 : Cách cấy và phân lập vi khuẩn*

# 37. PHƯƠNG PHÁP COLONY LYSIS

## 37.1. Mở đầu

Phương pháp này chủ yếu chuẩn bị vật liệu cho các nghiên cứu tiếp

## 37.2. Dụng cụ và hóa chất

Máy thermocycler

Tấm thanh trùng

PCR tube

Lysis buffer (100mM Tris HCl, pH = 8,3, 20mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, 1,0% Tween 20.

## 37.3. Phương pháp

1. Đặt 10µl dung dịch Lysis vào tube
2. Để một phần colony từ đĩa petri chuyển sang PCR tube thông qua dụng cụ cây tâm.
3. Ủ trong máy thermocycler ở 99°C trong 5 phút, rồi đặt ngay vào đá

## PHƯƠNG PHÁP KHUYẾCH ĐẠI PLASMID CHÈN VÀO MÃ DI TRUYỀN

### I. Dụng cụ và phản ứng

Thermocycler

10X PCR buffer 100mM Tris HCl pH = 8,3, 20mM $MgCl_2$, 500mM KCl, 1% Tween

Ampli taq polymere

Template DNA hoặc colony từ phương pháp trên (Phương pháp Colony lysis)

Dung dịch nucleotide (2mM của dNTP)

PCR primers

Primer A:

Primer B

### Phương pháp

1. Chuẩn bị khối lượng dung dịch cần cho phản ứng PCR

| | |
|---|---|
| 10x PCR buffer | 5µl |
| primers | 2µl |

| | |
|---|---|
| dNTP | 5µl |
| *Taq* | 1U |
| Nước cất | lên cho 50µl |

2. Thêm 1-2 mol template DNA (hoặc 5µl colony)
3. Đậy 25µl dầu (mineral oil)
4. Chương trình cho máy như sau

| Giai đoạn | Chu kỳ, thời gian | Nhiệt độ |
|---|---|---|
| Giai đoạn 1 | 30 giây | 96 |
| Giai đoạn 2 | 3phút( 30 chu kỳ) | 72 |
| Giai đoạn 3 | 10 phút | 72 |

5. Kiểm tra sản phẩm PCR trên agarose gel

# 38. CHUẨN BỊ VÀ LÀM TINH KHIẾT VECTƠ DNA

## 38.1. Mở đầu

Việc tạo một mẫu vectơ đảm bảo sạch, tinh khiết phục vụ cho thiết kế một cấu trúc BAC mới rất quan trọng. Do đó cần thực hiện các bước sau

## 38.2. Dụng cụ và hóa chất

*E.coli* DH 10B / pBeloBAC 11

LB / 12,5ug chloramphenicol/ ml 40ul của% x aga, 10 ul của 2% IPTG

Dnase free (10mg/ ml)

Chroloform: isoamyl alcohol (24:1)

300ml dung dịch 1 (50mm glucose, 25mM Tris Cl, 10mM EDTA)

300ml dung dịch II: 30ml 10% SDS, 16ml 5 N NaOH, nước 254ml

300ml dung dịch III: 180ml 5MK AoC, 34,5ml acerace glacial, 85,5ml nước cất

## 38.3. Phương pháp tiến hành

1. Ủ tế bào có chứa chloramphenicol/ x gal / IPTG và ủ ở 37°C qua đêm
2. Nhặt các colony màu xanh và ủ trong 30ml LB chứa 30ug/ ml chloramphenicol. Ủ nhiệt độ 30°C qua đêm với lắc nhẹ
3. Di chuyển 6ml dung dịch cấy vào 1lít LB chứa 30µg/ ml chloramphenicol. Ủ 30°C qua đêm hoặc 7 - 8 giờ trong ABS 600 cho tới 1,3 - 1,5
4. Ly tâm tế bào trong 600rpm ở nhiệt độ 4°C trong 15 phút. Di chuyển chất supernatant từ tube
5. Lập lại tế bào trong 800 ml dung dịch STE, ly tâm lại, pellet của tế bào trong 240ml dung dịch 1 và thêm 8ml lysozyme 10mg/ml. Ủ trong đá 5 phút
6. Thêm 240 ml dung dịch II. Đảo tube vài lần. Ủ ở nhiệt độ 5 phút
7. Thêm 240 ml dung dịch III. Đảo tube vài lần. Giữ đá trong 10 phút
8. Ly tâm 700rpm ở nhiệt độ trong phòng 15phút
9. Lọc supertatants sang tube mới. Thêm 504ml (0,7 thể tích) isopropanol. Đảo và trộn tốt, nhiệt độ trong phòng, thời gian 15 phút.
10. Ly tâm 800rpm nhiệt độ trong phòng trong 20 phút
11. Loại bỏ supernatant và rửa pellet với cồn 70% ba lần. Phơi khô pellet trong 10-15 phút

12. Thêm 20ml TE buffer để hòa tan pellet. Thêm 40µl stock RNase ADN ase. Ủ nhiệt độ 37°C trong 30 phút
13. Thêm vào với số lượng tương đương chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Đảo tube vài lần
14. Ly tâm 3500rpm trong 10 phút
15. Cẩn thận di chuyển supernatant với pippetman không gây tổn thương lớp bên giữa
16. Thêm 1/ 10 vol 3M sodium acetae và 2x vol ethanol vào trong tube. Đặt -20°C tối thiểu 3 giờ
17. Ly tâm 10.000rpm ở nhiệt độ 4°C trong 15 phút. Lập lại giai đoạn 11
18. Thêm 3,8ml TE và hòa pellet thêm 4,2 g CsCl. Sau khi CsCl hòa tan, 0,2ml ethidium bromide là 10mg/ml. DNA/CsCl/ethidium bromide. Load tube vào trong ly tâm
19. Ly tâm 55.000rpm nhiệt độ 20°C trong 16 giờ
20. Sau khi ly tâm, phú DNA plamid
21. Thêm số lượng tương đương nước, isoamyl alcohol. Trộn hai phase trong tube
22. Ly tâm 1500rpm trong 3 phút
23. Chuẩn bề mặt vào thùng chứa
24. Lập lại giai đoạn 21-23 sáu lần cho tới khi màu biến mất
25. Hòa 5 lần dung dịch DNA với TE thêm 2x vol ethanol ở 4°C trong 15 phút. Ly tâm 10.000 rpm ở nhiệt độ 4°C trong 15 phút
26. Supernatant được loại bỏ và pellet DNA rửa ba lần cồn lạnh 70%. Phơi pellet trong 20 phút. Thêm TE vào để hòa tan pellet
27. Kiểm tra nồng độ DNA trên 1% agarose. Mẫu được giữ trong -20°C

# 39. CHUẨN BỊ BỘ LỌC VỚI MỨC ĐỘ CAO CHO LAI COLONY

## 39.1. Mở đầu

Đây là kỹ thuật chuẩn bị cho việc lai colony, thành công trong việc lai colony tùy thuộc vào bước chuẩn bị bộ lọc (filter) có tốt hay không.

## 39.2. Dụng cụ

Kéo

Giấy

Môi trường LB

Chloramphenicol

Hybond filter

SSC

EDTA

## 39.3. Phương pháp

1. Cắt Hybond filter với kích thước 10x 23 cm. Đặt filter trên hai mảnh giấy Whatman có chứa LB 25ug/ ml chloramphenicol.
2. Ủ bốn khay (1536 BAC clone) cho mỗi Hybond filter dùng 386 giếng
3. Chuyển filter mang colonies có chứa aga với 25ug/ ml chloramphenicol. Ủ trong nhiệt độ 37°C trong 12-15 giờ cho tới colonies xuất hiện, 3mm bề dầy
4. Loại bỏ filter từ khay, tấm (3mm) Whatman filter được ngâm 10% SDS trong 5 phút
5. Chuyển qua filter Whatman với 0,5N NaOH, 1,5M NaCl trong 7 phút
6. Chuyển filter trên giấy Whatman filter với 0,5M Tris -HCl 9 pH 7,5), 1,5 M NaCl, 1mm EDTA (pH 8,0) trong 5 phút
7. Lập lại giai đoạn 6
8. Chuyển qua giấy Whatman với 2 x SSC, 0,1 % SDS trong 5 phút và 2x SSD cho 5 phút
9. Chuyển filter vào giấy thấm để hút ẩm và làm khô giấy filter trong 1 phút
10. Chuyển filter vào trong 0,4N NaOH trong 20 phút
11. Rửa filter trong 1000ml của 5 xSSC, 0,2% SDS với 20phút
12. Rửa filter với 1000ml, 2x SSC và rửa hai lần trong 5 phút
13. Phơi khô filter, lấy giấy nhôm gói lại phơi khô 80°C trong 2 giờ

# 40. LAI COLONY CHO THƯ VIỆN BAC

## 40.1. Mở đầu

"Map-based cloning" là một chiến lược lâu dài trong nghiên cứu các gen quan trọng trên cây trồng hoặc vật nuôi. Muốn phân tích một vùng nhiễm sắc thể khá rộng cần phải phát triển thư viện của genome chứa đoạn lớn phân tử DNA. Mới đây thư viện BAC được thiết lập dùng để ly trích các gen quan trọng và xây dựng bản đồ vật lý. Phương pháp lai colony để bổ sung BAC cho thư viện là bước cuối để thấy các clony mong muốn.

## 40.2. Hóa chất và dụng cụ

Dung dịch trước khi lai

| | |
|---|---|
| 20% SDS | 35ml |
| 1M $Na_2PO_4$ | 35ml |
| 1M $Na_2H_2PO_4$ | 15ml |
| 0,5M EDTA | 0,2 |
| Nước | 14,8ml |

## 40.3. Phương Pháp

### *40.3.1. Chuẩn bị filter*

Đối với filter sử dụng lần đầu, rửa filter với 150ml 5x SSC trong 1 giờ và nhiệt độ 50°C

### *40.3.2. Chuẩn bị dung dịch trước khi lai*

Tạo 100ml dung dịch trước khi lai, đun sôi 1,5ml sssDNA (10mg/ml) trong 10 phút trong nước nóng. Lập tức bỏ vào đá trong 1 - 2 phút. Thêm 0,5ml sssDNA tới 30ml pre hybridization trong hộp. Chuẩn bị lai đầu tiên ở 65°C trong 8 giờ

### *40.3.3. Labelling*

1 giờ trước khi chấm dứt lai đầu tiên, labelling proble. Chuẩn bị 80-100 ng DNA trong 40µl TE. DNA được đun sôi với nước trong 10 phút và giữ trong đá. Thêm 20µl label dung dịch (LS) 2 đơn vị enzyme và 4 µl (40Ci) của $P^{32}$ dCTP. Trộn cẩn thận bằng pipette. Ủ ở nhiệt độ 37°C trong hai giờ. Chuyển tube được label vào nơi có nhiệt độ 100°C và đun nóng probe trong 10 phút. Sau đó đặt chúng vào đá ngay.

### *40.3.4. Lai*

Hộp lai được trộn tốt

### *40.3.5. Rửa*

500ml dung dịch rửa

| | |
|---|---|
| Dung dịch rửa | 2000ml |
| 1M phosphate buffer | 40ml |
| 20% SDS | 10ml |
| Nước | 1950ml |

Rửa filter, đặt dung dịch rửa 65°C trong 10 - 15phút. Chụp ảnh

### *40.3.6. Chụp ảnh*

Đây là giai đoạn cuối ra kết quả

Để filter vào trong cassette. Đặt X ray film trong phòng tối. Phát triển phim trong 3-4 giờ .

# 41. PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP cDNA

## 41.1. Mở đầu

cDNA là DNA được bổ sung do quá trình chuyển mã ngược từ RNA, có thể thực hiện reverse transcriptase dùng RNA như template.

## 41.2. Phương pháp

Tổng hợp primer cDNA ngẫu nhiên theo các bước sau

1. Nung 2µl poly ( A) + mRNA trong 2 phút, nhiệt độ 72°. Chú ý để ngay vào đá

2. Trộn 10 phản ứng như sau :

| | |
|---|---|
| 10x PCR buffer | 20µl |
| 28mM $MgCl_2$ | 25µl |
| 100mM DTT | 2µl |
| 25mM dNTP | 4µl |
| 0,4µM randome hexamer | 5µl |
| 40 U/µl RNase | 2µl |

3. Mỗi mẫu của poly(A)+ mRNA, chuẩn bị theo phản ứng sau : thêm 17,5 µl của mỗi phản ứng và 0.5µl của AMVRtase(7,5U/µl ) tới 2µl của dung dịch đun nóng poly (A)+ mRNase

4. Chuẩn bị đối chứng

Một phản ứng cho AMV Rtase
Một phản ứng không có poly(A) mRNA

5. Ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 42°C

6. Ủ trong -20°C

## 41.3. Phản ứng và hóa chất cần dùng

Poly (A) + mRNA

10X PCR buffer

25 mM dNTP

0,4µM random Hexamers

28mM $MgCl_2$

40 U/ µl Rnasin

7,5 U/µl AMV Rtase

# 42. NHÂN BẢN VÔ TÍNH cDNA BỞI RT-PCR

## 42.1. Mở đầu

Phương pháp này trước tiên phải ly trích RNA, nhân bản vô tính và khuyếch mRNA của vi khuẩn, nghiên cứu Northen blot, in-situ hybridization và báo quản nucleas

Phương pháp RT-PCR (reverse transcription): được áp dụng để nghiên cứu mRI của một tế bào đơn. Trong phương pháp này chúng ta tập trung vào RT-PCR và kỹ th cloning sản phẩm PCR.

Trước hết, chúng ta phải có số liệu về mã di truyền của mRNA mục tiêu, từ đó thuật cloning mới có thể phát triển được.

## 42.2. Chuyển mã ngược

RT là nội dung nghiên cứu đầu tiên của thí nghiệm. Thành công giai đoạn này t thuộc vào chất lượng RNA và tính chất các enzyme sử dụng cho RT.

1. Ly trích RNA (RNA thường có trong tế bào sinh vật sống) Nhiều tác giả dùng RN tổng để áp dụng RT. Tuy nhiên, phân tử mRNA chỉ chiếm 1-5% tổng số RN chiến lược sử dụng một cách ngẫu nhiên phải tránh các phân tử tRNA, rRNA
2. Kiểm tra chất lượng RNAs
3. Tổng hợp cDNA
4. Tổng hợp ss-cDNA
5. PCR trên ss-cDNA

Chú ý chiến lược thành công của RT bao gồm

(a) RT-PCR của chuỗi mã di truyền được biết (mRNA). PCR thực hiện primer (A 1, 2) với đoạn primer để khuếch đại mRNA. A 1 định vị phần 5', A 2 định vị phần 3'.

(b) RT - PCR chưa biết mã di truyền đoạn 3'

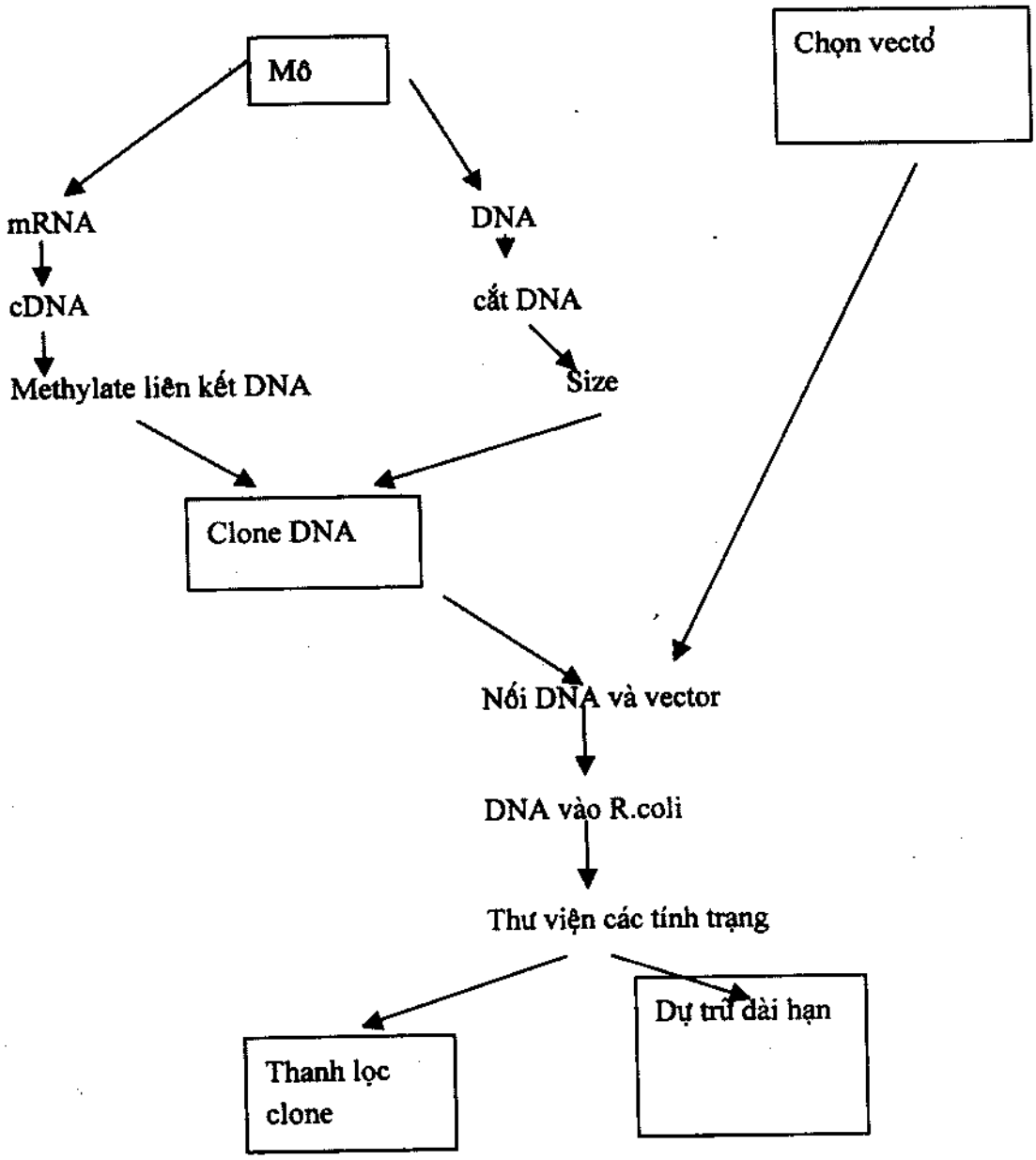
(c) RT- PCR chưa biết mã di truyền đoạn 5'. Chiến lược của Bva2 C phối hợp khuyếch đại mRNA dẫn đến tạo thư viện cDNA.

Mỗi lần khuếch đại cDNA chúng ta cần phải nhân bản vô tính.

## 42.3. Các phương pháp thực hiện các giai đoạn trên

### *42.3.1. Tổng hợp ss-cDNA( Single - stranded cDNA)*

1. Hòa tan RNA trong 18µl nước
2. Làm nóng mẫu nhiệt độ 90°C trong 5 phút
3. Ly tâm, đặt mẫu ngay vào đá




*Hình 41.1. Các giai đoạn thiết lập cDNA hay genomic DNA thư viện*

4. Để 3pmol primer thêm 10x RT buffer

5. Trộn các thành phần sau trong tube

| | |
|---|---|
| 10x RT buffer | 2,5µl |
| 5µg/µl BSA | 1µl |
| 5U/µ RNAsin | 1µl |
| 350mM mercaptoethanol | 2µl |
| 100mMdATP | 0,5µl |
| 100mMd TTP | 0,5µl |
| 1mMdCTP | 2,5µl |
| 100mM dGTP | 0,5µl |
| 200mM Sodium pyrophosphate | 1µl |

Thêm vào 2µl (v 32 P) dCTP (400ci/mmol) và 1 µl AMV. Trộn với RNA đun chảy, ú 45 phút trong nhiệt độ 42°C

6. Tạo chất ss-cDNA, thêm 1mM dCTP với nồng độ (0,5µl 100 mM dCTP)

7. Ú mẫu với nhiệt độ 42°C trong 30 phút.

### *42.3.2. Tổng hợp ss-cDNA không qua đồng vị phóng xạ*

1. Hòa tan RNA trong 18µl nước

2. Làm nóng mẫu nhiệt độ 90°C trong 5 phút

3. Ly tâm, đặt mẫu ngay vào đá

4. Để 3pmol primer thêm 10x RT buffer

5. Trộn theo phản ứng như sau

| | |
|---|---|
| 10x RT buffer | 2,5µl |
| 5µg/µl BSA | 1µl |
| 5U/µ RNAsin | 1µl |
| 350mM mercaptoethanol | 2µl |
| 100mMdATP | 0,5µl |
| 100mMd TTP | 0,5µl |
| 1mMdCTP | 2,5µl |
| 100mM dGTP | 0,5µl |
| 200mM Sodium pyrophosphate | 1µl |
| Nước cất | 24µl |

6. Trộn RNA nóng chảy / primer trộn vào 1µl AMV, ủ trong nhiệt độ 42°C, thời gian 30 phút

7. Dự trữ -20°C

### *42.3.3. Phương pháp PCR dùng trong ss-cDNA*

1. Trộn mỗi phản ứng như sau :

| | |
|---|---|
| 10x PCR buffer | 5µl |
| 25mM dNTP | 0,5µl |
| Primer 1 (100ng/µl trong nước) | xb µl |
| Primer 2 (100ng/µlnước) | xbµl |
| *Taq* polymerase | 1-2U |
| Nước cất | 45 µl |

2. Chuẩn bị một loạt tube 0,5ml theo sau :

- 5µl nước
- 5µl RT
- 5µl RNA
- 5µl sản phẩm ss-cDNA
- 5µl của dung dịch (100 ng DNA/1µl)

3. Thêm 45 µl chuẩn bị dung dịch bước 1

4. Phủ trên tube 1 giọt dầu

5. Thiết kế chương trình cho máy thermalcycler với chu kỳ sau

| Bước | Chu kỳ | Nhiệt độ (°C) | Thời gian |
|---|---|---|---|
| 1 | | 93 | 3phút |
| 2 | 30-40 | 94 | 30 giây |
| | | 55 | 30 giây |
| | | 72 | 1 phút |

6. Phân tích mẫu trên điện di

### *42.3.4. Xác định hoạt động phóng xạ trong ss-cDNA*

1. Chuẩn bị resin
2. Đặt 1vol, 0,5M Triscryl GF trong 0,1x TE
3. Bỏ resin (thông qua ly tâm 50g / 7 phút)
4. Bỏ supernatant và lập lại giai đoạn 3 và 2 hai lần
5. Để resin trong tube 0,1x TE, lưu trữ - 4°C

### *42.3.5. Sắp xếp cDNA*

1. Đặt trong tube ( 0,5ml) trong 2ml tube với resin
2. Ly tâm trong 2 phút với 700g ,
3. Resin đổ đầy vào tube 0,5 trong 3-5 mm từ miệng
4. Chuyển cột micro tới 1,5ml tube
5. Ly tâm 700g trong 5 phút
6. Đếm phóng xạ trong cột (T) và đánh giá (I)
7. Tính khối ( M ) của ss-c DNA theo công thức
8. M = (I/T) x Tổng số dCTP trong phản ứng) x 4

   Nếu tính toán theo phương pháp A ta có:

   M (ng) = (I/T) x 330 b.

## 42.4. Các hóa chất và phản ứng cho các phương pháp trên

### *42.4.1. Phản ứng cho mục A*

10mg/ml acetylated bovine serum albumin

5unit Rnasin. Rnasine cung cấp nồng độ 40u/µl hoà tan 5U/µl trong RT buffer

350 mM b Mercaptoethanol, nồng độ 14,4 M tạo dung dịch 350mM dung dịch, trộn 50µl với 1950 µl của nước cất .

10x RT buffer : 100mM tris HCl pH = 8,3 ở 42°C, 80 mM KCl, 16mM $MgCl_2$

100mM dung dịch dNTP

1mM dCTP

20mM pyrophosphate

(x 32P) d Ctp, 400 Ci/ mmol

AMV

Primer

### *42.4.2. Phản ứng cho mục C*

*Taq* polymerase

10x PCR buffer

100mM dATP, 100mM dGTP, 100mM dCTP, 100mM dTTP

### *42.4.3. Phản ứng cho mục D*

0,5 M Trisacryl GRF

0,1 xTE (1mM tris - HCl pH 7,6, 0,1mM EDTA pH 8,0)

# 43. CÀI ĐẶT PHÂN TỬ DNA TỪ DNA CỦA BỘ GENOME

## 43.1. Mở đầu

Muốn tiến hành kỹ thuật này trước tiên phải phân cắt DNA một phần và toàn phần. Một kỹ thuật không kém phần quan trọng là dùng dung dịch sucrose, giúp DNA có kích thước từ 5 - 60 kb có thể điện di qua các dung dịch này.

## 43.2. Phương pháp sucrose

***Vật liệu và dung dịch***

DNA được phân cắt bằng enzyme tương ứng

STE buffer

10% và 40% dung dịch sucrose

0,9% gel agarose

TE buffer

Sucrose gradient marker

Beckman SW -28 hoặc SW -41 tương đương

*Phương pháp*

1. Bắt đầu cắt DNA (xem phần cắt DNA)
2. Chuẩn bị 10% tới 40% sucrose trong SW 20 tube hoặc SW 41 tube (12ml gradient)
3. Làm nóng DNA tới 65°C trong 5 phút
4. Cẩn thận khi dung dịch DNA tràn ra
5. Ly tâm 113.000 rpm ở 20°C trong 16-24 giờ, tùy thuộc vào plamid hay cosmid mà thay đổi thời gian
6. Chọn DNA và cho chạy trên gel 0,9% agarose
7. Kết tủa với cồn và chia ra 4 tube chứa 180µl sucrose/ DNA, thêm 320 µl nước và 1ml cồn cho mỗi tube, ủ trong nhiệt độ - 20°C trong một đêm
8. Phối hợp các DNA kết tủa trong 100ml TE / sucrose
9. Lưu trữ dài hạn

# 44. PHƯƠNG PHÁP LÀM TINH KHIẾT SẢN PHẨM PCR THÔNG QUA DỊCH MÃ IN-VITRO

## 44.1. Mở đầu

Người ta thường dễ bị sai sót khi dùng hệ thống dịch mã in-vitro. Khi dùng phương pháp này, yêu cầu sử dụng primer có mã di truyền đầy đủ cho phiên dịch và sao chép. Thêm vào đó, quá trình khuếch đại sản phẩm đòi hỏi primer được dùng phải chứa cá dấu hiệu dịch và sao chép.

Tín hiệu phiên dịch trên tế bào prokaryotic và eukaryotic thể hiện khác nhau. Trong phiên dịch prokaryotic, tín hiệu đầu tiên của Shine- Dalgarno sequence (AGGA), ước khoảng 9bp, khởi đầu là (ATG) của gen.

Trong Eukaryotic, tín hiệu phiên dịch đầu tiên thể hiện chuỗi ký tự không có trong chức năng phiên dịch là 5′ - GCC (A/G) CC - 3′.

Dấu hiệu cuối của phiên dịch đoạn sao chép của gốc 3′ có chứa codon (TAA, TAG hoặc TGA), đây là yêu cầu phiên dịch có hiệu quả. Sản phẩm PCR dùng trong phiên dịch thường yêu cầu tinh khiết.

Sau đây là cách chuẩn bị làm tinh khiết sản phẩm PCR cho phiên dịch:

Có rất nhiều loài cần sản phẩm phiên dịch. Phần chủ yếu là DNA không có thể nhân bản vô tính. Điều này cần nâng cao gen từ thư viện cDNA. Khuếch đại sản phẩm có thể quyết định nhanh chiều dài của protein được sản xuất ra. Từ sản phẩm protein, template phiên dịch được thể hiện với sản phẩm PCR. Tuy nhiên, điều này còn phụ thuộc nhiều vào yếu tố tinh khiết của hóa chất, thao tác kỹ thuật trong quá trình thực hiện. Các enzyme phân cắt protein thường rất phức tạp. Tuy nhiên, nếu kết hợp nhiều yếu tố trên như (hóa chất, kỹ năng trong thí nghiệm...) được thực hiệp tốt cho phép phiên dịch in-vitro khả năng cung cấp thông tin nhanh trong trường hợp đột biến để chứng minh hiệu quả quan trọng của protein.

## 44.2. Phương pháp

### *44.2.1. Tinh khiết sản phẩm PCR cho phiên dịch*

1. Thêm 7,5M ammonium acetate trong phản ứng PCR
2. Kết tủa DNA bằng thêm 1 vol isopropanol và ủ trong 10 phút nhiệt độ 25°C
3. Pellet của DNA được ly tâm và bỏ supernatant
4. Hòa pellet trong 100µl của 0,3M Sodium acetate và thêm 2,5 vol cồn. Ủ trong nhiệt độ -20°C trong phút

5. Pellet của DNA được ly tâm 10 phút với vận tốc 13,000rpm. Sau khi ly tâm bỏ supernatant và ngâm trong cồn 70%
6. Phơi khô pellet và ly tâm trong 10 phút pha 10-100 µl TE
7. Đo nồng độ DNA

### *42.2.2. Phản ứng E.Coli S 30 cho phiên dịch/sao chép*

1. Chuẩn bị phản ứng 0,5 tube đặt trong đá, thêm các thành phần sau:

   20µl premix

   1-14µl sản phẩm PCR

   1µl amino acid được đánh dấu đồng vị phóng xạ

   1µl phage RNA

   Nước cho đủ 35µl
2. Thêm vào 15µl S30 trộn trong tube
3. Ly tâm trong 10 giây
4. Ủ trong nhiệt độ 37°C trong 60 phút. Mẫu để trong đá cho tới khi dùng cho tổng hợp sản phẩm

### *42.2.3. Chuẩn bị RNA cho sao chép*

1. Phản ứng chứa thành phần sau:

   20µl của 5x dung dịch sao chép

   12µl rNTP

   63µl chứa 3-4 µg sản phẩm PCR (xem lai A)

   5µl chứa 75 unit Rnasin ribonuclease, 0,5 yeast, 175 unit RNA polymerase
2. Trộn và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2- 6 giờ
3. RNA sao chép theo phản ứng sau 1-10µl của 1:10 của phenol và ethanol)

### *42.2.3. Trường hợp lúa mì*

1. Làm nóng RNA trong 67°C, 10 phút và để vào đá ngay tức khắc
2. Phản ứng sau

   25µl nhân lúa mì được ly trích

   1µl (40 U) Rnasin rionuclease

   4µl phản ứng 1M amino acid

   2.5µl radiolabelled amino acid

2µl RNA ( 0,2-1. µg) temlate

0-7 µl 1 M potassium acetate

nuclease tự do được đưa vào thể tích 50 µl

3. Ủ phản ứng phiên dịch 25°C trong 60 phút. Sản phẩm được đặt vào đá

***42.2.4. Sửa soạn phản ứng phân tích SDS- PAGE***

1. Đặt 5µl phản ứng phiên dịch, thêm 20µl acetone và trộn, đặt vào đá
2. Pellet protein bởi ly tâm trong 10 phút
3. Bỏ supernatant và phơi pellet
4. Hòa tan pellet trong 20µl của SDS và đun nóng 100°C trong 2 phút
5. Load mẫu vào gel polyarcrylmide
6. Sau khi chạy điện di bởi SDS-PAGE, cố định acrylamide gel trong 20% methanol, 10% acetic acid trong 30 phút
7. Sau khi cố định, ngâm gel trong isotopic trong 30 phút, rửa gel
8. Phơi khô gel và chụp ảnh

***42.2.5. Phương pháp Immunoprecipitation của sản phẩm phiên dịch***

1. Bỏ 10 µl phản ứng phiên dịch chứa radiolabelled protein, thêm 40µl acetone để kết tủa protein
2. Pellet kết tủa protein dùng để xác định immunoprecipitation
3. Bỏ 10µl thành phần của phản ứng phiên dịch, thêm 40µl dung dịch cột (nối)
4. Thêm 1-10µl của polyclonal antisera của thỏ và ủ trong phòng 1 giờ
5. Pellet, tế bào *S. aureus* ly tâm trong 2 phút với vận tốc 13.000rpm
6. Sau khi antibody được nối, thêm vào 10µl tế bào *S. aureus*, để 50µl phản ứng antibody, ủ trong 4°C trong 30 phút
7. Ly trích immunoprecipitates bởi ly tâm pellet hai lần với 400µl dung dịch nối. Phân tích immunoprecipates bởi SDS -PAGE và chụp ảnh

**44.3. Các phản ứng và hóa chất cần thiết**

***44.3.1. Phản ứng cho phương pháp A***

7,5 M ammonium acetate

isopropanol

0,3M sodium acetate

Anhydrous ethanol

TE buffer : 10mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA

70% cồn

### *44.3.2. Phản ứng cho phương pháp B*

Trộn 87,5mM Tris acetate pH 8, 476 mM potassium glutamate, 75mM aminonium acetate, 5mMDTT, 20 mM magnesium acetate, 1,25mM mỗi amino acid, 5 mM ATP, 1,25 mM mỗi CTP, TTP, GTP, 50mM phosphoenolpruvate 9 trisodium salt 0 2,5 mg / ml E. coli tRNA, 87,5 mg/ml polyethylene glycerol

50µg folinic acid, 2,5 mMc AMP

Radiolabelled amino acid (35S) methionine ở 10 mCi/ml

T 7, SP 6, hoặc T3 RNA polymerase, khoảng 20-40µl

S30 extract

DNA template

### *44.3.3. Phản ứng cho phương pháp C*

5x buffer phiên dịch : 400mM hepes KOH, pH7,5, 10 mM spermidine, 200mM DTT, và 60 mM $MgCl_2$, 80 mM $MgCl_2$

rNTP : 25mM mỗi rATP, rCTP, rGTP, rTTP

Rnasin, ribonuclease 9 20-40 unit/µl

Yeast inorgnanic pyrophosphate

T 7, SP 6, T3 RNA polymerase

DNA template

### *44.3.4. Phản ứng cho phương pháp D*

Ly trích lúa mì

RN asin ribonuclease (20-10unit/ µl)

Amino acid dung dịch chứa 1mM mỗi amino acid

Amino acid được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ

1M potassium acetae

mRNA template

### *44.3.5. Phản ứng cho phương pháp E*

Acetone

4x SDS (50mM tris HCl pH 6,8, 100mM DTT, 2% SDS, 10% glycerol, 0,1% bromophenol blue)

Gel (20% methanol, 10% acid acetid)

Isotopic enhacing fluor

### *44.3.6. Các phản ứng cho phương pháp F*

Acetone

Biding buffer (20mM tris-HCl, pH 7,9 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT)

Polyclonal antisera

Formalinized *Staphylococcus aureus*

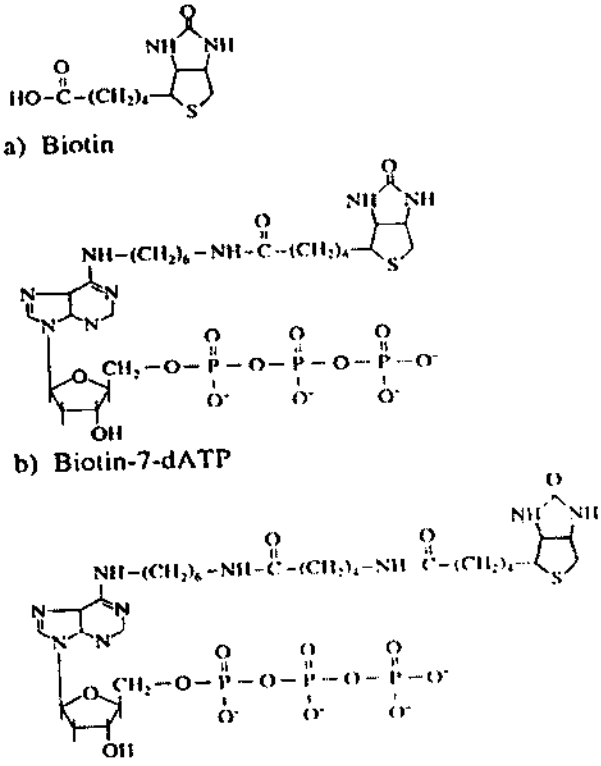
# 45. PHƯƠNG PHÁP LAI PHÂN TỬ PROBE CÓ ĐÁNH DẤU BIOTIN, KHÔNG DÙNG PHÓNG XẠ

## 45.1. Mở đầu

Tương tác giữa biotin và avidin được biết nhiều. Ávidin, một hệ thống glycoprotein, với kích thước căn bản 68.000 Da ly trích từ trứng, mạnh nhất là nối các biotin, vitamine với aK d của 10 - 15 /M. Mỗi phân tử avidin được gắn chặt với bốn phân tử biotin. Sự gắn Avidin - biotin có phản ứng rất mạnh. Cần lưu ý tránh dùng hệ thống biotin - streptavidin. Streptavidin là một protein của *Streptomyces avidinii*. Streptavidin có trọng lượng phân tử là 60.000 và bốn biotin. Streptavidin giống như avidin gắn chặt với biotin, nhưng thường xảy ra sự cố bất lợi nhiều hơn avidin.

Biotin chứa phân tử nucleotid, quan hệ trong việc phiên dịch hoặc đánh dấu primer một cách ngẫu nhiên. Sau khi lai biotin DNA được đánh dấu, phân tử này sẽ tách nối cột của streptavidin, mà nối này vốn là alkaline phosphate. Khả năng tách trong thực khuẩn thể thông qua Southern blot, với biotinylated probe là hiện thực.

Cấu trúc hóa học của biotin và hai biotin nucleotide (hình 45.1)




*Hình 45.1: Cấu trúc hóa học của biotin và hai biotin nucleotide*

## 45.2. Phương pháp

### *45.2.1. Chạy điện di*

1. Chuẩn bị agarose gel 0,8-1,% pha trong 0,5 X TBE buffer (thể tích tùy vào kích thước của gel)
2. Nấu cho gel cháy hoàn toàn, chú ý đừng để lợn cợn, phải nhìn gel thật trong, làm nguội với nhiệt độ 50°C trước khi cho gel vào khay. Chú ý tránh bọt khí, chuẩn bị lượt trước khi đổ gel vào khay.
3. Lấy một tấm parafilm và đặt 6x loading buffer trên tấm parafilm. Thêm vào mẫu DNA (5µl). Chú ý phải sắp xếp thứ tự để tránh nhầm lẫn DNA
4. Tách DNA trên điện di, cho chạy 10 giờ qua đêm với 20V
5. Sau khi điện di xong, mẫu được nhuộm với Et-Br và chụp hình UV

### *45.2.2. Gel cho Southern blot*

Trong thời gian di chuyển gel dễ gãy, cẩn thận

1. Đặt gel trên một hộp và rửa với nước cất trong 10-15 phút, di chuyển nước ra khỏi gel;
2. Để 0,25M HCl và lắc trong 10-15 phút (chú ý màu của gel). Rửa với nước cất
3. Đặt gel rửa trong buffer (0,4M NaOH), và lắc nhẹ cho tới khi đổi màu xanh lá cây sang xanh đậm.

### *45.2.3. Xếp gel*

1. Dung dịch (0,4M NaOH, alkali buffer) được đựng trong khay. Chuẩn bị hai tấm giấy Whatman 3MM
2. Để gel tránh bọt khí, chung quanh bao bọc giấy parafilm để bảo vệ dung dịch chảy quanh gel
3. Cắt từng tấm giấy Hybon N + với kích thước bằng kích thước gel và ghi nhãn cẩn thận. Để trên mặt gel. Nếu bọt khí xuất kiện, dùng pipetman lấy nhẹ bọt khí ra
4. Cắt giấy 3MM theo kích thước gel
5. Giấy nháp thấm nước được đậy trên gel, số lượng nhiều khoảng một gram giấy
6. Đặt một quả cân hoặc thủy tinh nặng 1 kg, qua đêm
7. Lấy gel ra, lấy giấy Whatman filter
8. Rửa filter trong dung dịch 2XSSC trong 10 phút, đặt filter trong hộp, chuẩn bị cho lai
9. Chú ý trong trường hợp chưa lai thì phải cố định trong tủ 80°C trong 2 giờ
10. Bọc ny lon tấm filter và để trong tủ 4°C

### *45.2.4. Chuẩn bị bước lai đầu tiên (prehybridization)*

1. Dung dịch

| Thành phần | Nồng độ | |
|---|---|---|
| 50% formamide | Formaide | 5ml |
| 5X SSc | 20xSSC | 2.5ml |
| 5X PM sodium phosphate pH 6,5 | 100x PM | 0.5ml |
| 0.2mg/ml sheared caft thymus DNA | 2mg/ml DNA | 0.1ml |
| 25.mM sodium phosphate | 1M | 0.25 |
| Nước | | 10ml |

2. Đặt màng lọc trong hộp nhỏ đủ để màng lọc nằm trong khay. Thêm 20-100µl dung dịch pre-hybridization /$cm^2$ trên bề mặt tấm lọc. Ủ trong 24 giờ, nhiệt độ 42°C

3. Chuẩn bị 10ml dung dịch lai

### *45.2.5. Lai*

1. Dung dịch

| Thành phần | Nồng độ | |
|---|---|---|
| 45% formamide | Formaide | 4.5ml |
| 5X SSc | 20xSSC | 2.5ml |
| 1X PM sodium phosphate pH 6,5 | 100x PM | 0.1ml |
| 0.2mg/ml sheared caft thymus DNA | 2mg/ml DNA | 0.1ml |
| 20mM sodium phosphate | 1M | 0.2 |
| Nước | | 10ml |

4. Ngay khi sử dụng, làm nóng biotin - labeled DNA như một phân tử probe. Số lượng probe có nồng độ 0,1- 0,5µg/ml. Đặt tube có DNA probe trong cốc đun sôi, 10 phút Sau khi đun bỏ vào đá ngay tức khắc. Yêu cầu probe phải là sợi DNA đơn

5. Đặt màng lọc trong dung dịch lai 42°C trong 14-16 giờ

6. Chuẩn bị dung dịch rửa.

   Mỗi giai đoạn đặt dung dịch trong khay plastic và rửa

7. Rửa màng lọc sau khi lai để loại bỏ probe không lai

8. Rửa màng lọc trong 250 ml 2x SSC 0,1% SDS trong 3 phút, nhiệt độ trong phòng

9. Rửa lại với 250ml 2 x SSC 0,1 % SDS 3 phút, để nhiệt-độ trong phòng

10. Rửa màng lọc trong 250 ml của 0,25 x SSC, 0,1 %SDS trong 15 phút ở 50°C

11. Rửa lại màng lọc trong 250 ml của 0,16 x SSC , 0,1 %SDS trong 15 phút ở 50°C

12. Ngâm màng lọc trong đá có chứa 2x SSC trong vòng 1 phút

13. Phơi khô

***45.2.6. Tách Biotin label probe I cho phản ứng Chromogenic***

Gắn Streptavidin và biotin label

Akaline phosphate thêm vào, tách biotin label probe

Blocking membrane (khóa màng lọc)

1. Chuẩn bị và filter buffer

2. Buffer 1 : 0,1 M Tris -HCl, 0,15M NaCl, pH = 7,5

Buffer 2: 3% BSA trong buffer 1, dùng 3g BSA / 100ml buffer 1. Chuẩn bị BSA chứa alkaline phosphatase và kiểm tra cẩn thận

Buffer 3 : 0,1 M tris, 0,1M NaCl, 50 mM $MgCl_2$. pH 9,5

Làm các giai đoạn trên trong phòng lai. Ngâm 1 phút trong hộp. Khi buffer 1 phủ toàn bộ tấm membrane, ngâm 5 phút, phơi khô

3. Dùng kẹp lấy membrane chứa buffer 1 vào hộp và chứa buffer 2, ủ trong 1 giờ trong 65phút

4. Bỏ membrane từ buffer 2, tiếp tục phơi khô nhiệt độ 80°C trong 20 phút.

   Áp dụng hệ thống tá người

5. Nếu membrane khô, nhúng 10 phút buffer 2. Ủ trong 1 giờ trong 65°C

6. Tức khắc dùng 7µl streptavidin -alkaline phosphatase trong 7ml buffer 1. Đặt SA-AP trong hộp plastic

7. Ủ membrane trong SA-AP trong 10 phút

8. Dùng kẹp lấy membrane bỏ vào dung dịch buffer 1, lắc nhẹ trong 15 phút

9. Bỏ buffer 1, thêm 250 ml buffer 3. Ủ trong 10 phút nhiệt độ trong phòng

10. Thêm 33µl nitroblue tetrazolium (NBT) dung dịch 7,5ml buffer 3 trộn nhiều lần. Thêm 25µl của 5 bromo 4 chloro-3 indolyphosphate (BCIP), trộn nhẹ. Để chất nhuộm đủ thấm membrane. Thêm dung dịch NBT trong 75mg/ ml NBT trong 70% dimethylformamide. Dung dịch BCIP là 50mg/ml BCIP trong dimethylformanie

11. Để membrane trong dung dịch nhuộm, ủ trong nhiệt độ tối, phát triển màu và trong thời gian là 30 phút đến 3 giờ. Ủ thời gian 3 giờ. DNA chỉ xuất hiện một mặt tấm membrane

12. Khi băng xuất hiện, và phát triển màu, rửa 20mM Tris và 0,5 mM $Na_2$ EDTA, pH 7,5

13. Phơi khô membrane trong không khí, để xác minh băng, thêm 20mM Tris và 0,5mm $Na_2$ , EDTA, pH 7,5. Sau khi quan sát băng, phơi khô. Lưu trữ membrane tránh ánh sáng.

**45.3. Dụng cụ và hóa chất cần thiết**

- NaOH
- SSC buffer : (175,3g NaCl, 88,2g sodium citrate, 800ml nước pH = 7) trong 1 lít
- TBE buffer (54g trizma base, 27,5 borid acid, 20ml 0,5 M EDTA pH = 8, trong 1 lít )
- Quả cân
- Giấy
- Whatman
- Khay đựng
- Điện di

# 46. KỸ THUẬT CHUYỂN VI KHUẨN THÔNG QUA ĐIỆN DI

## 46.1. Mở đầu

Phương pháp này phục vụ cho thiết lập ngân hàng cDNA với các vectơ plasmid, cosmid, YAC hay BAC.

## 46.2. Dụng cụ

*Ecoli* DH 10B

0,1cm Cuvettes (kính lọc sóng khúc xạ)

2% X gal

LMP agarose

LB chứa 12,5µl/ml choramphenicol (2% bacto tryptone 0,5% bacto yeast extracts, 10mM NaCl)

SOC : 2% bacto tryptone, 0,5% bacto yeast extracts, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$, 20mM glucose.

Dung dịch lạnh : LB, 6mM $K_2HPO_4$, 13,2 mM $KH_2PO_4$, 1,7mM citrate, 0,4 mM $MgSO_4$, 6,8mM $(NH_4)_2SO_4$, 4,4% glycerol, 12,5µg/ ml chloramphenicol

## 46.3. Phương pháp

1. Lấy nhẹ nhàng tế bào dưa vào đá
2. 1,5 ml polypropylene tube, trộn 40µl tế bào ở thể treo với 1µl dung dịch nối, trộn đều trong 1 phút
3. Cho chạy điện di 1.25KV, 800 V, nếu dùng 1cm cuvettes
4. Chuyển tế bào vào điện lạnh. Lắc nhẹ tránh bọt khí.
5. Thêm 1ml SOC vào cuvette
6. Chuyển tế bào vào 5ml polypropylene tube, ủ 37°C trong 45 phút, lắc 225rpm.
7. Thêm 10µl IPTG, 40µl X gal thêm 500ul của tế bào chuyển tới LB, chứa 12,5µg/ml chloramphenicol thêm tế bào trên mặt đĩa petri
8. Nhặt các colonies từ đĩa, và chuyển đến microtiter có chứa 60µl dung dịch lạnh. Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 38- 48 giờ, trữ mẫu trong - 80°C

# 47. CHUẨN BỊ VECTƠ DÙNG TRONG PHẢN ỨNG PHẢN PHOSPHORYL HÓA

## 47.1. Mở đầu

Trong thiết lập ngân hàng gen cDNA, chúng ta thường sử dụng nhiều phương pháp để cắt và nối các DNA vectơ. Tuy nhiên để tiện sử dụng, chúng tôi xin khuyến cáo phương pháp đơn giản sau đây :

## 47.2. Vật liệu

*Hind* III cắt DNA ( hình 47.1)

50mM $CaCl_2$

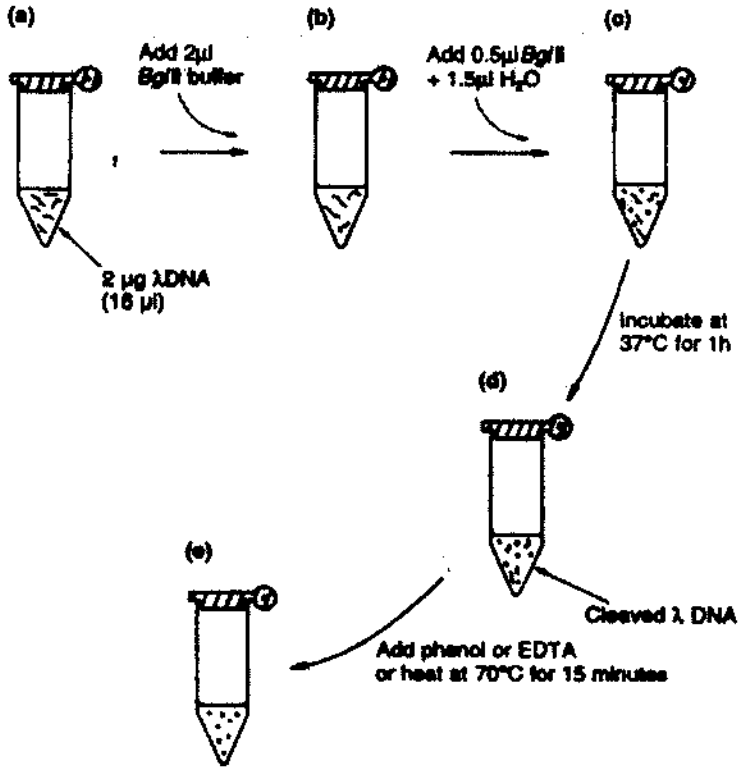
Agarose

HK phosphatase

T 4 ligase

HMW phân cắt DNA một phần

Cắt DNA




*Hình 47.1: Phân cắt λ DNA (Lambda DNA là thực khuẩn thể)*

3. **Các phương pháp tiến hành.** Làm tinh khiết vectơ DNA và phân cắt với 10 lần số ng *Hind* III hoặc phản ứng phân cắt.

Thêm vào các thành phần sau:

| | |
|---|---|
| Làm tinh DNA | 250µl |
| Nước cất | 15µl |
| 10x TE buffer | 25µl |
| *Hind* III | 10µl |
| Tổng số | 300µl |

Ú 37°C trong 2 giờ. Sau 45 phút phân cắt, tạo 1µl phản ứng để cắt và chạy bằng minigel

. Thêm vào 250µl chloroform : isoamyl alcohol (24:1) Lắc tube 2 phút.

. Ly tâm 10.000 rpm, trong 5 phút.

. Supernatant được loại bỏ vào tube mới. Rửa copellet ở cồn 70%, ba lần. Phơi khô DNA trong 45 phút

6. DNA được đưa vào 22µl TE buffer. Thêm 1/10 thể tích 3M Sodium acetate thêm 2 lần thể tích cồn lạnh. Ú ở - 20°C trong 2 giờ, kết túa và cắt vectơ DNA. Làm ấm dung dịch nhiệt độ 30°C trong 10 phút. 5µl của HK phosphatase thêm vào phản ứng.

7. Ú trong nhiệt độ 30°C trong 1 giờ. Chuyển vào tube 65°C trong 15 phút trong phosphatase

8. Thêm số lượng tương đương chroroform: isosamyl alcohol (24:1) đảo tube vài lần

9. Ly tâm tube và bỏ supernatant vào tube mới. Thêm 2x cồn. Ú trong nhiệt độ - 20°C trong 3 giờ.

10. Ly tâm trở lại. Pellet của DNA được hòa tan trong TE buffer. Cuối cùng nồng độ vectơ DNA là 10ng/µl. 20µl được dự trữ - 80°C

11. Kiểm tra vectơ bởi sự nối và chuyển, ba phản ứng nối được thiết lập để xét nghiệm vectơ DNA được phản phosphoryl hóa

| **Thành phần** | **Không có phản phosphoryl hóa** | **Phản phosphoryl hóa** | **Phản phosphoryl hóa + chèn** |
|---|---|---|---|
| Vectơ DNA | 1µl | 1µl | 1µl |
| Insert DNA | 0µl | 0µl | (X DNA / *Hind* III) 1µl |
| 10x ligation buffer | 1µl | 1µl | 1µl |

| | | | |
|---|---|---|---|
| T 4 Ligase | 0,5 µl | 0,5µl | 0,5µl |
| Nước cất | 7,5µl | 7,5µl | 6,5µl |
| Tổng số | 10µl | 10µl | 10µl |

Ú trong 16°C trong 10 giờ. Bỏ 8 µl chạy 15 agarosé gel và 2µl cho chuyển gen.

Kết quả tốt nhất thực hiện.

Kết quả tốt nhất thực hiện với nhiều mẫu chuyển tự nối và không có phản phosphoryl hóa trong phản ứng A, khoảng 4- 5% chuyển trong phản ứng B và 80-90% chuyển với màu trắng và kém 20% chuyển màu xanh đậm với phản ứng C.

12. Phản ứng nối vectơ với trong lượng phân tử cao của DNA (HMW) : Cần các thành phần sau:

Vectơ DNA 1-2 µl (10-20 ng vectơ DNA)

Phân cắt một phần HMW DNA xµl (150- 200ng HMW DNA)

Trộn cho tốt, ú trong nhiệt độ 56°C trong 15 phút. Làm mát trong nhiệt trong phòng, thêm các thành phần như sau :

| | |
|---|---|
| 10x buffer nối | 10µl |
| T 4 Ligase | 2µl(2µ) |
| Nước | X µl |
| Thể tích | 100µl |

Nối ở nhiệt độ 16°C trong 18 giờ. Khi chấm dứt nối, trộn TE buffer ở nhiệt độ 4°C trong 48 giờ và thay đổi buffer vài lần cho tới khi thể tích gia tăng 1/3.

Để cho có kết quả tốt hơn, vectơ và HMW DNA có thể theo tỉ lệ 1: 5

Thí dụ :

| Kích thước | (bp) | 50kb | 100kb | 200kb | 300kb | 400kb | 500kb | 600kb |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vectơ | (ng) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| HMW | (ng) | 6,7 | 13,5 | 27,0 | 40,5 | 54,0 | 67,5 | 81,0 |

**47.4. Chuẩn bị tế bào competent**

Các dụng cụ và phản ứng cần thiết

*E. Coli* DH 10B

10% glycerol

Nitơ lỏng

Môi trường LB

Máy ly tâm

Phương pháp

1. Ủ thể tích 1/100 dung dịch LB cấy qua đêm
2. Trồng tế bào ở nhiệt độ 37°C với máy lắc ABS 600 ước 0,9 (kết quả thực hiện tế bào mini log phase)
3. Thu hoạch tế bào, ly tâm lạnh trong 15 phút với vận tốc 400rpm
4. Di chuyển chất supernatant
5. Pellet được đặt trong 10% glycerol. Ly tâm như giai đoạn 3
6. Pellet trong 0,5 lít, 10% glycerol. Ly tâm như giai đoạn 3
7. Pellet trong 0,25lít 10% glycerol
8. Cuối cùng thể tích 1,5 ml trong 10% glycerol. Nồng độ tế bào 1-3 x $10^{10}$ tế bào/ml
9. Tế bào hoạt động tốt trong 6 tháng.

# 48. CHUẨN BỊ VẬT LIỆU BAN ĐẦU CHO CÂY CHUYỂN GEN

## 48.1. Mở đầu

Kỹ thuật thông thường là chuẩn bị phôi non hoặc phôi trưởng thành để chuẩn bị chuyển nạp gen vào. Thường vi khuẩn và nấm dễ phát sinh trong môi trường này, do đó dễ dàng tạp khi phôi phát triển. Do đó môi trường luôn luôn phải được thanh trùng ở nhiệt độ 160-180°C trong 2 - 4 giờ

## 48.2. Nuôi cấy tế bào soma (Trường hợp cây lúa)

1. Bóc vỏ hạt gạo và rửa trong cồn 70% trong 1 phút và rửa trong 45% chlorox (5 - 25% Na hypochlorite với 1 - 2 giọt Tween) trong 20 - 30 phút
2. Rửa hạt với nước cất 5 lần
3. Ủ hạt trong môi trường (MS) Murashige and Skoog với 2mg 2,4D /l
4. Để môi trường trong tối
5. Sau 3-4 tuần, tách mô sẹo từ phôi và ủ trong môi trường MS cho chúng phát triển
6. Ủ trong tối 27°C
7. Cấy mô sẹo sau 3 - 4 tuần

## 48.3. Tạo mô sẹo thông qua phôi mầm

Phương pháp :

1. Chọn bông sau khi trỗ 7 - 10 ngày
2. Chọn hạt đang ngậm sữa và rửa trong cồn 70% với thời gian 90 giây.
3. Rửa hai lần trong 1 - 2 giọt Tween trong 20 - 50 phút. Rửa tiếp tục trong nước cất hai lần
4. Tách phôi cẩn thận
5. Nuôi cấy phôi trong môi trường MS và giữ trong tối 27°C
6. 3 - 4 tuần, tách mô sẹo ra môi trường mới
7. 4 tuần, chọn phôi từ mô sẹo (embryogenic calli)

**48.4. Môi trường và hóa chất cần thiết**

*Bảng 1:* **Môi trường**

| TT | Thành phần | MS (mg/l) | N6 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| 1 | Muối khoáng | | |
| 2 | Amonium nitrat | | |
| 3 | Amonium sulfat | | |
| 4 | Boric acid | | |
| 5 | Calcium chloride | | |
| 6 | Cobalt chloride $6H_2O$ | 0,025 | |
| 7 | Cupic sulfat. $5H_2O$ | 0,025 | |
| 8 | Ethylene diamine tetraacetit acid, $2NaH_2O$ | 37,26 | 37,26 |
| 9 | Ferrous sulfate. $7H_2O$ | 27,8 | 27,8 |
| 10 | Magiesium sulfat | 180,7 | 90,35 |
| 11 | Manganese sulfat | 16,9 | 3,33 |
| 12 | Molybdic acid ($Na_2$ $H_2O$) | 0,25 | |
| 13 | Potasium iodide | 0,83 | 0,8 |
| 14 | Monobase potasium phosphate | | 400,0 |
| 15 | Potasium nitrat | 1900,0 | 2830,0 |
| 16 | Zinc sulfate.$7H_2O$ | 8,6 | 1,5 |
| 17 | Các chất hữu cơ và vitamine | | |
| 18 | Glycine | 2,0 | 2,0 |
| 19 | Thiamine HCl | 0,4 | 1,0 |
| 20 | Myo Inositol | 100,0 | 100,0 |
| 21 | Pyridocine HCl | 0,5 | 0,5 |
| 22 | Nicotinic acide | 0,5 | 0,5 |
| | Các chất kích thích sinh trưởng | | |
| 23 | 2,4 D | 0,5 | 0,5 |
| 24 | Napthalene acetic acid | 1,0 | 1,0 |
| 25 | Belzyl amino purin | 0,5 | 0,5 |
| 26 | Glucose | 60 | 60 |
| 27 | Agar | 8,0 | 8,0 |
| 28 | pH | 5,8 | 5,8 |

# 49. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TÚI PHẤN

## 49.1. Mở đầu

Công nghệ nuôi cấy mô ra đời mở ra một bước mới về cải tiến giống cây trồng và nhân giống vô tính. Nó còn là phương tiện giúp cho các nhà chọn giống rút ngắn giai đoạn chọn lọc. Cấy mô sáng tạo ra những biến dị di truyền thông qua kỹ thuật nuôi cấy in vitro, thể hiện sự biến dị tế bào sô ma. Trong phần này chúng tôi muốn đề cập đến kỹ thuật nuôi cấy túi phấn, tạo dòng đơn bội kép, nhằm rút ngắn quá trình đồng hợp tử của cặp alen mục tiêu.

## 49.2. Phương pháp

Phương pháp được giới thiệu đã có kết quả thành công trên cây lúa.

Hạt lai F1 được gieo làm hai đợt cách nhau 1 tháng trồng trong nhà lưới.

Bông lúa non được thu khi khoảng cách từ gốc lá đòng đến gốc lá thứ nhất từ 5 - 10cm và xử lý lạnh 100°C trong 10 ngày. Hạt phấn lúc này ở giai đoạn cuối đơn phân và thích hợp cho nuôi cấy (hình 49.1)

Túi phấn được tách ra khỏi vỏ trấu, xử lý cồn 70 độ trong 1 phút và 0,1% $HgCl_2$ trong 15 phút và rửa sạch nhiều lần bằng nước cất tiệt trùng (hình 49.2). Túi phấn của các cây trồng trong đợt đầu sau đó được nuôi trong môi trường N6 có bổ sung kích thích sinh trưởng theo 2 nghiệm thức (hình 49.3)

1. 0,5mg/ 12,4 D + 1,0 mg/L NAA + 0,5mg/L BAP (nền N6)
2. 0,5 mg/ 1 2,4 D + 1,0 mg/L NAA + 0,5mg/L BAP (nền MS)

Thí nghiệm bố trí ba lần lập lại, mỗi bình cấy 20 hạt lúa = 120 túi phấn

Vật liệu để trong tối 25°C

Mô sẹo hình thành đường kính 2 - 3mm được tái sinh trong môi trường MS có bổ sung (1mg/ l BAP, 1mg/l NAA) ở 25°C và 12 giờ chiếu sáng. (hình 49.4)

Cây tái sinh được nhân vô tính trên môi trường MS có bổ sung 2mg/l BAP

Một nửa số cây trong cùng dòng được cấy trên môi trường MS không chất kích thích sinh trưởng (hình 49.5)

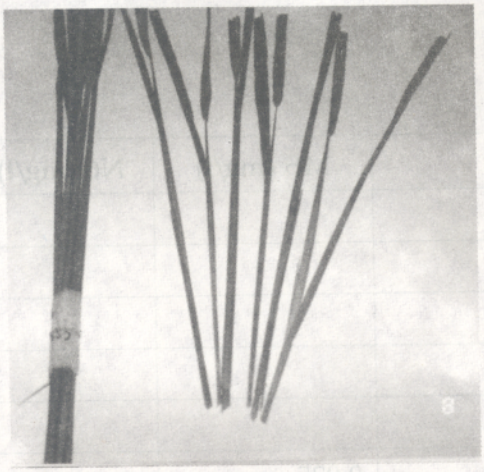
Cây có bộ rễ phát triển được trồng trong môi trường dinh dưỡng Yoshida (hình 49.6)

Các dòng cho hạt lép được giữ trong phòng được xử lý colchicine ở nồng độ 0,05% trong 10 giờ hoặc trong tối 5 giờ.

**49.3. Môi trường và hóa chất cần thiết**

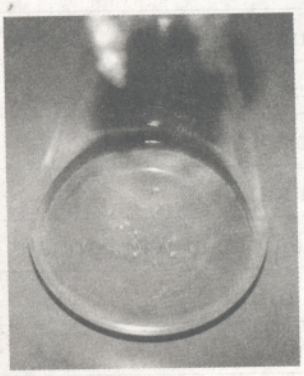
*Bảng 1:* **Môi trường**

| TT | Thành phần | MS (mg/l) | N6 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| 1 | Muối khoáng | | |
| 2 | Amonium nitrat | | |
| 3 | Amonium sulfat | | |
| 4 | Boric acid | | |
| 5 | Calcium chloride | | |
| 6 | Cobalt chloride $6H_2O$ | 0,025 | |
| 7 | Cupic sulfat. $5H_2O$ | 0,025 | |
| 8 | Ethylene diamine tetraacetit acid, $2NaH_2O$ | 37,26 | 37,26 |
| 9 | Ferrous sulfate. $7H_2O$ | 27,8 | 27,8 |
| 10 | Magiesium sulfat | 180,7 | 90,35 |
| 11 | Manganese sulfat | 16,9 | 3,33 |
| 12 | Molybdic acid ($Na_2.H_2O$) | 0,25 | |
| 13 | Potasium iodide | 0,83 | 0,8 |
| 14 | Monobase potasium phosphate | | 400,0 |
| 15 | Potasium nitrat | 1900,0 | 2830,0 |
| 16 | Zinc sulfate.7 $H_2O$ | 8,6 | 1,5 |
| 17 | Các chất hữu cơ và vitamine | | |
| 18 | Glycine | 2,0 | 2,0 |
| 19 | Thiamine HCl | 0,4 | 1,0 |
| 20 | Myo Inositol | 100,0 | 100,0 |
| 21 | Pyridocine HC | 0,5 | 0,5 |
| 22 | Nicotinic acide | 0,5 | 0,5 |
| | Các chất kích thích sinh trưởng | | |
| 23 | 2,4 D | 0,5 | 0,5 |
| 24 | Napthalene acetic acid | 1,0 | 1,0 |
| 25 | Belzyl amino purin | 0,5 | 0,5 |
| 26 | Glucose | 60 | 60 |
| 27 | Agar | 8,0 | 8,0 |
| 28 | pH | 5,8 | 5,8 |

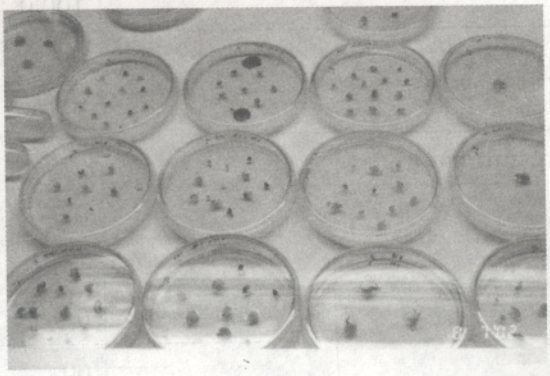


*Hình 49.1: Bông lúa đang làm đòng*

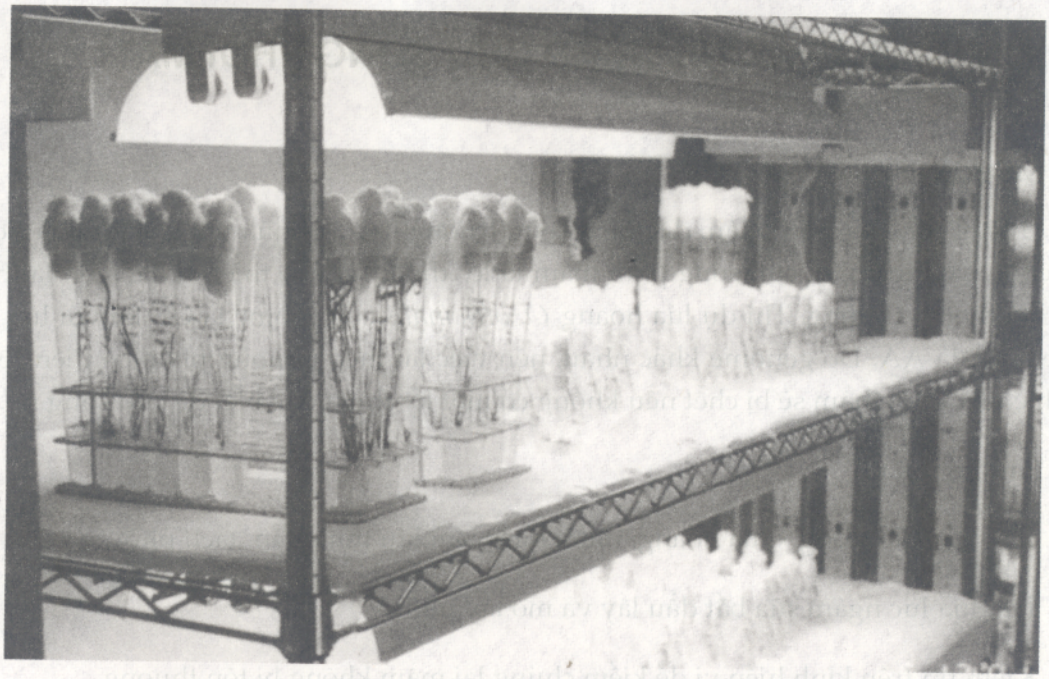
*Hình 49.2: Bông lúa tách ra để lấy túi phấn*



*Hình 49.3: Bông phấn được nuôi trong môi trường MS*



*Hình 49.4: Tách mô sẹo*



*Hình 49.5: Cây trong môi trường tái sinh*

*Hình 49.6: Nuôi trong dung dịch dinh dưỡng*

# 50. PHƯƠNG PHÁP CỨU SỐNG PHÔI MẦM

## 50.1. Mở đầu

Trong nuôi cấy túi phấn, đặc biệt trong trường hợp lai giữa lúa trồng x lúa hoang có bộ genome khác nhau, cứu sống phôi mầm là kỹ thuật rất cần thiết để tạo con lai hữu thụ phát triển bình thường. Thí dụ lúa hoang *O. officinalis* có genome là CC lai với lúa thường có genome là AA. Do genome khác nhau, nên việc lai theo phương pháp cổ điển sẽ không thành công. Phôi mầm sẽ bị chết nếu không có một kỹ thuật đặc biệt để cứu sống nó.

## 50.2. Phương pháp

Lai giữa lúa trồng x lúa hoang, mười ngày sau khi thụ phấn, tách phôi.

Hạt lúa lúc ngậm sữa bắt đầu lấy và mở lấy phôi.

Kiểm tra trên kính hiển vi để kiểm chứng lại mầm không bị tổn thương

Mầm được tách ra khỏi vỏ trấu, xử lý cồn 70 độ trong 1 phút và 0,1 % $HgCl_2$ trong 15 phút và rửa sạch nhiều lần bằng nước cất tiệt trùng. Mầm của các cây trồng trong đợt đầu sau đó được nuôi trong môi trường N6 có bổ sung kích thích sinh trưởng theo 2 nghiệm thức, có thể thêm nhiều nghiệm thức tùy theo thiết kế của nhà nghiên cứu.

I. 0,5mg/ 12,4 D + 1,0 mg /L NAA + 0,5mg/ L BAP (nền N6)

II. 0,5 mg/ 1 2,4 D + 1,0 mg /L NAA + 0,5mg/ L BAP (nền MS)

Thí nghiệm bố trí ba lần lập lại, mỗi bình cấy 20 hạt lúa = 120 túi phấn

Vật liệu để trong tối 25°C

Mô sẹo hình thành đường kính 2 - 3mm được tái sinh trong môi trường MS có bổ sung 1mg/ l BAP, 1mg/l NAA) ở 25°C và 12 giờ chiếu sáng.

Cây tái sinh được nhân vô tính trên môi trường MS có bổ sung 2mg/l BAP

Một nửa số cây trong cùng dòng được tạo ra trên môi trường MS không chất kích thích sinh trưởng.

Cây có bộ rễ phát triển được trồng trong môi trường dinh dưỡng Yoshida

Các dòng cho hạt lép được giữ trong phòng được xử lý colchicine ở nồng độ 0,05% trong 10 giờ hoặc trong tối 5 giờ.

**50.3. Hóa chất và dụng cụ cần thiết**

Môi trường :

| TT | Thành phần | MS(mg/l) | N6( mg/l) |
|---|---|---|---|
| 1 | Muối khoáng | | |
| 2 | Amonium nitrat | | |
| 3 | Amonium sulfat | | |
| 4 | Boric acid | | |
| 5 | Calcium chloride | | |
| 6 | Cobalt chloride $6H_2O$ | 0,025 | |
| 7 | Cupic sulfat. $5H_2O$ | 0,025 | |
| 8 | Ethylene diamine tetraacetit acid, 2 $NaH_2O$ | 37,26 | 37,26 |
| 9 | Ferrous sulfate. $7H_2O$ | 27,8 | 27,8 |
| 10 | Magiesium sulfat | 180,7 | 90,35 |
| 11 | Manganese sulfat | 16,9 | 3,33 |
| 12 | Molybdic acid $Na_2.H_2O$ | 0,25 | |
| 13 | Potasium iodide | 0,83 | 0,8 |
| 14 | Monobase potasium phosphate | | 400,0 |
| 15 | Potasium nitrat | 1900,0 | 2830,0 |
| 16 | Zinc sulfate.7 $H_2O$ | 8,6 | 1,5 |
| 17 | Các chất hữu cơ và vitamine | | |
| 18 | Glycine | 2,0 | 2,0 |
| 19 | Thiamine HCl | 0,4 | 1,0 |
| 20 | Myo Inositol | 100,0 | 100,0 |
| 21 | Pyridocine HCl | 0,5 | 0,5 |
| 22 | Nicotinic acide | 0,5 | 0,5 |
| | Các chất kích thích sinh trưởng | | |
| 23 | 2,4 D | 0,5 | 0,5 |
| 24 | Napthalene acetic acid | 1,0 | 1,0 |
| 25 | Belzyl amino purin | 0,5 | 0,5 |
| 26 | Glucose | 60 | 60 |
| 27 | Agar | 8,0 | 8,0 |
| 28 | pH | 5,8 | 5,8 |

# 51. CÂY TÁI SINH VÀ DUY TRÌ CÂY TÁI SINH

## 51.1. Mở đầu

Cây tái sinh là một yếu tố cơ bản cực kỳ quan trọng trong cấy mô và chuyển gen. Trong quá trình chọn lọc các mô sẹo để chuyển gen, mà không có cây tái sinh thì việc chuyển gen không còn giá trị.

Đối với cây tái sinh thành phần cơ bản chung là muối cho môi trường N6, MS hoặc R2. Bổ sung với 3% sucrose hoặc maltose, 1-3mg kinetin/l 1mg NAA (napthalene acetic acid)/ lít với 0,8% agar

Tùy thuộc vào kiểu gen của cây trồng chúng ta phải bổ sung và cải tiến môi trường cho phù hợp.

## 51.2. Phương pháp

### *51.2.1. Cây tái sinh*

1. Chuyển mô sẹo (không phải tất cả mô sẹo) tới môi trường tái sinh MS với 2mg kinetin/ l và 1mg NAA/l
2. Giữ môi trường ánh sáng trong 16 giờ với 3000lux, ở điều kiện nhiệt độ 26°C
3. Chuyển một khối lượng nhỏ mô sẹo tới môi trường MS mà không có hormone để phát triển rễ. Giữ mẫu trong môi trường 16 giờ trong ánh sáng 3000 lux ở 26°C.

### *51.2.2. Trồng và quản lý, theo dõi cây tái sinh*

1. Chuyển cây non có hệ thống rễ đầu tiên trong ống nghiệm sang khay có chứa dung dịch Yoshida. Đục lỗ tấm xốp tạo cho cây tiếp xúc với dung dịch.
2. Chuyển cây ra nhà lưới ở điều kiện nhiệt độ 21/29°C (9-10 giờ/ ngày và 14 - 15 giờ/ ban đêm).
3. Đánh số từng cây, thay môi trường 1 - 2 tuần/ lần
4. Cho vào bể một số lượng phân khi cây có hệ thống rễ đủ tiếp nhận phân
5. Cột bông khi cây trổ
6. Thu bông khi hạt chín
7. Phơi khô
8. Hạt có thể dự trữ trong bao đựng với silicagel. Dự trữ 8 - 10°C
9. Đánh giá cây trồng

**51.3. Môi trường**

*Bảng1:* **Chuẩn bị môi trường N6**

| Bình đựng | Thành phần | Stock dung dịch G/l | Số lượng cần | Nồng độ (mg/l) |
|---|---|---|---|---|
| A | $KNO_3$ | 141.50 | 20 | 2830.0 |
| B | $MgSO_4$ | 18.5 | 10 | 185.0 |
| | $MnSO_4$ 4 $H_2O$ | 0.44 | | 4.4 |
| | $ZnSO_4$ 7 $H_3O$ | 0.15 | | 1.5 |
| | $(NH_4)_2$ $SO_4$ | 46.0 | | 463.0 |
| C | $KH_2$ $PO_4$ | 40.0 | 10 | 400.0 |
| | KI | 0.08 | | 0.8 |
| | $H_3BO_3$ | 0.16 | | 1.6 |
| D | $CaCl_2$ 2 $H_2O$ | 16.6 | 10 | 166.0 |
| E | $FeSO_4$ 7 $H_2O$ | 2.78 | 10 | 27.8 |
| | $Na_2$ EDTA | 3.73 | | 37.3 |
| Vitamine | | Mg/100ml | | |
| | Nicotinic acid | 100 | 0.5 | 0.5 |
| | Pyridoxine HCl | 100 | 0.5 | 0.5 |
| | Thiamine HCl | 100 | 1.0 | 1.0 |
| | Glycine | 100 | 2.0 | 2.0 |
| Hormol | 2,4 D | 10 | 20 | 2.0 |
| Sucrose/ maltose | | | | 30000.0 |
| agar | | | | 8000.0 |
| pH | 5,6-5,8 | | | |

*Bảng 2:* **Môi trường MS (Murashige và Skoog. 1962)**

| Bình đựng | Thành phần | Dung dịch Stock G/l | Số lượng cần | Nồng độ (mg/l) |
|---|---|---|---|---|
| MSI | $NH_4NO_3$ | 82.5 | 20 | 1650.0 |
| | $KNO_3$ | 95.0 | | 1900.0 |
| MS II | $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 37.0 | 10 | 370.0 |
| | $MnSO_4$ 4 $H_2O$ | 2.23 | | 22.3 |
| | $ZnSO_4$ | 0.86 | | 8.6 |
| | $CuSO_4$ 5 $H_2O$ | 0.0025 | | 0.025 |
| MS III | $CaCl_2$ 2 $H_2O$ | 44.0 | 10 | 440 |
| | KI | 0.083 | | 0.83 |
| | $CoCl_2$ 6 $H_2O$ | 0.0025 | | 0.025 |
| MS IV | $KH_2PO_4$ | 17.0 | 10 | 170.0 |
| | $H_3BO_3$ | 0.62 | | 6.2 |
| | $Na_2MoO_4$ $2H_2O$ | 0.025 | | 0.25 |
| MS V | $FeSO_4$ 7 $H_2O$ | 2.785 | 10 | 27.85 |
| | $Na_2$ EDTA | 3.725 | | 37.25 |
| Vitamine | | Mg/100ml | | |
| | Nicotinic acid | 100 | 0.5 | 0.5 |
| | Pyridoxine HCl | 100 | 0.5 | 0.5 |
| | Thiamine HCl | 100 | 1.0 | 1.0 |
| | Glycine | 100 | 2.0 | 2.0 |
| Hormol | 2,4 D | 10 | 20 | 2.0 |
| Myo-inositol | | | | 100.0 |
| Sucrose/ maltose | | | | 30000.0 |
| agar | | | | 8000.0 |
| pH | 5,6-5,8 | | | |

*Bảng 3:* **Chuẩn bị dung dịch (Yoshida 1996)**

| Bình đựng | Thành phần | Dung dịch (g 10/l) | Số lượng cần 4 lít chuẩn bị (ml) |
|---|---|---|---|
| A | $NH_4NO_3$ | 914.0 | 5 |
| B | $NaH_2PO_4$ 2 $H_2O$ | 403.0 | 5 |
| C | $K_2SO_4$ | 714.0 | 5 |
| D | $CaCl_2$ | 886.0 | 5 |
| E | $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 3240.0 | 5 |
| F | $MnCl_2$ 4 $H_2O$ | 15.0 | |
| | $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24}.4H_2O$ | 0.74 | |
| | $H_3BO_3$ | 9.34 | |
| | $ZnSO_4$ 7 $H_2O$ | 0.35 | |
| | $CuSO_4$ 5 $H_2O$ | 0.31 | |
| | $FeCl_3$ 6 $H_2O$ | 77.0 | |
| | Citric acid (monohydrate) | 119.0 | |
| pH | | 5.0 | |

Chú ý hòa riêng từng loại. Phối hợp với 500ml $H_2SO_4$, tạo thể tích trong 10 lít với nước cất.

## Tài liệu tham khảo


Murashige T. Skoog F.1962. A Revised medium for rapid growth and biossays with tobaco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. 1976 Routine procedure for growing rice plants in culture solution. In; Laboratory manual for physiological studies of rice. Los banos : IRRI 61-66

# 52. CHUẨN BỊ CHO CÂY LÚA CHUYỂN GEN

## 52.1. Giới thiệu

Muốn chuyển gen cần phải qua các bước nuôi cấy mô, tạo mô sẹo và chuyển mô sẹo qua môi trường có vi khuẩn để chuyển gen hoặc chuyển trực tiếp bằng súng bắn gen. Trong cải tiến giống thông qua phương pháp cấy mô, cây trồng rút ngắn thời gian chọn tạo giống. Dựa trên cơ sở trên, việc tạo một tế bào sống và phát triển trên môi trường in vitro là cần thiết. Có nhiều phương pháp chuyển gen, ở đây chúng tôi chỉ giới thiệu một vài phương pháp thông dụng đang phổ biến tại Viện nghiên cứu lúa Quốc tế cũng như tại Viện lúa ĐBSCL.

## 52.2. Trồng và quản lý cây

Cách làm:

- Phá vỡ miên trạng hạt và làm sạch hạt : Để hạt trong tủ ấm (50°C trong 3 - 5 ngày). Lấy hạt ra khỏi tủ và để vào đĩa petri sạch với giấy lọc trong 24 giờ với nhiệt độ 27 - 29°C.
- Trồng hạt trong chậu và có nước, đất đầy đủ
- Sau 21 ngày cấy sang chậu bón phân N, P, K
- Giữ cây trong nhà lưới và bảo vệ sâu bệnh
- Sử dụng phôi để tạo callus, hoặc bông

## 52.3. Chuẩn bị nuôi cấy tế bào soma

Cách làm

Dùng hạt để tạo callus

- Bóc vỏ hạt và rửa trong cồn 70% trong 1' và ngâm trong 45% chlorox (5-25% Na - hypochlorite) với 1 - 2 giọt Tween trong 20 - 30'.
- Ngâm hạt trong nước cất 4 lần
- Hạt được đưa qua nuôi trong môi trường MS với 2mg 2,4 D
- Ủ trong tối với 27°C
- Sau 3 - 4 tuần, tách từ phôi và chuyển sang môi trường mới
- Ủ trong tối 27°C
- Cấy mô sẹo trong 3 - 4 tuần

## 52.4. Quản lý cây trong nhà kính

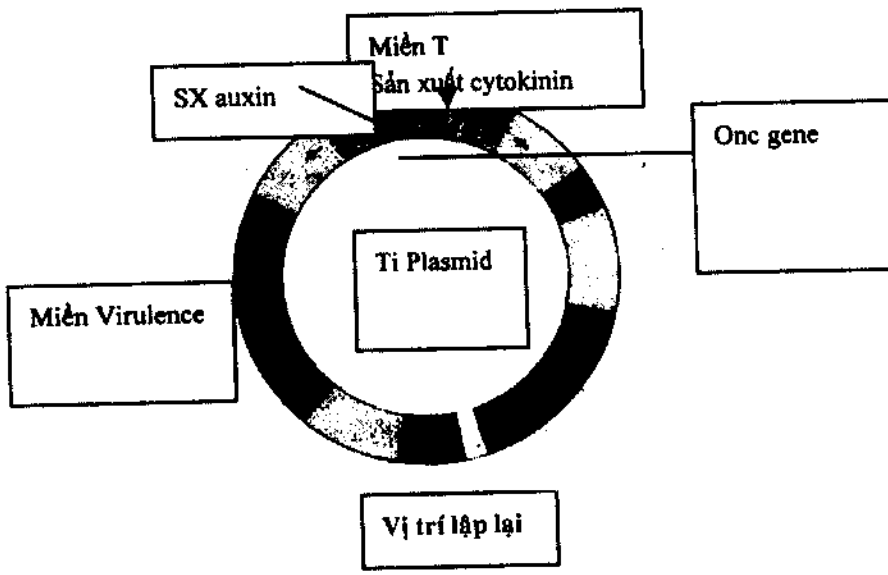
- Chăm sóc và bảo vệ cây, bón phân, nước cho cây

# 53. CHUYỂN GEN BẰNG VI KHUẨN AGROBACTERIUM

## 53.1. Mở đầu

Vi khuẩn *Agrobacterium tumefacien* là vi khuẩn sống trong đất gây ra nốt sần trên cây. Nốt sần là những khối u, phát triển không bình thường (Datta.1997)

Cơ chế: Plasmid này gọi là Ti (tumor inclucing) plasmid. Một đoạn nhỏ của Ti plasmid được biểu thị trong hình 53.1.




*Hình 53.1. Bản đồ di truyền của Ti plasmid*

T-DNA sẽ chuyển vào tế bào và đi vào trong nhân, vùng T, sản xuất cytokinin, có kích thích 24 bp. T-DNA có gen "onc" sản xuất ra phytohormones. Dạng hình nguyên thủy của *A.tumefacien* có thể phân ra các lớp như: octopine, nopaline, succinamopine, hoặc L.L succinamopine.

Sau đây là phương pháp chuyển gen của IRRI (Datta, 1997)

## 53.2. Chuẩn bị vật liệu

Cây lúa thí nghiệm sẽ được sử dụng mô sẹo và phôi non (hoặc phôi trưởng thành). Các mô sẹo có khả năng sinh phôi được chọn và tách nhỏ 1 - 2 mm, nuôi cấy trên môi trường N6 hoặc MS trong thời gian 4 ngày trước khi chuyển sang môi trường nuôi cấy vi khuẩn.

*Cấy vi khuẩn Agrobacterium*

Vi khuẩn được tồn trữ trong glycerol 5%

1. Chuẩn bị môi trường cấy trong dung dịch AAM hoạc dung dịch lỏng trong môi trường LB, bổ sung thêm 50 mg kanamycin/l và 50 mg hygromycine/l
2. Ủ và lắc hai ngày trong nhiệt độ 28°C
3. Chuyển 5ml của dung dịch cấy vào 25 ml dung dịch AAM hoạc DD LB (có chứa 50 mg kanamycin/l và 50 mg hygromycine/l)
4. Từ môi trường AAM, chuyển sang lại môi trường AB, điều chỉnh liều lượng tương đương với nồng độ của antibiotics
5. Giữ trong nhiệt độ 28°C trong hai ngày

*Chuyển gen*

1. Ly tâm vi khuẩn trong môi trường lỏng khoảng 30 phút, bỏ môi trường và lấy vi khuẩn, để vi khuẩn vào dung dịch 20ml $MgSO_4$ (10mM) trong ống nghiệm 50 ml
2. Dùng pipete lấy 2,7 ml $MgSO_4$ đưa vào một ống nghiệm khác và cho thêm 300µl vi khuẩn trong dung dịch $MgSO_4$ (10mM)
3. Đo nồng độ
4. Ly tâm để thu vi khuẩn trong 20mL $MgSO_4$ tốc độ 3800rpm trong 30 phút, loại bỏ supernatant
5. Pellet của vi khuẩn đưa vào dung dịch lỏng N6- AS, qui mô cuối cùng khoảng 02D
6. Lấy mô sẹo từ phôi đưa vào vi khuẩn trong đĩa petri
7. Đặt đĩa petri trong 10 phút
8. Để đứng trong 20 phút .Dùng pipete lấy vi khuẩn ra khỏi mô
9. Đặt mô sẹo trong một giấy lọc và chuyển mô này vào môi trường rắn N-6 -AS. Giữ chúng trong tối 25°C trong ba ngày

*Rửa và chọn lọc*

1. Rửa phôi hai lần với nước cất chứa 250mg cefotaime l để di chuyển vi khuẩn
2. Chuyển mô sẹo vào giấy và rửa
3. Đặt một vài mô sẹo trong dung dịch nhuộm GUS, để kiểm tra phản ứng của GUS
4. Giữ mô sẹo trong GUS qua đêm, nhiệt độ 37°C
5. Kiểm tra hiện diện và số lượng của điểm màu xanh trên mô sẹo
6. Các mô sẹo sẽ được chuyển sang môi trường dinh dưỡng cho cây tái sinh

### 53.3. Môi trường

Môi trường AB

| Thành phần | Số lượng (g 500ml/l) |
|---|---|
| Stock 1 | |
| $K_2HPO_4$ | 30.0 |
| $NaH_2PO_4$ | 10.0 |
| StockII | |
| $NH_4Cl$ | 10.0 |
| $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 3. |
| KCl | 1.5 |
| $Ca_2Cl$ | 0.1 |
| $FeSO_4$ $7H_2O$ | 0.025 |
| Stock III | |
| Glucose | 5.0 |
| Agar | 15.0 |

Thanh trùng ba dung dịch trên riêng biệt với nhau

Cho 25 ml stock I và II vào 450 ml của stock III

Thêm 50 mg/l hygromycin và kanamycin

Môi trường AAM

| Thành phần | Số lượng (mg/l) |
|---|---|
| Đa lượng | |
| $CaCl_2$ 2 $H_2O$ | 150.0 |
| $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 250.0 |
| $NaH_2PO_4$ $H_4O$ | 150.0 |
| KCl | 2950.0 |
| Vi lượng | |
| KI | 0.75 |
| $H_3BO_3$ | 3.0 |
| $MnSO_4$ $H_2O$ | 10.0 |
| $ZnSO_4$ 7 $H_2O$ | 2.0 |
| $Na_2MoO_4$ $2H_2O$ | 0.25 |
| $CuSO_4$ 5 $H_2O$ | 0.025 |
| $CoCl_2$ 6 $H_2O$ | 0.025 |
| Thành phần sắt | |
| $Na_2$ EDTA | 37.3 |
| $FeSO_4$ 7 $H_2O$ | 27.3 |

| | |
|---|---|
| Vitamine | |
| Nicotinic acid | 0.5 |
| Pyridoxine HCl | 0.5 |
| Thiamine HCl | 1.0 |
| Glycine | 2.0 |
| Inositol | 100.0 |
| Chất khác | |
| L-glutamine | 876.0 |
| Aspartic acid | 266.0 |
| Asginine | 174.0 |
| Casamino acid | 500.0 |
| Sucrose | 68.5g/l |
| Glucose | 36g/l |
| Acetosyringone | 200μM |
| pH 5-2 | |

Trộn chung các thành phần trước khi chỉnh pH. Lọc.

Môi trường N6-AS

| Thành phần | A2So61 lượng (mg/L) |
|---|---|
| Macronutrients (N6) | |
| $KNO_3$ | 2830 |
| $CaCl_2$ 2 $H_2O$ | 166 |
| $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 185 |
| $KH_2PO_4$ | 400 |
| $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ | 463 |
| Micronutrients | |
| KI | 0.8 |
| $H_3BO_3$ | 1.6 |
| $MnSO_4$ 4 $H_4O$ | 4.4 |
| Vitamine (as MS) | 1.5 |
| Fe EDTA (as MS) | |
| Chất khác | |
| Inositol | 100 |
| 2,4 D | 20 |
| Sucrose | 30,000 |
| Glucose | 10,000 |

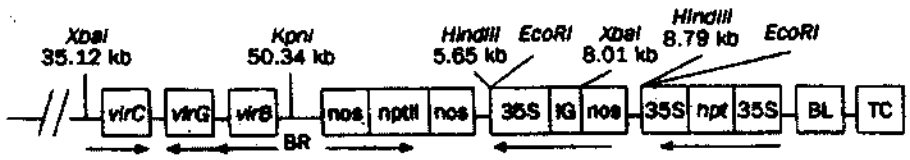
| | |
|---|---|
| Gelrit or | 2,000 |
| Agarosae | 5.750 |
| Acetosyringone | 200µM |
| pH = 5.2 | |

Lọc, trước khi hấp vô trùng

**Dung dịch ( N6-CH)**

| Thành phần | Số lượng (mg/l) |
|---|---|
| Đa lượng như N6 | |
| Vi lượng như N6 | |
| Vitamine (N6) | |
| FeEDTA (như N6) | |
| **Chất khác** | |
| Inositol | 100 |
| Casamino acid | 1000 |
| 2,4D | 20 |
| Cefotaxime | 250 |
| Hygromycin | 50 |
| Sucrose | 30,000 |
| Gelrite | 2000 |
| pH = 5,8 | |

Lọc, trước khi hấp vô trùng




*Hình 53.2. Plasmid: pTOK 233 chứa LBA 4404 bao gồm vùng Vir B, Vir C, Vir G gene được dùng cho chuyển gen*

**Tài liệu tham khảo**

Swapan K. Datta, Lina B. Torrizo, J.Tu, Norman P.Oliva, K. Datta (1997). Production and molecular evaluation of trangenic rice plants.

# 54. CHUYỂN GEN TRỰC TIẾP VÀO TẾ BÀO TRẦN VÀ THỂ TRANSIENT

## 54.1. Mở đầu

Sự thể hiện của "transient" của "reporter" là phương pháp phân tích kiểm tra sự thể hiện gen mục tiêu trong tế bào cây. "Reporter gene" áp dụng được là β-glucuronidase (GUS) và chloramphenicol acetyl transferase (CAT). Mặt khác hygromycin phosphotransferase (HPT) cũng thường được dùng để chọn lọc do vậy, nó còn được gọi là "selectable marker". Hầu hết plasmid vector chứa nhiều gen, vì thế enzyme để cắt HPT thì ảnh hưởng đến các tính trạng nông học của đối tượng nghiên cứu.

## 54.2. Phương pháp (IRRI, 1995)

### *54.2.1. Chuyển trực tiếp protoplast (tế bào trần)*

1. Thực hiện như các thực hiện phần trước
2. Nồng độ 3x $10^6$ppts/ ml trong dung dịch MaMg
3. Hòa tan 0,5ml aliquot vào 12ml tube
4. Thêm plasmid 9 pGHI dùng 10µl pipetman, lắc ống nghiệm
5. Thêm vào 0,5 ml 405 PEG, lắc và ủ 10 phút nhiệt độ trong phòng
6. Thêm 6ml P 1 m và ủ 12/24 giờ trong tối

### *54.2.2. Ly trích protoplast cho transient*

1. Ly tâm Pellet protoplast 9 800rpm trong 5 phút, lấy supernatant
2. Chuyển supernatant vào ống nghiệm 1,5ml
3. Pellet protoplast
4. Thêm 150 µl dung dịch ly trích
5. Làm lạnh trong nitơ lỏng, rung 5 phút
7. Bỏ 60 µl supertanant cho GUS và đánh giá nồng độ protein

### *54.2.3. Xác định protein và transient cho GUS*

1. Đo nồng độ protein ly trích, 200 lần
2. GUS, thêm 50µl ly trích từ 500µl chuẩn bị, làm ấm dung dịch, ủ trong 37°C vài ngày
3. Dừng phản ứng, lấy 100µl trộn và thêm 900µl buffer. Mẫu dự trữ ở nhiệt độ 4°C trong tối

4. Kiểm tra kết quả huỳnh quang dưới máy chiếu UV, đo kết quả huỳnh quang trên fluorimeter có độ dài sóng 9 365 nm, 445nm). Dùng 10nM tới 100μMMU (4- methyl umbelliferone 0, tính mức độ hoạt động GUS (nM -4MU/phút)

***54.2.4. Transient GUS***

1. Rửa protoplast, thêm 2ml WS trong 2 phút
2. Cấy protoplast như phương pháp phần trên
3. Nhuộm dung dịch 12, 24, 48 giờ và một tuần. Kiểm tra màu

***54.2.5. Transient HPT***

1. Rửa protoplast,
2. Thêm 3ml dung dịch P 1
3. Ủ tube trong tối
4. Ly trích protoplast 12, 24, 48 giờ và 1 tuần
5. HPT

***54.2.6. Ly trích protoplast***

1. Dung dịch protoplast trong ống nghiệm 1,5ml
2. Ly tâm 10,000rpm trong 5 phút
3. Loại bỏ P1
4. Thêm mỗi ống nghiệm 0,5ml HPT buffer
5. Đặt trong nitơ lỏng, Dự trữ - 20°C

**Tài liệu tham khảo**

- IRRI 1995. Training course on transformation of rice and molecular analysis of transgenic rice plants. Laboratory manual. 53 paper

# 55. CHUYỂN GEN TRỰC TIẾP QUA TẾ BÀO TRẦN

## 55.1. Mở đầu

Tế bào trần là môi trường mà gen DNA ngoại lai chuyển vào bằng phương pháp vi tiêm. Vì thế, sự chuyển này có khả năng tạo ra một khối lượng lớn tế bào và nhân, nhờ tế bào tái sinh ra nhiều thế hệ.

Sử dụng tế bào trần bao gồm tế bào phôi (ECS) đầu tiên được thiết lập từ các mô sẹo sản xuất ra các hạt chín, phôi mầm, túi phấn và phát triển các bào tử, hoặc phôi. Thiết lập ECS thay đổi tùy thuộc vào kiểu gen. Thí dụ kiểu gen của loại hình japonica thường dễ dàng chuyển hơn là indica.

Chuyển nạp gen vào tế bào trần bằng phương pháp polyethylene glycol (PEG) cũng được phổ biến (Datta và ctv 1990). Có một điều quan trọng trong chuyển gen theo phương pháp này đòi hỏi khả năng phát triển mô sẹo thật tốt, cây có khả năng tái sinh và việc chọn lựa calli rất kỹ lưỡng.

Chúng ta phải xác định "selectable marker" là gen kháng hygromycin trong trường hợp này. Hiệu quả chọn lọc các calli, nơi gen chèn vào tùy thuộc khả năng marker chọn lọc, bởi vì hàng triệu tế bào, chúng ta chỉ chọn được vài tế bào kháng với hygromycin, chứng minh nơi có gen chuyển nạp vào.

## 55.2. Phương pháp

### *55.2.1. Thiết lập ECS trên lúa*

1. Chuyển 1 g phôi vào trong một lọ tam giác với thể tích 125ml chứa 25ml tế bào trong môi trường (AA) chú ý lọc thật kỹ hoặc R- 2 được thanh trùng.
2. Ủ trong tủ lắc ở 120rpm trong tối, nhiệt độ 28°C
3. Cấy lại mỗi lần 4-5 ngày với chọn tiếp tục các tế bào chất, mật độ nhỏ, cùng nhóm với nhau.
4. Một dòng tế bào được thiết lập
5. Chuyển ECS vào môi trường R2 hoặc môi trường AA 3 - 4 ngày trước khi ly trích tế bào trần

### *55.2.2. Ly trích tế bào trần*

1. Chuyển 2-2,5g ECS (3-4 ngày tuổi) vào một đĩa sau (10cm)
2. Cho phép tế bào tập trung bên dưới, bỏ môi trường
3. Thêm vào mẫu 10ml enzyme / tegram/ tế bào
4. Ủ và trộn trong tối ở 30°C trong 2 giờ, nhiệt độ 25°C, lắc trong 2 giờ

5. Thêm tương đương một số lượng dung dịch rửa và trộn enzyme protoplast
6. Trộn qua hai lần 50μm rồi 25μm
7. Chuyển qua filter và ống nghiệm ly tâm 50 ml. Cho ly tâm trong 10 phút ở 800rpm
8. Rửa pellet qua hai lần và xác định tế bào trần bằng một haemocytometer

### *55.2.3. Chuyển qua tế bào trần bằng PEG*

1. Ủ và ly trích tế bào trần trong tối ở 4°C tối thiểu 30 phút
2. Ly tâm tế bào trần ở 800 rpm trong 10 phút
3. Treo tế bào trần trong dung dịch MaMg 3-4 x $10^6$ protoplast/ ml
4. 0,5 ml tế bào trần ở chung quanh đáy ống nghiệm 12ml
5. Thêm DNA (10ug plasmid DNA +40 yg calf thymus DNA) vào mỗi ống nghiệm, sử dụng micropipette 10μl
6. Thêm 0,5ml PEG (9 - 40%) và lắc. Ủ nhiệt độ trong phòng, trong 10 phút
7. Thêm 2ml dung dịch rửa và rửa từ từ, chậm, sau 2 phút. Cho thêm lần nữa 5ml dung dịch để rửa lại, sau khi rửa hai phút.
8. Ly tâm (800rpm) trong 10 phút để chuyển tế bào trần

### *55.2.4. Cấy vào tế bào trần*

1. Thêm 0,4 ml của dung dịch P 1 trên 1-1,5 x $10^6$ pellet protoplast
2. Mang chúng trong 35mm đĩa petri.
3. Thêm 0,6 ml dung dịch APM (nấu chảy và duy trì 45°C)
4. Ủ trong phòng 1 giờ
5. Cắt agarose trong 4 đoạn và chuyển hạt tới 5cm đĩa petri chứa 5ml môi trường P 1 với tế bào chồi. Ủ môi trường trong tối với nhiệt độ 27°C và lắc (30rpm)
6. Cấy chuyền các hạt (beads) 4-65 ngày và lập lại thay thế 2ml dung dịch với môi trường P1
7. Sau 7-10 ngày, loại bỏ tế bào chồi và mô của hạt trong môi trường P1, ủ trong tối và lắc nhẹ

### *55.2.5. Chọn và chuyển thế hệ*

1. Cấy các hạt trong môi trường P 1 chứa 25mg hygromycin BL/ 2 tuần sau khi chuyển
2. Ủ trong tối ở nhiệt độ 25°C và lắc nhẹ trong hai tuần

3. Chuyển lần thứ hai vào môi trường P1 chứa 25mg hygromycin /lit. Giữ trong tối 25°C trong hai tuần không lắc
4. Chuyển hạt trong môi trường với nồng độ thấp octmoticum (3ml P1 + 2ml dung dịch R 2), ủ trong 2 tuần, không lắc
5. Chuyển hạt trong môi trường agarose (0,3%) với sự chọn lọc. Chuyển coloni của tế bào phôi kích thước 1,5 mm diameter tới P 2, Thêm 0,5% và 8% agarose. Ủ trong 2-3 tuần
6. Chuyển phôi phát triển tới môi trường tái sinh (P3) trong 50ml, ủ trong 12 giờ, nhiệt độ 25°C
7. Cây tái sinh và nhân nhanh thế hệ (xem phần tái sinh cây)

### 55.3. Môi trường và hóa chất cần thiết

Sau đây là các hóa chất cần thiết dùng trong các môi trường khác nhau. Chú ý các hóa chất trên sau khi pha, phải thanh trùng trước khi sử dụng.

*Bảng 1:* **Thành phần môi trường AA cho tế bào**

| Thành phần | Số lượng |
|---|---|
| Mối vô cơ | (mg/l) |
| $CaCl_2$ 2 $H_2O$ | 150 |
| $NaH_2PO_4$ $H_2O$ | 150 |
| $MgSO_4$ $7H_2O$ | 250 |
| $FeSO_4$ 7 $H_2O$ | 27.8 |
| $Na_2$ EDTA | 37.3 |
| KCl | 2950 |
| $MnSO_4$ $H_2O$ | 10 |
| $ZnSO_4$ $7H_2O$ | 2 |
| $H_3BO_3$ | 3 |
| $CuSO_4$ 5 $H_2O$ | 0.025 |
| $CoCl_2$ 6 $H_2O$ | 0,025 |
| KI | 0.75 |
| $Na_2MoO_4$ 2 $H_2O$ | 0.251 |
| Vitamine | |
| Nicotinic acid | 1 |
| ThiamineHCl | 10 |
| Pyridoxine HCl | 1 |
| Myo inositol | 100 |

| | |
|---|---|
| Amino acid | |
| Glutamine | 876 |
| Aspartic acid | 266 |
| Glycine | 7.5 |
| Arginie | 174 |
| Sucrose/ maltose | 20.000 |
| Hormones | |
| 2,4 D | 2 |
| pH = 5,6 - 5,8 | |

*Bảng 2:* **Môi trường R 2**

| Stock | Thành phần | Số lượng (mg/l) | Stock (mg/l) | Số lượng (ml/l) từ stock |
|---|---|---|---|---|
| R 2 Micro | $NaH_2PO_4$ 2 $H_2O$ | 240 | 2,400 | 100 |
| | $KNO_3$ | | | |
| | $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 4044 | 40,440 | |
| | $(NH_4)_2SO_4$ | 247 | 2,470 | |
| | $CaCl_2$ 2 $H_2O$ | 330 | 3.300 | |
| | | 147 | 1.470 | |
| R2/ Micro | $MnSO_4$ $H_2O$ | 0.50 | 500 | 1 |
| | $ZnSO_4$ 7 $H_2O$ | 0.50 | 500 | |
| | $H_3BO_3$ | 0.50 | 500 | |
| | $CuSO_4$ 5 $H_2O$ | 0.05 | 50 | |
| | $Na_2MoO_4$ | 0.05 | 50 | |
| R 2. vit | Nicotinic acid | 0.5 | 50 | 10 |
| | Pyridoxine HCl | 0.5 | 50 | |
| | Thiamine HCl | 1.0 | 100 | |
| | Glycine | 2.0 | 200 | |
| Iron stock | $Na_2$ EDTA | 37.3 | 3.730 | 10 |
| | $FeSO_4$ 7 $H_2O$ | 27.8 | 2.780 | |
| | 2,4D | 1 | 20100/ml | 5 |
| | Sucrose/ maltose | 30.000 | | 30.000mg |

Tạo thể tích 1 lít nước cất, pH = 5,6, lọc

*Bảng 3:* **Chuẩn bị dung dịch tế bào trần**

| Thành phần | P 1(mg/l) | P 2 (mg/l) | P 3 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ | 330.0 | 463.0 | - |
| $KH_2PO_4$ | - | 400.0 | 170.0 |
| $KNO_3$ | 4044.0 | 2830.0 | 1800.0 |
| $NH_4NO_3$ | | | 1650.0 |
| $CaCl_2$ 2 $H_2O$ | 147.0 | 166.0 | 440.0 |
| $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 247 | 185.0 | 370.0 |
| $Na_2$ EDTA | 37.3 | 37.3 | 37.3 |
| $FeSO_4$ 7 $H_2O$ | 27.8 | 27.8 | 27.8 |
| $NaH_2PO_4$ 2 $H_2O$ | 240 | | |
| $MnSO_4$ 4 $H_2O$ | 0.5 | 4.4 | 22,3 |
| $H_3BO_3$ | 0.5 | 1,6 | 6.3 |
| $ZnSO_4H_2O$ | 0.5 | 1.5 | 8.6 |
| KI | | 0.8 | 0.83 |
| $CoCl_2$ 6 $H_2O$ | | | 0.025 |
| $CuSO_4$ 5 $H_2O$ | 0.05 | | 0.025 |
| $Na_2MoO_4$ 2 $H_2O$ | 0.05 | | 0.25 |
| Thiamine HCl | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Nicotinicacid | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Pyridoxine HCl | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Glycine | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Myo inositol | 100 | 100 | 100 |
| Kinetin | | | 2.0 |
| NAA | | | 1.0 |
| 2,4D | 2.0g/l | 2.0g/l | |
| Sucrose* | 136.92g/l | 60.0g/l | 30.0g/l |
| Maltose* | 144,12g/l | 60g/l | |
| Agar | | | 8.0g/l |
| Agarose | | 3-6g/l | |
| pH | 5,6 | 5,8 | 5,8 |

** Chú ý: có thể thay thế sucrose hay maltose*

*Pha dung dịch*

Enzyme dung dịch (100ml) : 4g cellulase Onozuka RS, 1,0 g Macerozyme R-10, 20 mg Pectolyase Y 23, 0,4 M manitol, 6,8 mM $CaCl_2$. Dự trữ trong -20°C

Agarose Medium Protoplast (APM) : (30ml) : 600mg agarose hòa trong 30ml P1 (thay thế N 6 với maltose/ sucrose)

MaMg (dung dịch chuyển gen) (100ml : 0,31 g $MgCl_2$ $2H_2O$, hoặc 0,01 g MES và 7,28g mannitol

Dung dịch agarose mềm (100ml) : 0,3 agarose, 6g surcose hoặc 6g maltose hòa trong P1 dung dịch.

Dung dịch PEG (40%,. 200ml) : 80 g PEG MW 6000 hòa với 4,72 g $Ca(NO_3)$ 24 $H_2O$ và 14,57g manitol trong nước cất. Dung dịch hòa tan bởi đun nóng trong microwave, chia ra hai phần. Thể tích của dung dịch 200ml cho một phần, pH 10 bởi KOH phần 1

Cuối cùng pH 8,2 với phần 2. Ly tâm PEG, lọc trên ống nghiệm 10ml có chứa 508 ml và dự trữ trong -20°C.

**Tài liệu tham khảo**

Datta SK, Peterhans A, Datta K, Potrykus I. 1990 Genetically engineered fertile indica rice recovered from protoplast. Bio Technology : 8: 736-740

# 56. CHUYỂN NẠP GEN BẰNG THIẾT BỊ BẮN GEN (MICROPROJECTIBLE BOMBARDMENT)

## 56.1. Mở đầu

Việc chuyển gen có liên quan đến chức năng của gen bên ngoài chèn vào genome và ảnh hưởng đến chức năng genome của cây được chuyển. Thông qua nhiều thế hệ còn lại, chúng ta mới ghi nhận được hiện tượng này.

Phương pháp bắn gen có nhiều thuật ngữ như: biolistic, bombardement. Đây là phương pháp chuyển gen trực tiếp vào cơ quan cây trồng (Bửu và Lang, 2000).

Hiện nay người ta có ba dụng cụ bắn khác nhau. Điểm khác chủ yếu là phương tiện điều khiển microprojectile, bằng tungsten hay bằng vàng.

## 56.2. Các dụng cụ cần thiết cho bắn

Hóa chất cần thiết trong môi trường (xem chi tiết bên dưới)

Plasmid cần thiết

Dụng cụ bắn gen

Bộ phận bắn gen

Cân

Máy đo pH

Tủ cấy

Nồi hấp tiệt trùng

Tủ lạnh -20°C, -70°C

## 56.3. Phương pháp

***Chuẩn bị áo DNA với vàng (bột vàng cực mịn)***

***Phương pháp***

1. Cân 40mg vàng trong ống nghiệm
2. Chuẩn bị áo DNA trong tủ vô trùng
3. Chuẩn 1ml của 70% cồn, rung trong 20giây
4. Ly tâm mẫu trong 11.000rpm trong 5 phút
5. Cẩn thận di chuyển cồn và thêm 1ml nước cất, rung 5 phút
6. Ly tâm ở tốc độ 11.000rpm trong 5 phút

7. Thêm vào 400µl với 50% dung dịch glycerol/ nước cất và rung nước. Ống nghiệm phải được phủ parafin cẩn thận
8. Bỏ 100µl glycerol với vàng 970 trong ống nghiệm mới, thêm vào 25µl ( 91,0µg/µl plasmid DNA). Trộn kỹ
9. Thêm µl calcium chloride lạnh (2,5M) và trộn
10. Thêm vào 50 µl spermidine (0,1M) và trộn đều
11. Thêm 1ml cồn ở 70%, ly tâm vận tốc 11.000rpm trong 5 phút và bỏ supernatant
12. Thêm 1ml, 100% cồn và trộn, ly tâm ở 11,000rpm trong 5 phút
13. Thêm 40µl cồn 100% và sonicate, để trong water bath 5 giây
14. Giữ ống nghiệm trong đá, lấy 5µl aliquot làm khô trước khi bắn
15. Tiệt trùng Macrocarrier và rửa cồn 70% với giấy
16. Khi ngừng sử dụng phải lau sạch dụng cụ bắn,
17. Lau cồn trước khi sử dụng

***Bắn gen***

1. Chọn hạt non hay mô sẹo trong môi trường MBS bổ sung với 0,2M sorbitol và 0,2M mannitol, DNA được phủ lên các vi đạn vàng, các vi đạn phủ với DNA được bắn vào mô mục tiêu (mô sẹo hay mô non) bằng thiết bị bắn gen, nhờ áp lực luồng khí helium. BIOLISTIC PDS 1000 với khoảng cách 5cm.

   Môi trường bắn gen là N6 -0,5D. Sau khi bắn xong sẽ đặt đĩa vào ủ trong tối ở nhiệt độ 25°C trong hai ngày trước khi nhuộm GUS và ba ngày trước khi chọn môi trường chứa 10mg/LPPT.

***Nhuộm GUS***

1. Hoạt động của GUS quyết định trên mô đầu tiên của cây trong 48 đến 72 giờ sau khi bắn gen,
2. Dùng 5 brom 4chloro-3indoyl β -D glucuronide (X-Gluc) được thiết kế bởi Jefferson và ctv (1987)
3. Mẫu được bắn gen được cấy ủ trong phản ứng dung dịch chứa 1mM X-Gluc trong 50mM buffer phosphate, pH 7,0 ở nhiệt độ 37°C, qua đêm.
4. Khi β glucuronidase hiện diện trong tế bào, X-Gluc sẽ tạo màu xanh.
5. Điểm màu xanh chứng tỏ có sự hoạt động của enzyme GUS

*Hoạt động của enzyme GUS (Peng và ctv 1993)*

1. Các calli được ủ trong 400 µl dung dịch GUS và 100µl supernatant thêm vào 1ml của 1mM 4 methyl umbelliferyl- β -D glucuronide (4-MUG) trong dung dịch ly trích, và ủ qua đêm với nhiệt độ 37°C
2. 200µl aliquots của phản ứng được trộn với 1ml 0,2M $Na_2CO_3$.
3. Phát hiện huỳnh quang fluorescence trong dung dịch MUG
4. Phản ứng phát hiện trên UV

***Chọn cây ổn định***

1. Ba ngày sau bắn gen, mẫu được chuyển vào môi trường NBM chứa 10mg/l của PPT và ủ trong tối 25°C trong ba tuần
2. Mẫu được bắn gen sẽ cắt thành nhiều mảnh nhỏ và chuyển sang môi trường tươi (6 tuần sau khi bắn) và lần thứ ba (9 tuần sau khi bắn).
3. Và thời kỳ thứ ba chọn lọc với 10mg/L PPT.

Thời kỳ chọn lọc cần phải thử với hoạt động của β -D glucuronidase

*Hóa chất cho GUS hoạt động*

XGluc Buffer

100mM Na phosphate

10mM EDTA

1mM X Gluc

1% triton X 100, thêm nước cất

Môi trường

***Môi trường NBS***

| | |
|---|---|
| N6 macronutrients (20X) | 50ml/L |
| B 5 micronutrients (100x) | 10ml/L |
| B5 vitamins (100x) | 10ml/L |
| Fe: EDTA (100x) | 10ml/L |
| 2,4 D (0,1 mg/ml) | 20ml/L |
| Sucrose | 30g/L |
| Proline | 500mg/L |
| Glutamine | 500mg/L |
| Casein Enzymatic Hydrolysate | 500mg/L |
| pH | 5,8 |
| Phytagel | 2,5g/L |

*NBM cho callus*

| | |
|---|---|
| N6 macronutrients (20X) | 50ml/L |
| B 5 micronutrients (100x) | 10ml/L |
| B5 vitamins (100x) | 10ml/L |
| Fe: EDTA (100x) | 10ml/L |
| 2,4 D (0,1 mg/ml) | 20ml/L |
| Maltose | 20ml/L |
| Proline | 30mg/L |
| Glutamine | 500mg/L |
| Casein Enzymatic Hydrolysate | 300mg/L |
| pH | 5,8 |
| Phytagel | 2,5g/L |

*NBS cho bắn gen*

| | |
|---|---|
| N6 macronutrients (20X) | 50ml/L |
| B5 micronutrients (100x) | 10ml/L |
| B5 vitamins (100x) | 10ml/L |
| Fe: EDTA (100x) | 10ml/L |
| 2,4 D (0,1 mg/ml) | 20ml/L |
| Sucrose | 30g/l |
| Proline | 500mg/l |
| Glutamine | 500mg/L |
| Casein Enzymatic | 300mg/L |
| Sorbitol (0,2M) | 36,44g/l |
| pH | 5,8 |
| Phytagel | 2,5g |

***Môi trường MS cho cây tái sinh*** ** Chú ý MS và vitamine giống như công thức của Murasige and Skoog .1962)

| | |
|---|---|
| MS muối | 4,33g/l |
| MS/N6 vitamine (100x) | 10ml/l |
| Tryphan (1g/l) | 50ml |
| Sucrose | 30g/l |
| Kinetin | 2,5mg/l |
| NAA | 1ml/l |
| pH = 5,7 | |
| Agarose | 6g/l |

***Môi trường MS cho Rễ*** **Chú ý MS và vitamine giống như công thức của Murashige and Skoog.1962)

| | |
|---|---|
| MS muối | 4,33g/l |
| MS/N6 vitamine(100x) | 10ml/l |
| Tryphan(1g/l) | 50ml |
| Sucrose | 30g/l |
| pH = 5,7 | |
| Agarose | 6g/l |

***Môi trường cấy tế bào D2***

| | |
|---|---|
| N6 nutrient (20x)i | 50ml/l |
| MS/N6 vitamine (100x) | 10ml/l |
| Fe: ETAD | 10ml/l |
| Sucrose | 30g/l |
| Tryptophan (1g/l) | 50ml/l |
| Proline | 2,3g/l |
| 2,4 D (0,1mg/ml) | 20ml/l |
| pH = 5,7 | |

***Môi trường AA***

| | |
|---|---|
| $CaCl_2$ $2H_2O$ | 10ml/L |
| $KH_2PO_4$ (100x) | 10ml/L |
| $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 10ml/L |
| AA micronutrients | 10ml/L |
| AA vitamine | 10ml/L |
| Fe: EDTA | 10ml/L |
| KCl | 10ml/L |
| Sucrose | 2,9g/L |
| GA 3 (o,1mg/ml) | 1ml/L |
| Kinetin | 1ml/L |
| 2,4 D | 2ml/L |
| pH | 5,8 |

Chú ý tất cả môi trường đều tiệt trùng trước khi sử dụng

Các dung dịch chuẩn bị

N6 macronutrients/ 1 lít Bao gồm:

56,6 g $KNO_3$

9,26 g $(NH_4)_2$ $SO_4$

8,g $KH_2PO_4$

3,7 g $MgSO_4$ 7 $H_2O$

3,3 g $CaCl_2$ 2 $H_2O$

B5 micronutrients/ 1lit

1000mg $MnSO_4$ $4H_2O$

200mg $ZnSO_4$ 7 $H_2O$

75mg KI

25mg $Na_2MoO_2$ $2H_2$

300 mg $H_3BO_3$

2,5 mg $CuSO_4$ 5 $H_2O$

2,5 mg $CoCl_2$ 6 $H_2O$

B5 vitamin / 1 lít

100mg Nicotinic acid

100mg ThiaminHCl

100mg Pyridoxine HCl

10g Myo inositol

N6 nutrients / 1 lít

56,6g $KNO_3$

9,26g $(NH_4)_2$ $SO_4$

8,0g $KH_2PO_4$

3,7g $MgSO_4$ 7 $H_2O$

3,3 g $CaCl_2$ $2H_2O$

60mg $MnSO_4$ $H_2O$

30mg $ZnSO_4$, $7H_2O$

32 mg $H_3BO_3$

16 mg KI

MS/N 6 vitamin (1lít)

50mg Nicotinic acid

10mg Thiamine HCl

50mg Pyridoxine HCl

200mg Glycine

10g Myo – inositol

Fe: EDTA

2,7 g $Na_2$ EDTA

2,8 g $FeSO_4$ $7H_2O$

Tryto phan (1lit) 1g

$CaCl_2$ $2H_2O$ cân (44g/ lit)

$KH_2PO_4$ (100x) 1 lít =17 g $KH_2$ $PO_4$

$MgSO_4$ $7H_2O$ (100x) 1 lít = 37 g $MgSO_4$ $7H_2O$

AA micronutrients (100x) 500ml bao gồm

846mg Mn $SO_4$ $H_2O$

430mg $ZnSO_4$ 7 $H_2O$

310mg $H_3BO_3$

12,5 ml $CuSO_4$ $5H_2O$

41,5mg KI

AA vitamin (100x) với 500ml

50mg nicotinic acid

50mg thiamine HCl

10mg pyridoxine HCl

10g myoisositol

AA amino acid (20x) cho 500ml

8,85g glutamine

2,28 g arginine

750 mg glycine

2,66g aspartic acid

| | |
|---|---|
| KI 100ml bằng | 10mg/lit |
| $CoCl_2$ (0,1g/l) | 100ml bằng 10mg $CoCl_2$ 6 $H_2O$ |
| GA 3 | 50ml 95% cồn 5mg |
| Kinetine (0,1g/l ) | 10ml bằng 10mg kinetine (hòa trong 1N HCl) |
| 2,4 D 9 (0,1g/l) | 100mg 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid hòa trong 5ml NaOH |
| NAA (0,1g/l) | 200ml 20mg napthalene |

**56.4. Ứng dụng**

Nhiều công trình nghiên cứu chuyển nạp gen thông qua bắn gen để cải tạo cây trồng, chuyển trực tiếp vào tế bào các cây như : củ hành (Klein và ctv 1987) bắp (Klein và ctv 1988) lúa, đậu nành (Wang và ctv 1988) và nhiều cây trồng khác.

**Tài liệu tham khảo**

Bùi chí Bửu và Nguyễn thị Lang 2000. Di truyền phân tử, Chuyển nạp gen, Nhà xuất bản Nông Nghiệp 224 trang

Klein, T.M., E.D. wolf, R. Wu and J.C. sanford. 1987. High velocity microprojectiles for delivering of nucleic acid into living cell. nature 327:70-73

Klein, t.m., T. gradziel, M.E. Fromm and J.C.Sanford.1988b. Facors influencing gene delivery into Zea mays cells by high velocity microprojectiles. Bio/ technol 6: 559-563

Peng, J., F. Wen and TK. Hodges. 1993. a rapid method for qualitative assay of both neomycin phosphotransferase II and β -D glucuronide activities in transgenic plants . plant Mol Biol rep 11; 38-47.

Wang, Y.C., T.M Kein, M.E.fromm, J.Cao, J.C.sanford and R.Wu. 1988. Transformed fertile barley plants. Plants physiol 104:37-48

# 57. β-GLUCURONIDASE (GUS) DÙNG XÉT NGHIỆM BIỂU HIỆN TRÊN CÂY CHUYỂN GEN

**57.1. Giới thiệu**

Gen chỉ thị thường dùng GUS, nguồn gốc của gen GUS được phân lập từ E.coli và dùng để đánh dấu sự biểu hiện của cây chuyển gen (Data, 1997). Mô sẹo và cây kháng hygromycin được thử nghiệm biểu hiện GUS có màu xanh dương.

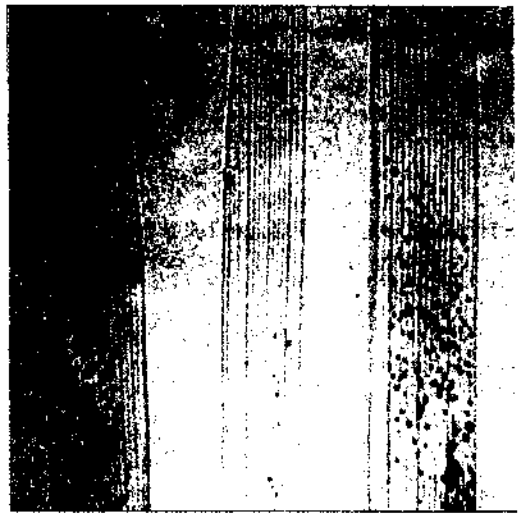
**57.2. Phương pháp**

1. Chuẩn bị dung dịch GUS
2. Ủ mẫu trong môi trường nhiệt độ 37°C trong 24 giờ
3. Đếm số mẫu biểu hiện màu xanh dương trên cây

**57.3. Dung dịch GUS**

| Thành phần | Số lượng |
|---|---|
| X- gluc (mg) | 88.9mg |
| Chloramphenicol | 10.0mg |
| $NaH_2PO_4$ (1.0M) | 5.0ml |
| Triton X (10%) | 1.0ml |
| Methanol | 20,0% |
| pH | 7,0-8,0 |

Kết quả thể hiện GUS trên cây chuyển gen (hình 57.1)



*Hình 57.1 : Thể hiện GUS trên cây lúa chuyển gen*

A: có *gen Pi-ta* , B: gen *Pi –ta* và avirulent *AVR –Pita* và C: Pi-ta và virulent *avr pita*

## Tài liệu tham khảo

Datta, S K., Lina B. Torrizo, Jumin Tu, Norman P. Oliva K. Datta. 1997. Production and molecular evaluation of transgenic rice plants. IRRI, paper 42.

# 58. THỬ NGHIỆM HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE

## 58.1. Giới thiệu

Sự phát triển cây chuyển gen thể hiện thông qua marker chọn lọc, một trong những marker được chọn lọc là hygromycin phosphotransferas (HPT) của vi khuẩn. Enzyme này kháng với kháng sinh hygromycin-B. Mà kháng sinh Hygromycin-B là một kháng sinh aminocyclitol được sản xuất từ *Streptomyces hygroscopicus*. Chúng ngăn cản sự tổng hợp protein cả hai tế bào prokaryotes và eukaryotes (Datta và ctv 1997).

## 58.2. Phương pháp

Ly trích vật liệu

1. Chuẩn bị vật liệu (lá / callus 100mg)
2. Nghiền trong nitơ lỏng
3. Thêm buffer 100µl/100 mg mô
4. Trộn đều, ly tâm trong 5 phút
5. Chuyển supernatant vào trong ống nghiệm mới, ly tâm 30 giây
6. Chuyển supernatant sang ống nghiệm mới và đặt trong đá

Biểu hiện

1. Thêm vào phản ứng trộn đều : 1,0 µl buffer (10X), 0,5 ul ATP (1,0mM), 0,4 ul γ ATP, 2,5 µl hygromicin, và 5,6 µl ly trích
2. Tức khắc trộn γ ATP, ủ 37°C trong 30 phút
3. Nhỏ 1 µl cho phản ứng và trộn trên khay
4. Chuyển khay trong chromatography chứa 50mM Na formate, pH 5,4, giữ thẳng cho tới khi thấm dung dịch
5. Giữ trong 50 phút
6. Phơi khô và phát triển X -ray trong 3 giờ qua đêm

## 58.3. Hóa chất

***HPT buffer***

| Thành phần | Nồng độ |
|---|---|
| 0,05M Tris HCl | 50ml |
| pH 7,0 | |
| 10% glycerol | 100ml |

*Assay buffer*

| Thành phần | Liều lượng |
|---|---|
| 0,5M Tris -maleate | 500ml |
| pH 7,0 | |
| 0,5M $MgCl_2$ | 500ml |

Kết quả hình 58.1 biểu hiện HPT trên cây chuyển gen


*Hình 58.1: Biểu hiện HPT trên cây chuyển gen (Datta 1990)*

**Tài liệu tham khảo**

Datta SK, Peterhans, A. Datta K, Potrykus I. 1990. Genetically engineered fertile. Indica -rice recovered from protoplasts. Bio/ technology 8: 736-740

Datta, S K., Lina B. Torrizo, Jumin Tu, Norman P. Oliva K. Datta. 1997. Production and molecular evaluation of transgenic rice plants. IRRI, paper 42

*Phương pháp cơ bản*

**Trong Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học**

*Chịu trách nhiệm xuất bản :*

**LÊ VĂN THỊNH**

*Biên tập :* **NGUYỄN PHỤNG THOẠI**

*Sửa bài :* **NGUYỄN PHỤNG THOẠI**
**NGUYỄN THỊ LANG**

*Chế bản :* **MẠNH TRUNG**

*Bìa :* **ANH VŨ**

**NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP**
*D14 - Phương Mai - Đống Đa - Hà Nội*
*ĐT : (04) 8523887 - 8521940 - 5760656*

***CHI NHÁNH NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP***
*58 Nguyễn Bỉnh Khiêm - Q.1 - TP.HCM*
*ĐT : (08) 8297157 - 8299521*

---

In 530 cuốn, khổ 19 x 27cm tại Cty In Bao bì & Xuất nhập khẩu tổng hợp
Giấy chấp nhận đề tài số : 1773/XB-QLXB do Cục Xuất bản cấp ngày 24/12/2001
In xong và nộp lưu chiểu Quí 4/2002

5 - 57.023 / NN - 02 - 220/1773 - 01

GIÁ: 60