



TÓM TẮT

- 1.1 Cấu trúc của DNA
- 1.2 Quá trình sao chép DNA
- 1.3 Giải mã thông tin di truyền: RNA (phiên mã) và protein (dịch mã)
- 1.4 Điều hoà phiên mã ở sinh vật nhân sơ
- 1.5 Điều hoà phiên mã ở sinh vật nhân chuẩn

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

45

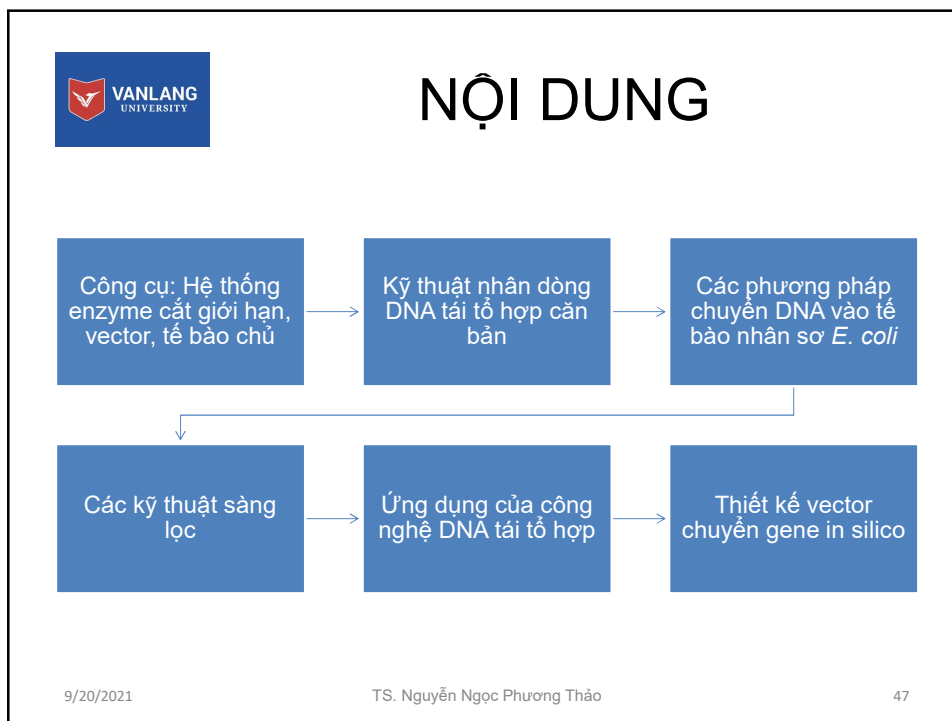
45



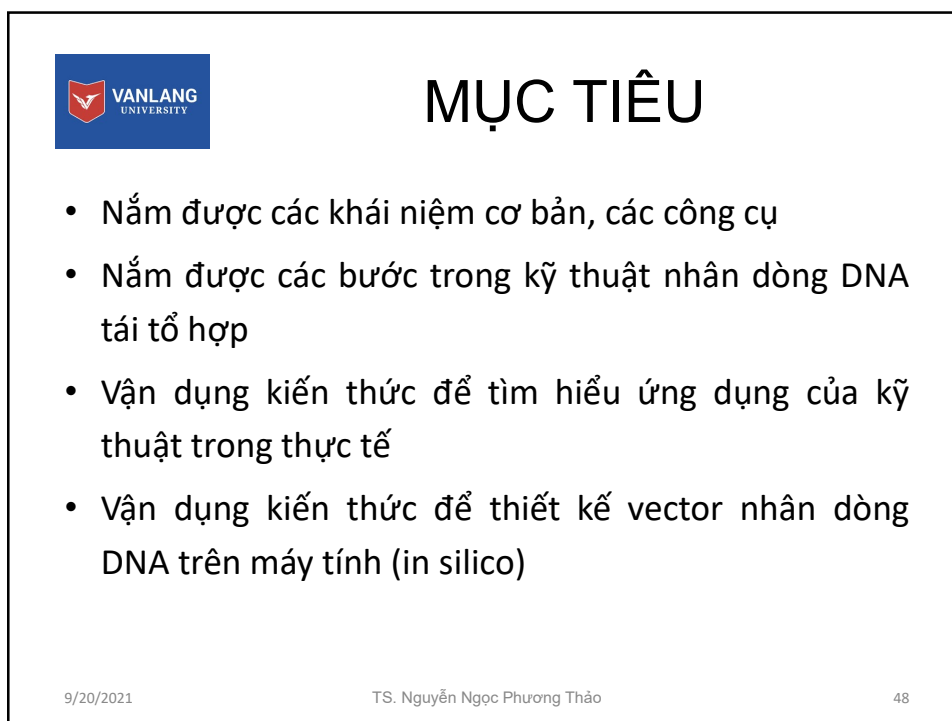
CHƯƠNG 2: CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

NGUYỄN NGỌC PHƯƠNG THẢO
Thao.nnp@vlu.edu.vn

46



47



48



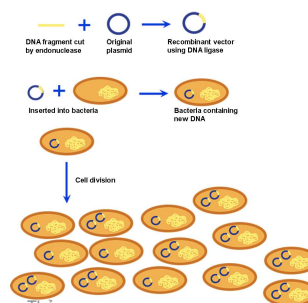
CÁC THUẬT NGỮ

- DNA tái tổ hợp (recombinant DNA): DNA của loài A được chuyển cho loài B
- Nhân dòng (cloning): tạo ra nhiều bản sao



9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

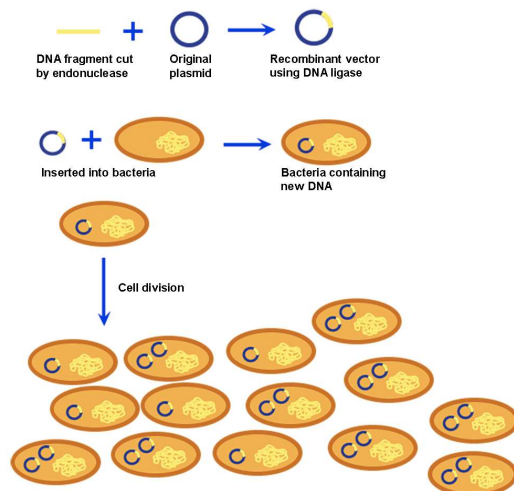


49

49



Nhân dòng DNA



Để làm gì?

- Lưu trữ
- Phân tích
- Biểu hiện protein

...

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

50

50



CÁC CÔNG CỤ SỬ DỤNG

- Enzyme:
 - Sao chép: DNA polymerase
 - Cắt giới hạn (Restriction enzyme)
 - Nối DNA (T4 DNA ligase)
 - Thay đổi đầu DNA: dephosphorylation bằng alkaline phosphatase
- Plasmid nhân dòng cơ bản trong *E. coli*: pBR233, pUC18
- Tế bào chủ:
 - Prokaryotes: *E. coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas*
 - Eukaryotes: *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *P. pastoris*, *Chlamydomonas rehardtii*

9/20/2021

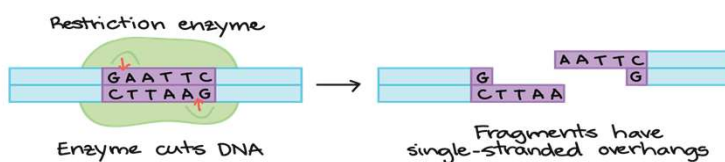
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

51

51



ENZYME CẮT GIỚI HẠN (RESTRICTION ENDONUCLEASE – RE)



(a) *HaeIII* *PstI* *EcoRI*

(b) 5'-GGCC-3' 5'-CTGCAG-3' 5'-GAATTC-3'

(c) $\begin{array}{c} \text{GGCC} \\ | \\ \text{CCGG} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{CTGCAG} \\ | \\ \text{GACGTC} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{GAATTC} \\ | \\ \text{CTAAG} \end{array}$

(d) Blunt 3'-protruding 5'-protruding

Phản ứng tối ưu:

- lượng enzyme
- lượng DNA
- điều kiện pH (dung dịch đệm)
- nhiệt độ
- thời gian

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

52

52



ENZYME CẮT GIỚI HẠN (RESTRICTION ENDONUCLEASE – RE)

Tra cứu:

<https://nebclover.neb.com/#!/redigest>

Enzyme	Recognition sequence	Cutting sites	Ends
BamHI	5'-GGATCC-3'	G [↓] GATCC CCTAG [↓] G	5'
EcoRI	5'-GAATTC-3'	G [↓] AATTC CTTAA [↓] G	5'
HaeIII	5'-GGCC-3'	G [↓] GCC CC [↓] GG	Blunt
HpaI	5'-GTTAAC-3'	GTT [↓] AAC CAAT [↓] TG	Blunt
PstI	5'-CTGCAG-3'	CTGC [↓] AG G [↓] ACGTC	3'
Sau3A	5'-GATC-3'	G [↓] ATC CTA [↓] G	5'
SmaI	5'-CCCGGG-3'	CCC [↓] GGG GGG [↓] CCC	Blunt
SstI	5'-GAGCTC-3'	GAGCT [↓] C CTCGA [↓] G	3'
XmaI	5'-CCCGGG-3'	CCC [↓] GGG GGGCC [↓] C	5'

9/20/2021

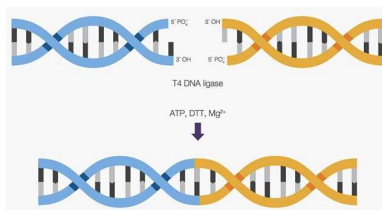
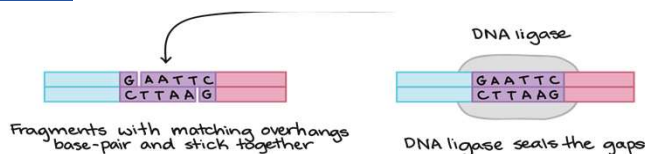
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

53

53



T4 DNA LIGASE



- Keo phân tử
- Hoạt động hiệu quả nhất trên các đầu cố kết (cohesive ends)
- Hoạt động tốt nhất ở 37°C

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

54

54



ENZYMES BIẾN ĐỔI ĐẦU DNA

- Alkaline phosphatase: loại bỏ nhóm phosphate ở đầu 5'
- T4 polynucleotide kinase: thêm nhóm phosphate vào đầu 5'
- Enzyme cắt tạo đầu bằng

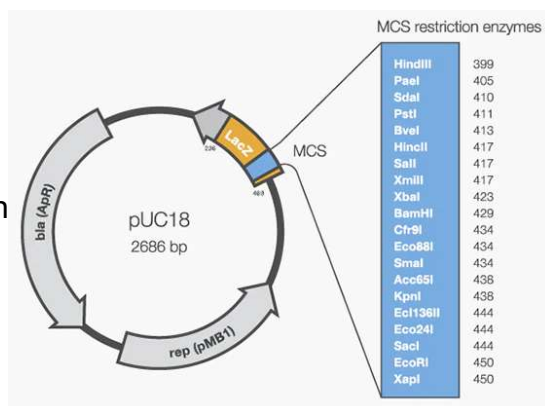


55



ĐẶC ĐIỂM CỦA VECTOR

- Kích thước nhỏ
- Có replication origin tương thích với host
- Có marker sàng lọc: các gene kháng kháng sinh
- Có các RE sites



9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

56

56



ĐẶC ĐIỂM KHÁC

- Liên hợp (conjugative) vùng *tra* và *mob* được chuyển qua tế bào khác thông qua quá trình tiếp hợp
- Không liên hợp (non-conjugative)
- Số bản sao (copy number):
 - Thấp (vài copies/chromosome): quá trình sao chép được kiểm soát với sự sao chép của gDNA tế bào chủ
 - Cao (>10 copies/chromosome)

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

57

57



SỐ BẢN SAO CỦA MỘT SỐ PLASMID

Common Vectors	Copy Number	ORI
pUC	~500-700	pMB1 (derivative)
pBR322	~15-20	pMB1
pET	~15-20	pBR322
pGEX	~15-20	pBR322
pColE1	~15-20	ColE1
pR6K	~15-20	R6K
pACYC	~10	p15A
pSC101	~5	pSC101
pBluescript	~300-500	ColE1 (derivative) and F1
pGEM	~300-500	pUC and F1


<https://www.google.com.vn/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fhistogene.co%2Frecombinant-proteininsects-9%2F&psig=AOvVaw2tlmGwF652bOuiGdDOTZ53&ust=1601456071594000&source=images&cd=vfe&ved=OCAOQjhqFwoTCOj04PFjewCFQAAAAAdAAAAABAL>

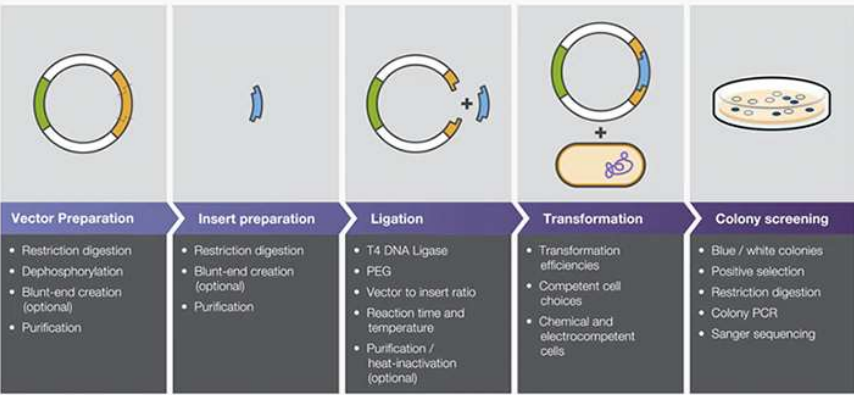
9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

58

58

 **CÁC BƯỚC CƠ BẢN TRONG TẠO DÒNG PHÂN TỬ DNA**




Vector Preparation	Insert preparation	Ligation	Transformation	Colony screening
<ul style="list-style-type: none"> Restriction digestion Dephosphorylation Blunt-end creation (optional) Purification 	<ul style="list-style-type: none"> Restriction digestion Blunt-end creation (optional) Purification 	<ul style="list-style-type: none"> T4 DNA Ligase PEG Vector to insert ratio Reaction time and temperature Purification / heat-inactivation (optional) 	<ul style="list-style-type: none"> Transformation efficiencies Competent cell choices Chemical and electrocompetent cells 	<ul style="list-style-type: none"> Blue / white colonies Positive selection Restriction digestion Colony PCR Sanger sequencing

<https://www.thermofisher.com/vn/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/cloning/traditional-cloning-basics.html>

9/20/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo 59

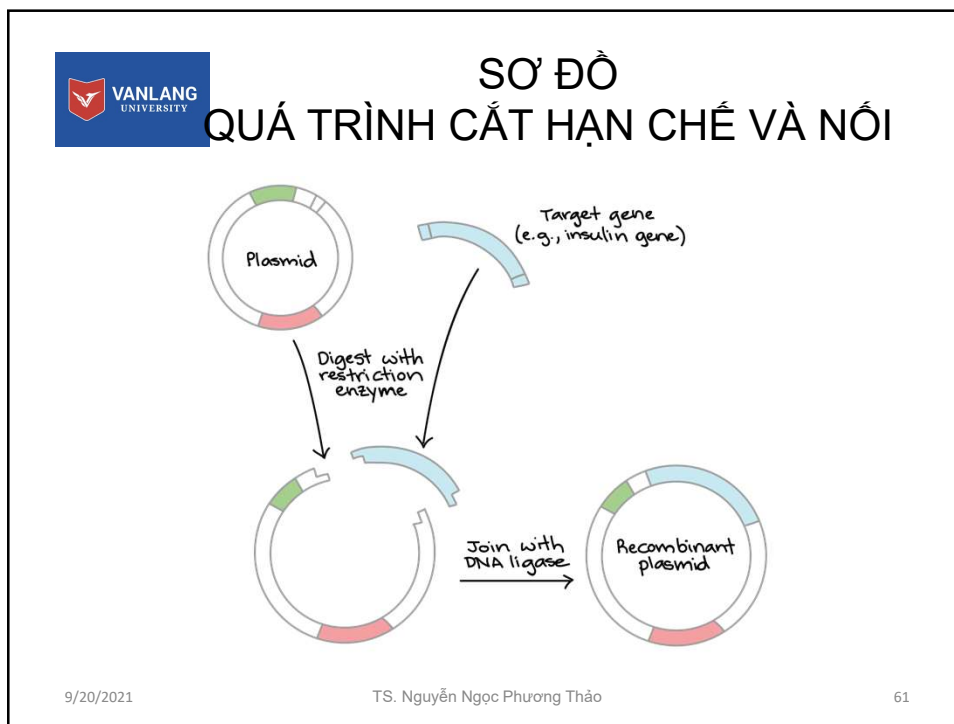
59

 **CÁC BƯỚC CƠ BẢN TRONG TẠO DÒNG PHÂN TỬ DNA**

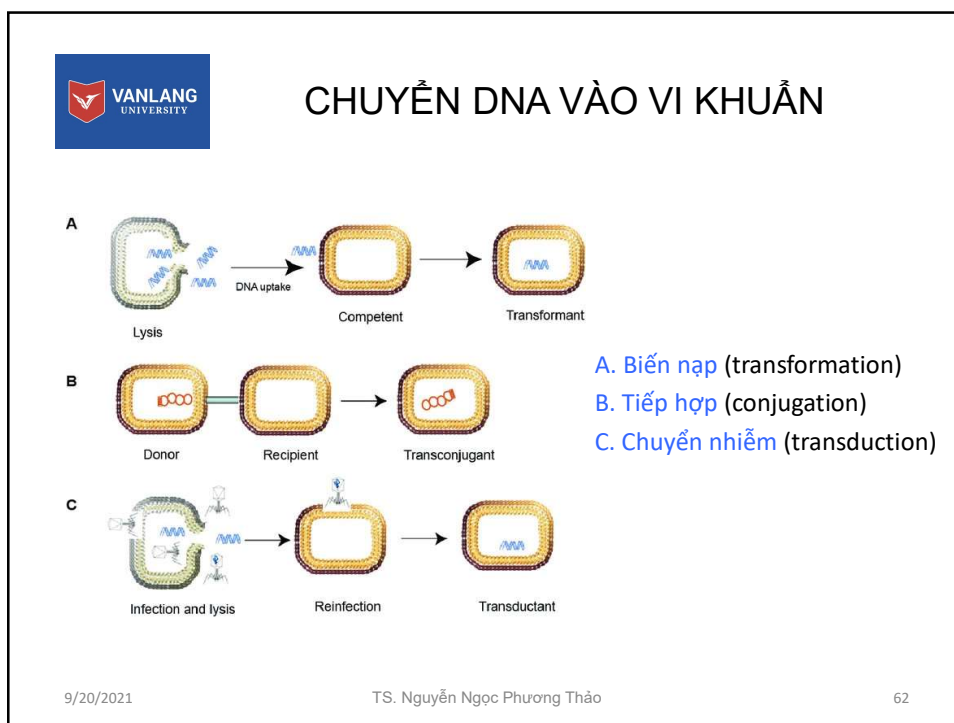
- Chuẩn bị gene nguồn (insert): tách, cắt
- Chuẩn bị plasmid: tách, cắt
- Dán insert vào plasmid
- Biến nạp tổ hợp trên vào tế bào chủ
- Sàng lọc tế bào chứa plasmid mục tiêu

9/20/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo 60

60



61



62

VANLANG UNIVERSITY

BIẾN NẠP

- **Biến nạp** (transformation): bằng **sốc nhiệt** (heat shock) hoặc **xung điện** (electroporation), Tế bào **khả biến** (competent cell), Chỉ một số ít tế bào nhận thành công plasmid: transformants

9/20/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo 63

63

VANLANG UNIVERSITY

BIẾN NẠP bằng sốc nhiệt

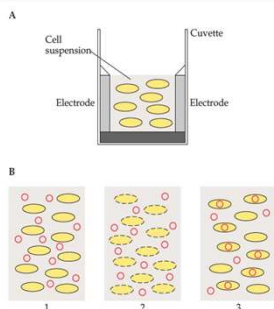
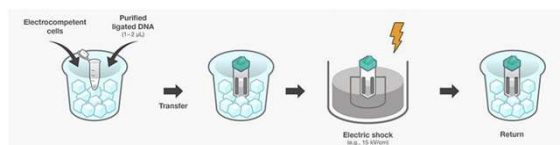
- Tế bào khả biến: tế bào mid-log xử lý với CaCl_2 lạnh
- Cho tiếp xúc nhiệt độ cao 42°C
- Tần số biến nạp 10^{-3}
- Hiệu suất: 10^6 - 10^7 khuẩn lạc/ μg DNA

9/20/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo 64

64



Chuyển DNA vào vi khuẩn bằng xung điện (electroporation)



- Electroporation
- Vi khuẩn + DNA đặt vào điện trường cao áp
- Hiệu suất 10^9 transformants/ μ g DNA đối với plasmid nhỏ (3kb), 10^6 đối với plasmid lớn (136 kb)

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

65

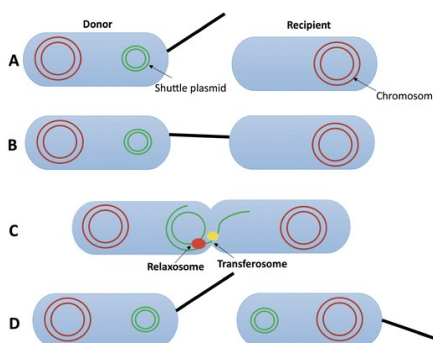
https://moodle2.units.it/pluginfile.php/327420/mod_resource/content/0/TEC_CELL_SCHEDA_07_bacteria%20transformation.pdf

65



Chuyển DNA vào vi khuẩn bằng phương pháp tiếp hợp (conjugation)

- Chuyển DNA giữa các tế bào bằng cách:
 - Tiếp xúc tế bào với tế bào
 - Thông qua kênh (pilus)
- Một số plasmid có khả năng tự chuyển nhiễm (self-transmissible): chứa các *tra* genes (hỗ trợ DNA transfer, replication và mating pair formation)



9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

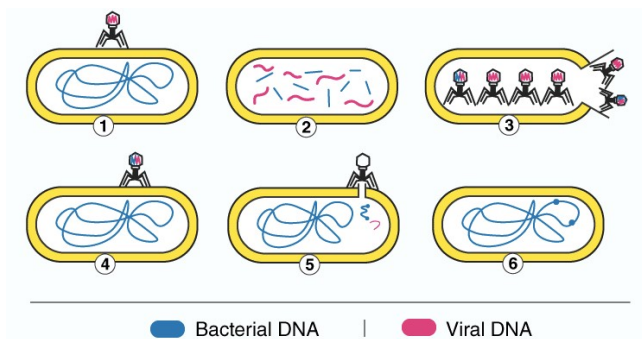
66

66



Chuyển DNA vào vi khuẩn bằng chuyển nhiễm (transfection)

- Chuyển đoạn gene nhờ vào bacteriophage



9/20/2021

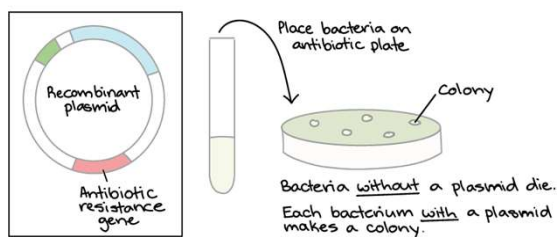
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

67

67



SÀNG LỌC TẾ BÀO CHỨA PLASMID MỤC TIÊU



- Marker sàng lọc (gene kháng thuốc kháng sinh) -> khuẩn lạc tiềm năng đúng
- Tiến hành kiểm tra DNA trong khuẩn lạc tiềm năng: PCR, tách plasmid và phân huỷ bằng RE

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

68

68

VANLANG UNIVERSITY

CÁC MARKER SÀNG LỌC

The diagram shows two plasmids: pUC18 (2686 bp) and pBR322 (4361 bp). pUC18 features a Multiple Cloning Site (MCS) with various restriction enzyme sites. pBR322 includes antibiotic resistance genes (amp, tet) and an origin of replication (ori).

MCS restriction enzymes	
HindIII	399
PaeI	405
SacI	410
PstI	411
BglII	413
HincII	417
Sall	417
XbaI	417
XbaI	423
BamHI	429
CriI	434
EcoRI	434
SmaI	434
Acc65I	438
KpnI	438
Ecl136II	444
Eco45I	444
SspI	444
EcoRI	450
XbaI	450

9/20/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo 69

69

VANLANG UNIVERSITY

BIỂU HIỆN PROTEIN

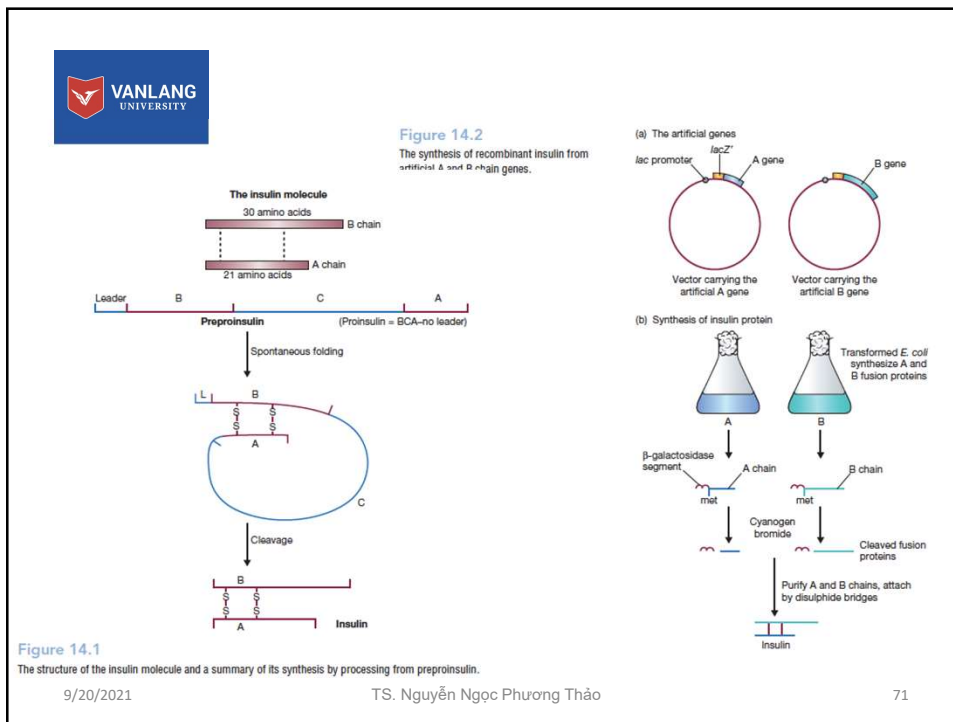
The diagram illustrates the process of protein expression in bacteria. It starts with a colony being grown into a large culture. Bacteria are then induced to express the gene. The gene is transcribed into mRNA, which is then translated into protein (e.g., insulin).

- Colony is grown into large culture
- Bacteria are induced to express gene
- Gene is transcribed into mRNA
- mRNA is translated into protein (e.g., insulin)

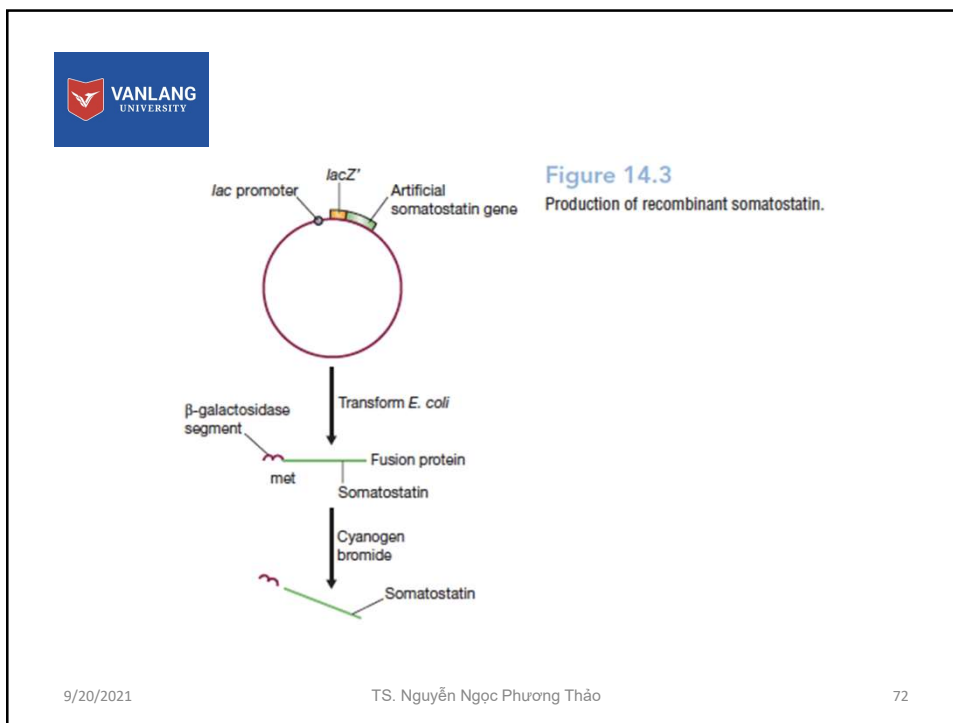
- Khuẩn lạc chứa plasmid biểu hiện protein có thể tiếp tục được nuôi cấy, trên môi trường cảm ứng sản xuất protein đích. Protein được thu, làm sạch và sử dụng.

9/20/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo 70

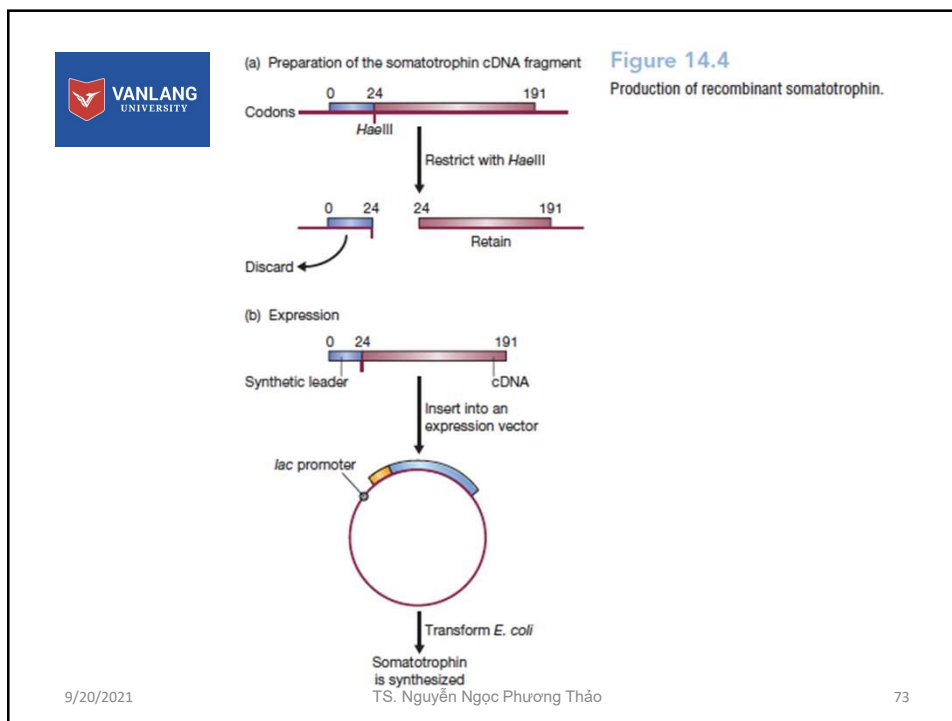
70



71



72



73

VANLANG UNIVERSITY

ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

Thảo luận: ứng dụng công nghệ dna tái tổ hợp trong công nghệ sinh học

Mỗi bạn hãy tìm ví dụ sử dụng công cụ nhân dòng DNA/protein tái tổ hợp và trình bày trong phần thảo luận.

Những nội dung sau đây phải được trình bày:

1. Tên gene/protein, chức năng của nó là gì? (25% điểm)
2. Loại plasmid sử dụng? (25% điểm)
3. Loại tế bào chủ sử dụng? (25% điểm)
4. Đưa link tài liệu tham khảo (25% điểm)

LƯU Ý: BẠN POST SAU KHÔNG ĐƯỢC NẾU LẠI VÍ DỤ CỦA BẠN ĐÃ POST TRƯỚC ĐÓ

9/20/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo 74

74



MỘT SỐ HỆ THỐNG KÝ CHỦ CHO SẢN XUẤT PROTEIN TÁI TỔ HỢP

- Bằng vi sinh vật: vi khuẩn, tảo, nấm men
- Bằng thực vật: protein ở thân, lá, rễ, hạt
- Trong sữa của vật nuôi
- Bằng tế bào của côn trùng

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

75

75



TRONG Y DƯỢC

1. Sản xuất:

- Kháng sinh
- Insulin
- Hormon tăng trưởng người: somatotrophin, somatostatin
- Human factor VIII
- Interferons, interleukins
- Albumin
- Kháng nguyên -> vaccine
- Kháng thể

2. Phân tích: gene ⇔ bệnh

3. Liệu pháp gene và ung thư

Table 14.1

Some of the human proteins that have been synthesized from genes cloned in bacteria and/or eukaryotic cells or by pharming.

PROTEIN	USED IN THE TREATMENT OF
α_1 -Antitrypsin	Emphysema
Deoxyribonuclease	Cystic fibrosis
Epidermal growth factor	Ulcers
Erythropoietin	Anaemia
Factor IX	Christmas disease
Factor VIII	Haemophilia
Fibroblast growth factor	Ulcers
Follicle-stimulating hormone	Infertility treatment
Granulocyte colony-stimulating factor	Cancers
Insulin	Diabetes
Insulin-like growth factor 1	Growth disorders
Interferon- β	Cancers, AIDS
Interferon- γ	Cancers, rheumatoid arthritis
Interferon- α	Leukaemia and other cancers
Interleukins	Cancers, immune disorders
Lung surfactant protein	Respiratory distress
Relaxin	Used to aid childbirth
Serum albumin	Used as a plasma supplement
Somatostatin	Growth disorders
Somatotrophin	Growth disorders
Superoxide dismutase	Free radical damage in kidney transplants
Tissue plasminogen activator	Heart attack
Tumour necrosis factor	Cancers

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

76

76



VANLANG
UNIVERSITY


TRONG NÔNG NGHIỆP

Examples of gene addition projects with plants.

GENE FOR	SOURCE ORGANISM
Insect resistance	
δ-Endotoxin	<i>B. thuringiensis</i>
Protease inhibitors	Various legumes
Fungal resistance	
Chitinase	Rice
Glucanase	Alfalfa
Ribosome-inactivating protein	Barley
Bacterial resistance	
Ominithine carbamyltransferase	<i>Pseudomonas syringae</i>
Virus resistance	
2'-5'-Oligoadenylate synthetase	Rat
RNA polymerase, helicase	Potato leafroll tospovirus
Satellite RNAs	Various viruses
Virus coat proteins	Various viruses
Herbicide tolerance	
Acetolactate synthase	<i>Nicotiana tabacum</i>
Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	<i>Agrobacterium</i> spp.
Glyphosate oxidoreductase	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
Glyphosate N-acetyltransferase	<i>B. ichangensis</i>
Nitrilase	<i>Klebsiella ozonae</i>
Phosphinothricin acetyltransferase	<i>Streptomyces</i> spp.
Drought tolerance	
Acyl-coenzyme A binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Dehydration-responsive element-binding protein	Soybean
Phosphatidylinositol-specific phospholipase C	Maize
Vacuolar pyrophosphatase	<i>A. thaliana</i>
Improved nutritional quality	
Acyl carrier protein thioesterase (fat/oil content)	<i>Umbellularia californica</i>
Carotene desaturase (β-carotene content)	<i>Pantoea ananatis</i>
Dehydroascorbate reductase (ascorbate content)	Rice
Delta-12 desaturase (fat/oil content)	<i>Glycine max</i>
Deoxyxylulose-5-phosphate synthase (β-carotene content)	<i>A. thaliana</i>
FEA1 metal transporter (iron content)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
GTP cyclohydrolase (folate content)	<i>Escherichia coli</i>
Methionine-rich protein (sulphur content)	Brazil nuts
Monellin, brazumatin (sweetness)	<i>Thaumatococcus daniellii</i>
Phytoene synthase (β-carotene content)	<i>Pantoea agglomerans</i>
Sporozoa (protein content)	Maize and sweet potato
Male sterility	
Barnase ribonuclease inhibitor	<i>Bacillus amyloquelificans</i>
DNA adenine methylase	<i>E. coli</i>
Fruit ripening	
S-Adenosylmethionine hydrolase	Bacteriophage T3
L-Aminoacylpropanoate-1-carboxylase and thiaminase	Various

9/20/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo
77

77



VANLANG
UNIVERSITY

TRONG CÔNG NGHIỆP

- Sản xuất các chất chuyển hoá: amino acids, vitamins, alcohols, carotenoids, riboflavin, acid butyric
- Kháng sinh, thuốc trừ sâu, các chất tạo màu, chất tăng trưởng cho cây, vật nuôi
- Enzyme tẩy rửa: lipase, protease, amylase...

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026452/>

9/20/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo
78

78



TUẦN SAU

- Tham gia post thảo luận
- Tiếp tục nội dung: thiết kế vector in silico bằng phần mềm Serial Cloner

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

79

79



THIẾT KẾ VECTOR NHÂN DÒNG (in silico) GENE MÃ HOÁ INSULIN ĐỂ BIỂU HIỆN TRONG *E.* *COLI*

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

80

80



BƯỚC 1: CHUẨN BỊ CƠ SỞ DỮ LIỆU

- Vector nhân dòng: pUC18
- Trình tự gene

Nguồn dữ liệu gene/genome:

- NCBI gene/genome:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Uniprot
<https://www.uniprot.org/>

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

81

81



Chuẩn bị đoạn gene tái tổ hợp

- Tối ưu hoá codon usage cho đoạn gene tái tổ hợp
- Hoá tổng hợp trình tự

CDS (optimized)

```
atggcgctgtggatgcgctgctgccgctgctggcgctgctggcgctgtggggccggatccggcggcggcgtt
tgtgaaccagcatctgtgaggcagccatctggtggaagcgtgtatctggtgtgaggcgaacgggcttttta
taccggaaaacccgcccgaagcgaagatctgagggtggccagggtggaactgggaggcggccggggcg
cgggagcctgagccgctggcgctggaaggcagcctgcagaacggcattgtggaacagtctgacca
gcattgagcctgtatcagctggaactattgcaactag
```

mRNA (original)

```
atggccctgtggatgcgctcctgccctgctggcgctgctggcccttggggaacctgaccagccgagccttt
tgtgaaccaacacctgtgagctcacacctggtggaagctctctacctagtgtgagggaacgaggcttctta
caccccaagaccgcccggaggcagaggacctgagggtggggcagggtggagctgggaggggccctggt
gcaggcagcctgagccctggccctggagggtccctgcagaagcgtggcattgtggaacaatgctgtacca
gcattgctccctaccagctggagaactactgcaactag
```

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

82

82



B2: thiết lập cơ sở dữ liệu vector và đoạn gene mục tiêu trên Serial Cloner

- Import Vector pUC19
- Import đoạn gene

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

83

83



B3: thiết kế đoạn môi PCR để khuếch đại đoạn gene mục tiêu

- Đoạn môi PCR forward, reverse
- Bổ sung các đoạn trình tự enzyme cắt giới hạn lên môi

9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

84

84



B4: cloning trên Serial Cloner

9/20/2021

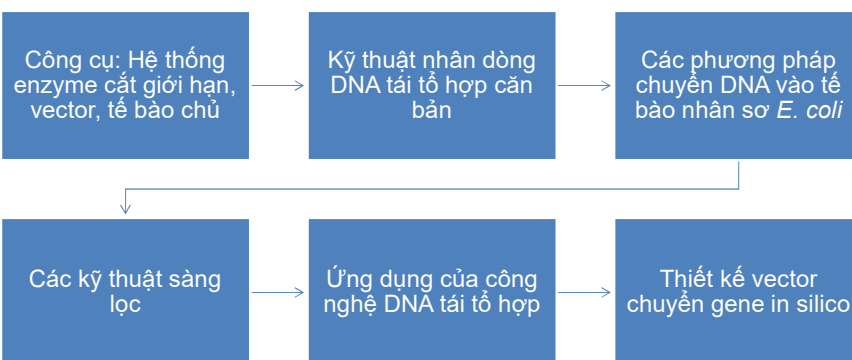
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

85

85



REVIEW



9/20/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

86

86