



CHƯƠNG 3: GIẢI TRÌNH TỰ GENE, BỘ GENE

GV: NGUYỄN NGỌC PHƯƠNG THẢO

87



NỘI DUNG

1. Giải trình tự gene và bộ gene bằng phương pháp Sanger (chain-termination DNA sequencing)
2. Giải trình tự gene và bộ gene bằng phương pháp mới (NGS-next generation sequencing): Illumina
3. Ứng dụng của kỹ thuật giải trình tự DNA

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

88



GIẢI TRÌNH TỰ DNA

- Trình tự chính xác của các nucleotide trên 1 đoạn DNA
- 1990s: whole genome sequencing ở loài nhân thực, nhân sơ
- 1970s: Fred Sanger developed chain termination DNA sequencing
- NGS: rất nhiều phương pháp khác nhau, cho phép giải trình tự cùng lúc hàng triệu đoạn DNA

11/4/2021

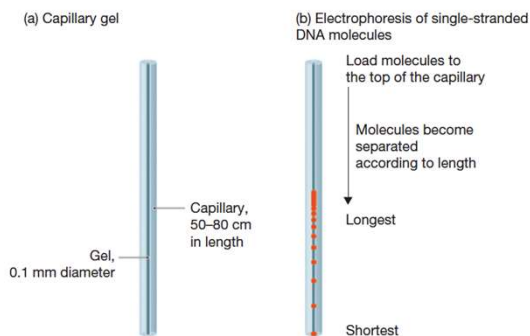
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

89




PHƯƠNG PHÁP SANGER (CHAIN TERMINATION DNA SEQUENCING)

- Nguyên tắc: sự khác nhau về kích thước (đến 1 nucleotide) của các sợi đơn DNA trên gel điện đi polyacrylamide.



Polyacrylamide gel electrophoresis in a capillary system can resolve single-stranded DNA molecules that differ in length by just 11/01 nucleotide. The capillary is typically 50–80 cm in length, with a gel diameter of 0.1 mm.

90

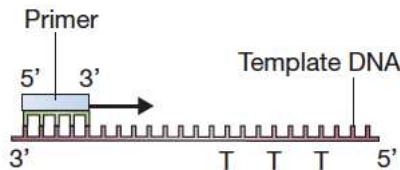


VANLANG UNIVERSITY

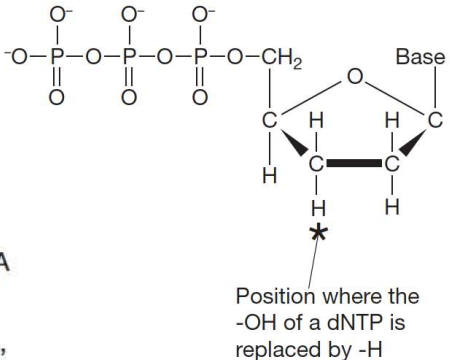
PHƯƠNG PHÁP SANGER

(CHAIN TERMINATION DNA SEQUENCING)

- DNA polymerase
- dNTPs
- Primer (mỗi)
- ddNTPs gắn fluorescent (4 màu)




(b) A dideoxynucleotide



11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

91

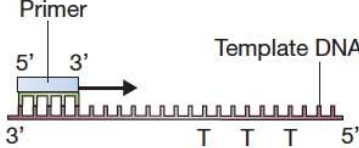


VANLANG UNIVERSITY

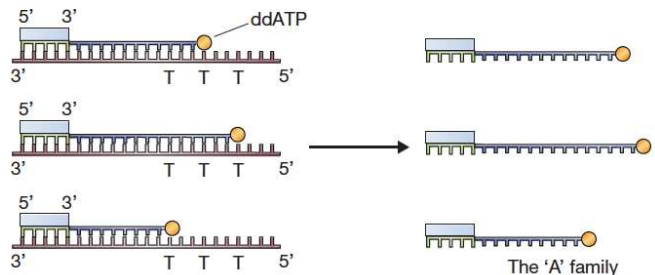
PHƯƠNG PHÁP SANGER

(CHAIN TERMINATION DNA SEQUENCING)

- DNA polymerase
- dNTPs
- Primers (mỗi)
- ddNTPs gắn fluorescent (4 màu)




(c) Strand synthesis terminates when a ddNTP is added



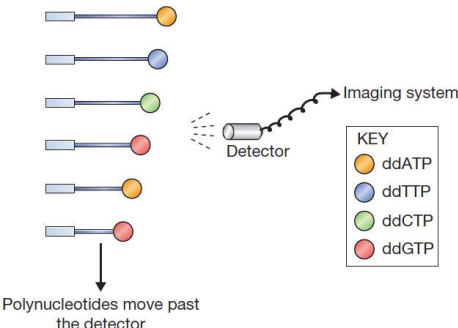
11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

92



PHƯƠNG PHÁP SANGER (CHAIN TERMINATION DNA SEQUENCING)

(a) Detection of chain-terminated polynucleotides



Polynucleotides move past the detector

KEY

- ddATP
- ddTTP
- ddCTP
- ddGTP

(b) The print out from an automated sequencer

CACC

GATCG

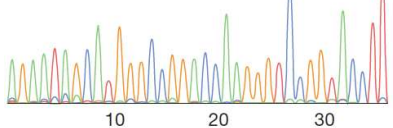
AAATT

AACTT

CCAAAG

TTAAG

CTTGG




10 20 30

Figure 10.3

Reading the sequence generated by a chain-termination experiment. (a) Each dideoxynucleotide is labelled with a different fluorochrome, so the chain-terminated polynucleotides are distinguished as they pass by the detector. (b) An example of a sequence print out.

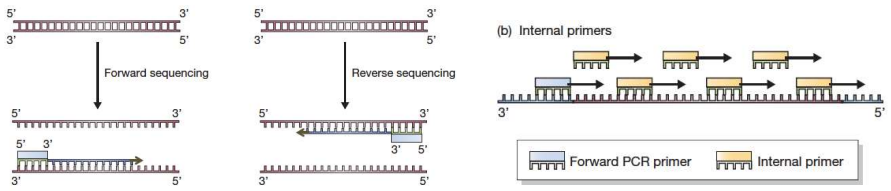
11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

93



SỬ DỤNG DNA POLYMERASE NÀO?

- Klenow polymerase đột biến loại bỏ hoạt tính sửa sai (5'-3' exonuclease)
- Taq DNA polymerase: no exonuclease activity
- Thermo cycle sequencing (PCR): forward primer, reverse primer, internal primer



(a) Forward sequencing: 5' to 3' direction.

(a) Reverse sequencing: 3' to 5' direction.

(b) Internal primers: Forward PCR primer (blue) and Internal primer (orange).

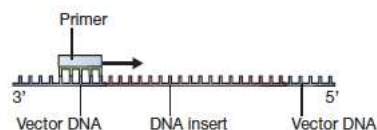
11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

94



GIỚI HẠN CỦA PP SANGER

- Chiều dài đoạn DNA cho tín hiệu tốt 750bp -> sequencing 1 gene, 1 phần của gene là sản phẩm của PCR hoặc cloning



- Để giải trình tự 1 genome thì sao? Chi phí? Thời gian?

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

95



GIỚI HẠN CỦA PP SANGER

Để giải trình tự 1 genome thì sao? Errors thì sao?

Table 10.1


Sizes of representative genomes.

| SPECIES | TYPE OF ORGANISM | GENOME SIZE (Mb) |
|---------------------------------|------------------|------------------|
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | Bacterium | 0.58 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Bacterium | 1.83 |
| <i>Escherichia coli</i> | Bacterium | 4.64 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Yeast | 12.1 |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | Nematode worm | 97 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Insect | 180 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Plant | 125 |
| <i>Homo sapiens</i> | Mammal | 3200 |
| <i>Triticum aestivum</i> | Plant (wheat) | 16 000 |

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

96



HUMAN GENOME SEQUENCING PROJECT

- 1990s
- Genome size 3200 Mbp
- 5 reads cho mỗi base -> cần $3200 \times 5 = 16\,000$ Mb
- Dự án đã có 23 147 Mb nhờ thiết bị tự động hoá: 1 lần chạy cho ra 384 sequences cùng lúc, trong 1 giờ => 7 Mb/ngày

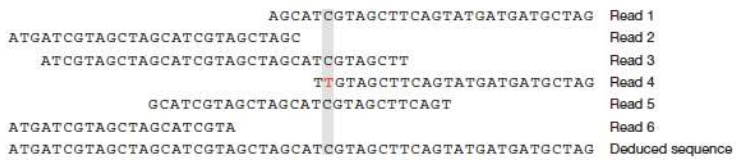



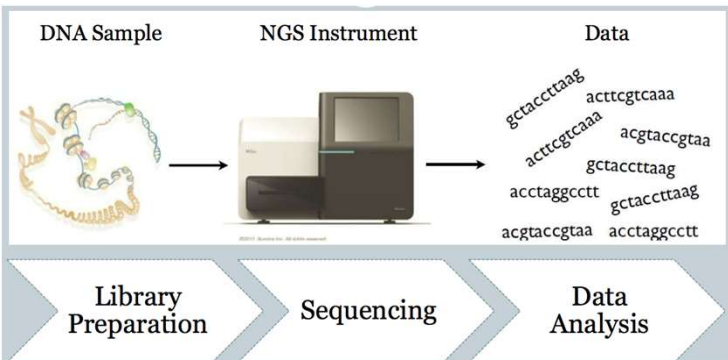
Figure 10.8
 Each region of a genome must be sequenced multiple times, in order to identify errors present in individual sequence reads. In this example, the discrepancy in Read 4 in the highlighted column can be ascribed to a sequencing error, the correct nucleotide at this position being C.

11/4/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

97




NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS- GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI)



11/4/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo
<https://www.slideshare.net/mkim8/a-comparison-of-ngs-platforms>

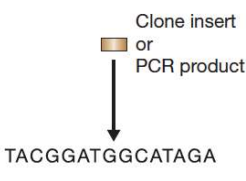
98



NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS-GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI)

- Không cần bước cloning/PCR
- Chỉ cần ly trích toàn bộ genome
- Tạo 1 thư viện hàng triệu sợi DNA được giải trình tự cùng 1 lúc

**Chain-termination
sequencing**

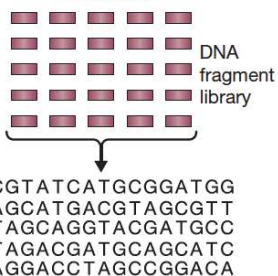


Clone insert
or
PCR product

TACGGATGGCATAGA

One DNA sequence
is obtained.

**Next-generation
sequencing**




DNA
fragment
library

ACGTATCATGCGGATGG
TAGCATGACGTAGCGTT
GTAGCAGGTACGATGCC
GTAGACGATGCAGCATC
TAGGACCTAGCCGGACA

Many DNA fragments
are sequenced

11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

99




CÁC BƯỚC CHUẨN BỊ THƯ VIỆN CHO NGS

1. Ly trích DNA (DNA extraction)
2. Cắt thành các đoạn DNA ngắn theo kích thước phù hợp với từng phương pháp lựa chọn
3. Cố định các đoạn DNA trên một bề mặt rắn
4. Khuếch đại (amplification) các trình tự

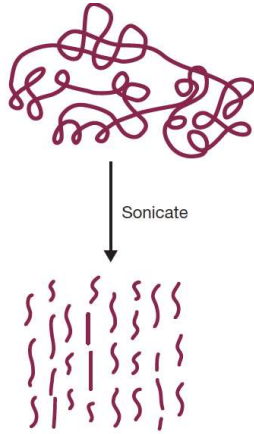
11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

100



VANLANG
UNIVERSITY

2. SÓNG SIÊU ÂM (SONICATION) CẮT ĐỨT DNA NGẪU NHIÊN




Sonicate

- Cắt ngẫu nhiên thành đoạn 100-500 bp
- Tất cả các đoạn được giải trình tự từ các đầu sợi.

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

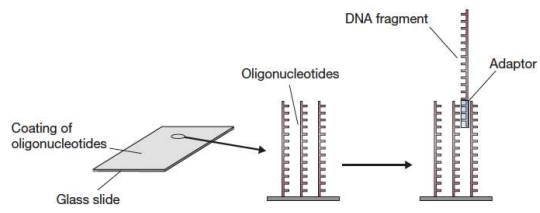
101



VANLANG
UNIVERSITY

3. CỐ ĐỊNH CÁC ĐOẠN LÊN BỀ MẶT RẮN (IMMOBILIZATION THE FRAGMENTS ON SOLID SUPPORT)

- Gắn các đoạn ngắn adapter (biết trước trình tự) lên DNA
- Cố định lên bề mặt rắn bằng nhiều cách: **adapter gắn lên trình tự bổ sung với oligonucleotide** hoặc adapter-liên kết biotin gắn lên hạt Streptavidin



Coating of oligonucleotides

Glass slide

Oligonucleotides

DNA fragment

Adaptor

Figure 10.12
Immobilization of the DNA fragments in a sequencing library by base pairing to oligonucleotides on a glass slide.

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

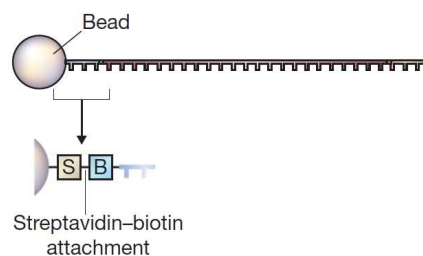
102



3. CỐ ĐỊNH CÁC ĐOẠN LÊN BỀ MẶT RẮN (IMMOBILIZATION THE FRAGMENTS ON SOLID SUPPORT)

- Gắn các đoạn ngắn adapter (biết trước trình tự) lên DNA
- Cố định lên bề mặt rắn bằng nhiều cách: adapter gắn lên trình tự bổ sung với oligonucleotide hoặc **adapter-liên kết biotin gắn lên hạt Streptavidin**

(a) Attachment to beads by streptavidin-biotin linkages



11/4/2021

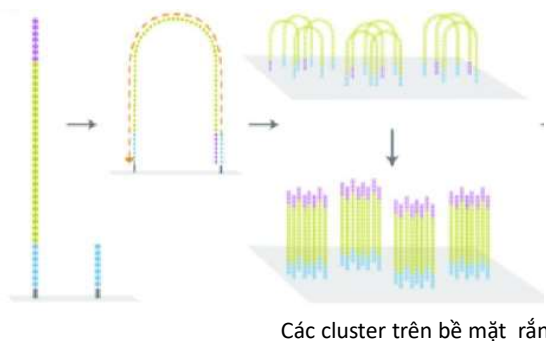
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

103



3. KHUẾCH ĐẠI CÁC TRÌNH TỰ BẰNG PCR

- Khuếch đại các sợi DNA đơn thành nhiều copies đứng gần nhau tạo thành các cụm (cluster) bằng PCR



11/4/2021

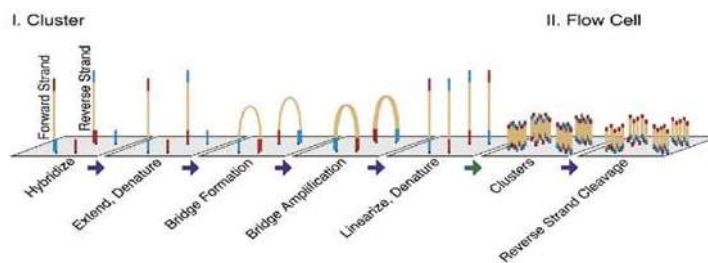
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

104



3. KHUẾCH ĐẠI CÁC TRÌNH TỰ BẰNG PCR

- Khuếch đại các sợi DNA đơn thành nhiều copies đứng gần nhau tạo thành các cụm (cluster) bằng PCR



<https://www.1010genome.com/illumina-sequencing/>

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

105



GIẢI TRÌNH TỰ BẰNG CÁCH TỔNG HỢP SỢI MỚI (SEQUENCING BY SYNTHESIS-SBS)

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

106

GIẢI TRÌNH TỰ BẰNG CÁCH TỔNG HỢP SỢI MỚI (SEQUENCING BY SYNTHESIS-SBS)

<https://www.google.com.vn/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.medicinische-genetik.de%2Findex.php%3Fid%3Dnext-generation-sequencing&psig=AOvVaw3kfr0A0Z8n5Cj0DWErK8Y3D&ust=1602912490282000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwj-P29sLjsAhVoHbcAHSUIBqwQr4kDegUIARCOAQ>

11/4/2021

107


GIẢI TRÌNH TỰ BẰNG CÁCH TỔNG HỢP SỢI MỚI (SEQUENCING BY SYNTHESIS-SBS)

<http://tcr.amegroups.com/article/view/4506/html>

11/4/2021

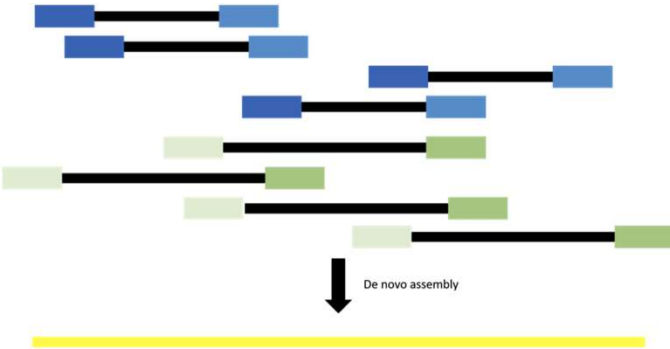
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

108



LẮP RÁP TRÌNH TỰ

(DE NOVO ASSEMBLY)




De novo assembly

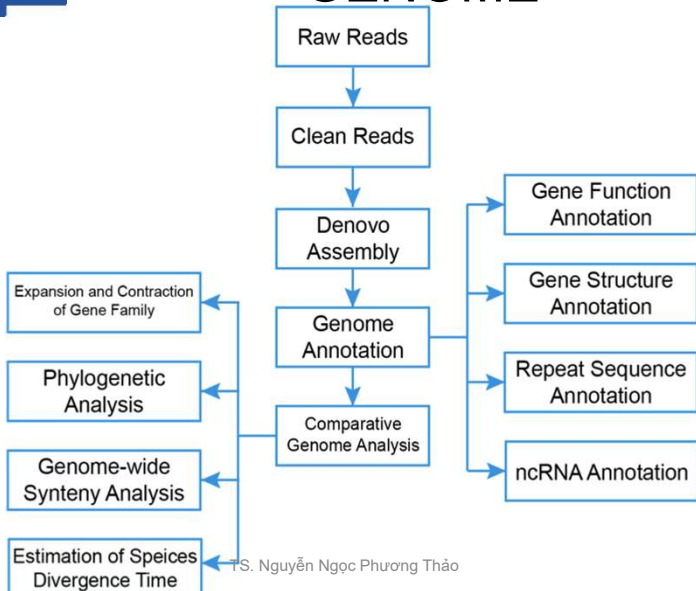
ĐỘ PHỦ (COVERAGE) TỪ 5X: MỖI NUCLEOTIDE ĐƯỢC LẬP LẠI 5 LẦN

11/4/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

109

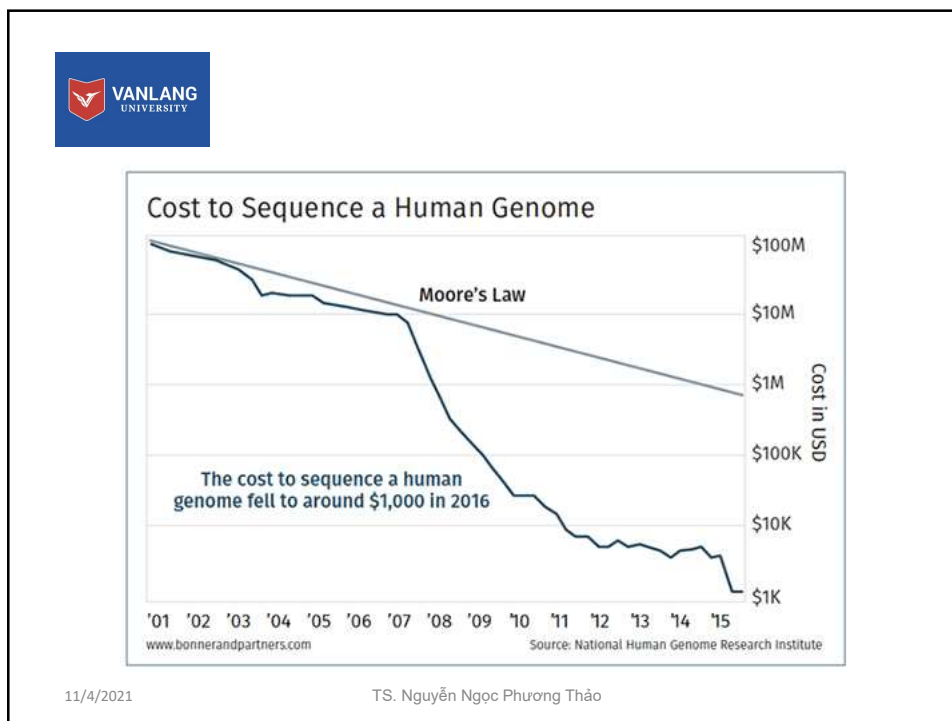


PHÂN TÍCH DỮ LIỆU GENOME




11/4/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

110



111




ỨNG DỤNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ DNA

- Phát hiện sớm các ung thư di truyền: tuyến giáp, vú, đại trực tràng, dạ dày, bạch cầu tuỷ bào cấp...
- Sàng lọc trước sinh chẩn đoán hội chứng DOWN, khuyết tật ống thần kinh, Trisomy 18, não úng thủy, ...
- Chẩn đoán và phát hiện đột biến kháng thuốc của các vi khuẩn, virus, nấm gây bệnh ở người, động vật, thực vật
- Xét nghiệm DNA huyết thống
- Xác định nguồn gốc động vật, giống cây
- Phục vụ công tác điều tra tội phạm

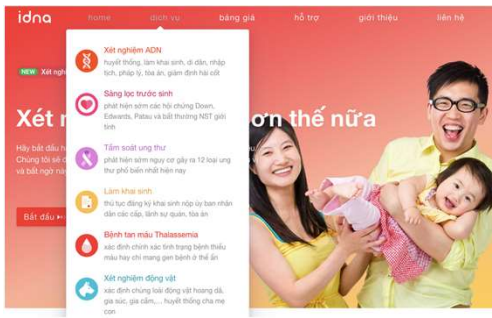
11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

112



Home » Dịch vụ » ADN Huyết Thống » Xét nghiệm nguồn gốc động vật

- Nhà nhập khẩu thú động vật từ nước ngoài
- Cá nhân muốn xác các sản phẩm thú động tin minh bạch
- Doanh nghiệp muốn xét nghiệm làm thủ tục hải quan, Cục thú y cho các sản phẩm có nguồn gốc động vật



Xét nghiệm ADN
Huyết thống, tam tạng sinh, di dân, nhập tịch, pháp lý, tòa án, giám định hải cẩu

Sàng lọc trước sinh
phát hiện sớm các hội chứng Down, Edwards, Patau và bất thường NST giới tính

Tầm soát ung thư
phát hiện sớm nguy cơ gây ra 12 loại ung thư phổ biến nhất hiện nay

Làm khảm sinh
thủ tục đăng ký khai sinh nộp tư ban nhận dân các cấp, lĩnh sự quản, tòa án

Bệnh tan máu Thalassemia
xác định chính xác tình trạng bệnh thiếu máu hay cho mang gen bệnh ở thế hệ

Xét nghiệm động vật
xác định chủng loài động vật hoang dã, gia súc, gia cầm... huyết thống của mẹ


>100.000 MẪU ĐƯỢC PHÂN TÍCH - 29 ĐIỂM THU MẪU TRÊN CẢ NƯỚC

Phòng xét nghiệm ADN huyết thống được xây dựng theo khuyến cáo của FBI – Mỹ về phòng giám định ADN trong lĩnh vực khoa học hình sự được đánh giá phù hợp với ISO 9001:2015.

Phòng xét nghiệm di truyền, sinh học phân tử được xây dựng theo quy định của Bộ Y tế về phòng xét nghiệm và được đánh giá phù hợp với tiêu chuẩn ISO 15189:2012 VILAS MED 101

Xét nghiệm sàng lọc trước sinh không xâm lấn NIPT theo giải pháp Veriseq NIPT được chuyển giao bởi tập đoàn Illumina – Mỹ.


Sử dụng các hệ thống máy PCR, Realtime PCR, máy giải trình tự mao quản, máy giải trình tự thế hệ mới NGS được sản xuất bởi các hãng Thermo, Biorad, Illumina – Mỹ.



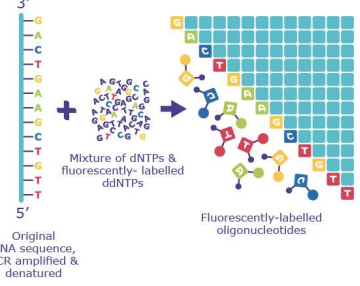
11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

113



1 PCR with fluorescent, chain-terminating ddNTPs

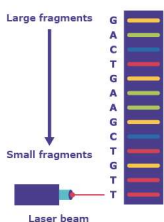


Original DNA sequence, PCR amplified & denatured

Mixture of dNTPs & fluorescently-labelled ddNTPs

Fluorescently-labelled oligonucleotides

2 Size separation by capillary gel electrophoresis



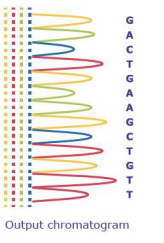
Large fragments

Small fragments

Laser beam

Photomultiplier

3 Laser excitation & detection by sequencing machine



Output chromatogram

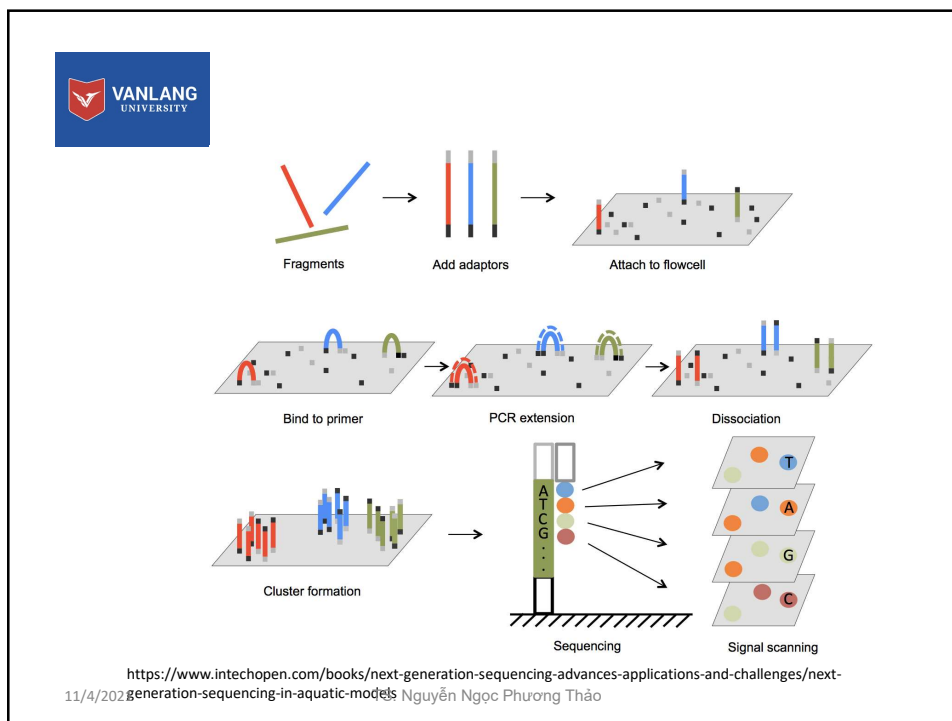
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/articles/biology/marketing-assets/sanger-sequencing_steps_process_diagram.png

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

114

57



115

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- <https://medlatec.vn/tin-tuc/nhung-ung-dung-cua-ky-thuat-giai-trinh-tu-dna-the-he-moi-tren-may-pyromark-q24-trong-y-hoc-lam-sang-s28-n4685>

11/4/2021 TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

116