

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

*****000*****



HOÀNG ĐỨC CHIẾN

**TỔNG HỢP VÀ TẠO DÒNG PHÂN TỬ
GEN INTERFERON ALPHA 2A**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 8/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
000**

**TỔNG HỢP VÀ TẠO DÒNG PHÂN TỬ
GEN INTERFERON ALPHA 2A**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

**Giáo viên hướng dẫn:
ThS. TRẦN QUỲNH HOA**

**Sinh viên thực hiện:
HOÀNG ĐỨC CHIẾN
Khóa: 2002 – 2006**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 8/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
000**

**SYNTHESIZE AND CLONE MOLECULE
GEN INTERFERON ALPHA 2A**

**Graduation thesis
Major: Biotechnology**

**Professor:
Ma. TRAN QUYNH HOA**

**Student:
HOANG DUC CHIEN
Term: 2002 – 2006**

HCMC
8/2006

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn:

- ❖ Ban Giám Hiệu trường Đại Học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.
- ❖ Ban chủ nhiệm Bộ môn Công Nghệ Sinh Học, cùng tất cả quý thầy cô đã truyền đạt kiến thức cho tôi trong quá trình học tại trường.
- ❖ Ban giám đốc công ty NTL Biotech đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành khóa luận này.
- ❖ Thạc sĩ Trần Quỳnh Hoa đã hết lòng hướng dẫn và truyền đạt những kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt quá trình thực tập tốt nghiệp.
- ❖ Các anh chị trong phòng thí nghiệm công ty NTL Biotech đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực tập tốt nghiệp.
- ❖ Các bạn bè thân yêu của lớp CNSH K28 đã giúp đỡ và chia sẻ cùng tôi những vui buồn trong thời gian học cũng như hết lòng hỗ trợ trong thời gian thực tập tốt nghiệp.

TÓM TẮT KHÓA LUẬN

HOÀNG ĐỨC CHIẾN, Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, tháng 8/2006, “TỔNG HỢP VÀ TẠO DÒNG PHÂN TỬ GEN INTERFERON ALPHA 2A ”.

Hướng dẫn khoa học:

ThS. Trần Quỳnh Hoa

Đề tài được tiến hành từ ngày 06-02-2006 đến ngày 31-07-2005 tại phòng thí nghiệm sinh học phân tử của công ty NTL Biotech.

Ở nước ta hiện nay việc sử dụng interferon trong chữa trị các bệnh như ung thư, các bệnh do virus gây ra đã phổ biến. Nhưng những interferon này chủ yếu được sản xuất ở nước ngoài với giá rất cao. Do đó chúng tôi thực hiện tổng hợp và tạo dòng gen interferon alpha 2a.

Kết quả đạt được như sau:

- Tổng hợp được gen interferon alpha 2a.
- Biến nạp được gen này vào vi khuẩn *E. coli* Top10 F’.
- Kiểm tra được đoạn gen chèn bằng kỹ thuật PCR, enzyme cắt và điện di.
- Đưa mẫu giải trình tự và xác định đúng trình tự đoạn gen.

MỤC LỤC

CHƯƠNG	TRANG
Lời cảm ơn.....	iii
Tóm tắt khóa luận	iv
Mục lục	v
Danh sách các chữ viết tắt.....	viii
Danh sách các hình	ix
PHẦN I. GIỚI THIỆU	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích - yêu cầu	1
1.2.1. Mục đích.....	1
1.2.2. Yêu cầu.....	1
PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	2
2.1. Sơ lược về interferon	2
2.1.1. Đặc điểm chung của interferon.....	2
2.1.2. Đặc điểm interferon alpha 2a	3
2.1.3. Tình hình nghiên cứu	3
2.2. Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction)	3
2.2.1. Giới thiệu về phản ứng PCR	3
2.2.2. Một số yếu tố tham gia vào phản ứng PCR	4
2.2.2.1. Enzyme DNA polymerase	4
2.2.2.2. Các nucleotide tự do (dNTPs)	4
2.2.2.3. Primer và nhiệt độ lai.....	5
2.2.2.4. DNA khuôn.....	5
2.2.2.5. Dung dịch đệm.....	5
2.2.2.6. Số chu kỳ phản ứng	6
2.2.2.7. Nhiệt độ và pH.....	6
2.2.3. Tổng hợp gen.....	6
2.2.4. Ứng dụng của PCR.....	6

2.3. Kỹ thuật điện di DNA.....	7
2.4. Hiện tượng biến nạp ở vi khuẩn	7
2.4.1. Hiện tượng biến nạp	7
2.4.2. Vector – công cụ biến nạp	7
2.4.2.1. Plasmid	8
2.4.2.2. Phage	9
2.4.3. Biến nạp nhân tạo ở vi khuẩn	10
2.4.3.1. Chuẩn bị tế bào khả nạp	10
2.4.3.2. Chọn lọc tế bào vi khuẩn đã được biến nạp	10
2.4.4. Vai trò ứng dụng.....	13
2.5. Tách chiết DNA plasmid	13
2.6. Một số enzyme sử dụng trong biến nạp.....	13
2.6.1. Enzyme cắt giới hạn	13
2.6.2. Enzyme nối	15
2.7. Nguyên tắc đọc trình tự	15
2.7.1. Phương pháp đọc trình tự của Sanger	15
2.7.2. Giải mã trình tự bằng hệ thống tự động	15
PHẦN III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	16
3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện đề tài	16
3.2. Vật liệu	16
3.2.1. Vật liệu làm thí nghiệm	16
3.2.1.1. Sáu đoạn oligonucleotide và hai primer	16
3.2.1.2. Vi khuẩn <i>E. coli</i> Top10 F'	17
3.2.1.3. Plasmid pGEM-T.....	17
3.2.2. Dụng cụ thí nghiệm	17
3.2.3. Thiết bị máy móc.....	18
3.2.4. Hóa chất sử dụng	18
3.3. Phương pháp nghiên cứu	19
3.3.1. Tổng hợp gen IFN- α 2a bằng PCR và chạy điện di kiểm tra	19
3.3.1.1. Tổng hợp đoạn gen	19
3.3.1.2. Chạy điện di kiểm tra	20
3.3.2. Tinh sạch DNA từ gel và thực hiện phản ứng A-Tailing cho đoạn DNA..	20

3.3.3. Thực hiện phản ứng nối DNA đã được A-Tailing vào plasmid pGEM-T	21
3.3.4. Chuẩn bị tế bào khả nạp và thực hiện phản ứng biến nạp	22
3.3.5. Chọn lọc khuẩn lạc mong muốn	23
3.3.6. Quy trình tách plasmid	23
3.3.7. Chạy PCR kiểm tra	23
3.3.8. Thực hiện phản ứng cắt plasmid bằng enzyme cắt giới hạn	24
PHẦN IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
4.1. Phản ứng tổng hợp IFN- α 2a	25
4.2. Tạo dòng phân tử IFN- α 2a	26
4.2.1. Kết quả biến nạp	26
4.2.2. Tách plasmid	26
4.3. Kết quả kiểm tra	27
4.3.1. Kiểm tra PCR	27
4.3.2. Cắt bằng enzyme cắt giới hạn	28
4.4. Kết quả giải trình tự	28
Phần V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	30
5.1. Kết luận	30
5.2. Đề nghị	30
TÀI LIỆU THAM KHẢO	31
PHỤ LỤC	33

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

bp	base pair
CAP	catabolyte gen activator protein
CRP	cAMP receptor protein
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	3'-deoxynucleotide-5'-triphosphate
dATP	3'-deoxyadenine-5'-triphosphate
dCTP	3'-deoxycytosine-5'-triphosphate
dGTP	3'-deoxyguanine-5'-triphosphate.
dTTP	3'-deoxythymine-5'-triphosphate
ddNTP	dideoxynucleotide
EDTA	ethylene diamin tetracetic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IFN	interferon
IFN- α 2a	interferon alpha 2a
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
kb	kilobase
ng	nanogram
NST	nhiễm sắc thể
MCS	multiple cloning site
mRNA	messenger ribonucleic acid
μ g	microgram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfat
TAE	triacetic ethylene diamine tetra acetate
Taq	thermus aquaticus
TE	tris ethylene diamine tetra acetate.
X-gal	5-bromo-4 chloro-3 indolyl- β -D galactopyranoside

DANH SÁCH CÁC HÌNH

	Trang
Hình 2.1: Cấu trúc 3D của interferon	2
Hình 2.2: Các chu kỳ phản ứng PCR	4
Hình 2.3: Mô hình plasmid sử dụng cho cloning	8
Hình 2.4: Cấu trúc của phage T4	9
Hình 2.5: Cấu trúc của operon <i>lac</i>	11
Hình 3.1: Vector pGEM-T	17
Hình 3.2: Mô hình nối gen chèn vào vector T.....	22
Hình 4.1: Kết quả tổng hợp gen	25
Hình 4.2: Kết quả cấy vi khuẩn trên môi trường chọn lọc	26
Hình 4.3: Kết quả điện di plasmid trên gel agarose 1%.....	27
Hình 4.4: Kết quả PCR kiểm tra	27
Hình 4.5: Kiểm tra bằng enzyme cắt.....	28
Hình 4.6: Trình tự đoạn gen IFN- α 2a tổng hợp được.....	28
Hình 4.7: Kết quả so sánh trình tự acid amin	29

PHẦN I. MỞ ĐẦU

1.1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khi xã hội càng phát triển, đời sống con người được nâng cao, tuy nhiên xu hướng mắc các bệnh nguy hiểm cũng ngày một gia tăng như: ung thư, các bệnh truyền nhiễm, các bệnh do vi khuẩn, virus gây ra Ở các nước phát triển việc chữa trị bệnh được nghiên cứu rất nhiều và giúp ích trong quá trình điều trị cũng như hạn chế được những bệnh này.

Ngày nay, cùng với sự phát triển không ngừng của sinh học phân tử, di truyền, ... đã có những đóng góp rất hữu ích cho việc chẩn đoán cũng như chữa trị, sản xuất thuốc chữa bệnh, protein tái tổ hợp bằng công nghệ sinh học có thể cung cấp đầy đủ lượng thuốc cần thiết, ví dụ: insulin chữa bệnh tiểu đường.

Từ lâu interferon được biết đến như một chất có khả năng chữa bệnh ung thư, tham gia vào đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu. Muốn có được một lượng interferon đủ để cung cấp cho việc điều trị, sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp là hướng phát triển được mong đợi. Trong số đó interferon alpha 2a (IFN- α 2a) được biết như kháng virus, điều hòa miễn dịch và hạn chế được một số bệnh ung thư. Các nghiên cứu về interferon ở Việt Nam còn rất nhiều hạn chế, trong điều trị bệnh chủ yếu vẫn sử dụng interferon nhập từ nước ngoài giá thành rất cao so với mức sống của người dân. Vì những lý do đó chúng tôi quyết định thực hiện đề tài này: “**Tổng hợp và tạo dòng phân tử gen interferon alpha 2a**”.

1.2. MỤC TIÊU VÀ YÊU CẦU

1.2.1. Mục tiêu

Tổng hợp và tạo dòng được đoạn gen IFN- α 2a nhằm cung cấp vật liệu di truyền cho các nghiên cứu và ứng dụng khác.

1.2.2. Yêu cầu

Tổng hợp được đoạn gen IFN- α 2a bằng kỹ thuật PCR.

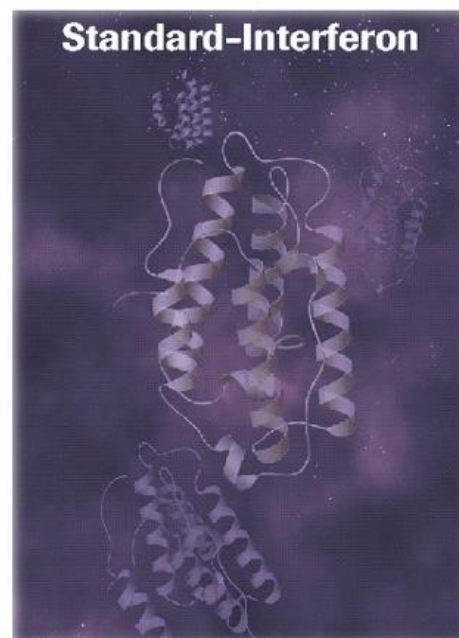
Tạo dòng được đoạn gen IFN- α 2a: gắn gen IFN- α 2a vào vector pGEM-T sau đó chuyển vào vi khuẩn *E. coli*.

PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. SƠ LƯỢC VỀ INTERFERON

2.1.1. Đặc điểm chung của interferon

Vào năm 1957, Isaacs và Lindenmann đã phát hiện ra interferon trong khi nghiên cứu các chất có hoạt tính ngăn cản sự nhân lên của các siêu vi ở các tế bào mới bị nhiễm. Ngày nay người ta đã biết interferon là một gia đình có nhiều loại phân tử khác nhau không những có tác dụng ngăn cản sự nhân lên của các siêu vi mà còn ngăn cản sự tăng sinh của một số tế bào (kể cả tế bào ung thư) và điều biến đáp ứng miễn dịch.



Hình 2.1: Cấu trúc 3D của interferon

Căn cứ vào các đặc điểm tổng quát người ta chia interferon làm 2 loại là interferon type I và interferon type II. Interferon type I chủ yếu có hoạt tính chống siêu vi, hầu hết tế bào đều có thể sản xuất ra interferon type I khi bị nhiễm bởi siêu vi, vi khuẩn hay các nguyên sinh động vật. Interferon type I có hai dạng chính là IFN α và IFN β .

- IFN α là nhóm IFN được tiết chủ yếu từ bạch cầu, tối thiểu có khoảng 14 loại thuộc nhóm này, chúng có cấu trúc của chuỗi acid amin tương đồng với nhau đến 90 %. IFN α trong điều trị nhiễm siêu vi viêm gan B và C có thể ngăn cản được tình trạng tăng sinh của siêu vi và sự tiến triển của bệnh khoảng 40 %. Một số bệnh ung thư như ung thư tế bào hắc tố, ung thư xương, ung thư tương bào... cũng đã được thử

nghiệm lâm sàng điều trị với interferon đơn thuần hoặc phối hợp cùng với các chất khác.

- IFN β được tiết chủ yếu từ nguyên bào sợi.

IFN type II hay còn được gọi là IFN miễn dịch (IFN γ) chủ yếu có hoạt tính biến điệu miễn dịch. Gần đây một số thử nghiệm sử dụng IFN γ trong việc hạn chế đáp ứng miễn dịch dịch thể và tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào đã được nghiên cứu (Phạm Hoàng Phiệt, 1999).

2.1.2. Đặc điểm IFN- α 2a

IFN- α 2a là một thành viên trong họ protein interferon với những đặc điểm như kháng virus, điều hòa miễn dịch và có khả năng chống lại bệnh ung thư. IFN- α 2a là một protein bao gồm 165 amino acid do một gen nằm trên NST số 9 ở người tổng hợp.

2.1.3. Tình hình nghiên cứu

Cùng với sự phát triển của sinh học phân tử và những kỹ thuật mới những nghiên cứu về interferon ngày càng nhiều hơn. Sự biểu hiện và chức năng của interferon cũng được biết đến nhiều hơn.

Reynolds, Premkumar và Pitha (1975) đã chuyển gen interferon vào tế bào eukaryote như *Xenopus oocytes*, đồng thời biểu hiện và xác định được protein interferon bằng hoạt động kháng virus của chúng trong nuôi cấy tế bào.

Goeddel và cộng sự (1980) đã sản xuất được IFN- α 2a lần đầu tiên bằng *E. coli* tái tổ hợp nhưng ở mức độ biểu hiện thấp.

Interferon đã được nghiên cứu ở mức độ điều trị lâm sàng ở một số bệnh như: viêm gan siêu vi B, viêm gan siêu vi C, ung thư tế bào hắc tố, ung thư tế bào sơ cấp (Spiegel, 1986; Scott M. Lippman và cộng sự, 1992; Eric Dieperink và cộng sự, 2000). Tuy vậy việc nghiên cứu về interferon ở nước ta vẫn còn khiêm tốn.

2.2. KỸ THUẬT PCR (POLYMERASE CHAIN REACTON)

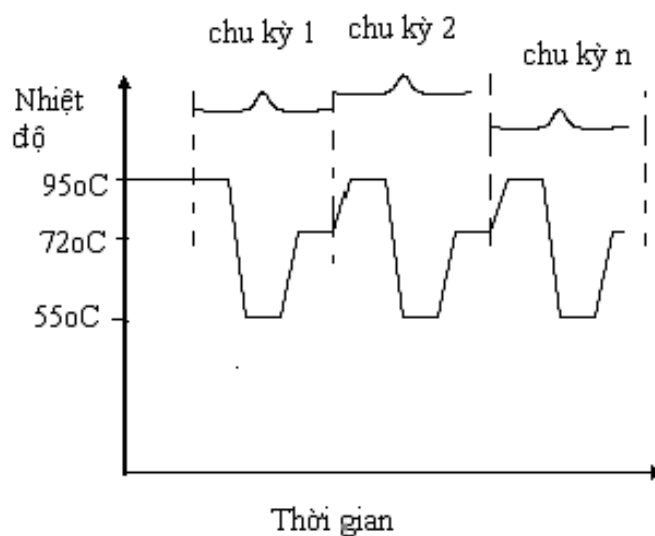
2.2.1. Giới thiệu về phản ứng PCR

Kỹ thuật PCR được mô tả bởi Mulis và cộng sự (1985) là kỹ thuật cho phép làm tăng bội một đoạn DNA cần được nghiên cứu. Khác với sự tăng bội DNA qua sự tạo dòng nhờ vi khuẩn, PCR được thực hiện *in vitro* theo con đường enzyme. Theo lý thuyết, phương pháp này có ba acid nucleic: một DNA dây đôi cần được khuếch đại, hai sợi đóng vai trò mồi (primer) với kích thước rất ngắn chạy theo chiều thuận và

ngịch trên DNA nền, thêm vào là DNA polymerase, dNTPs và một muối Mg (M.J. McPherson và S.G. Moller, 2000).

Phản ứng PCR gồm các bước chủ yếu sau:

- Bước 1: Tạo dây đơn DNA nhờ hiện tượng biến chất (denature) thường ở nhiệt độ 94 – 95°C
- Bước 2: Giai đoạn bắt cặp giữa primer và mạch khuôn, nhiệt độ bắt cặp tùy thuộc vào trình tự của primer, thông thường khoảng 40 – 60°C.
- Bước 3: Giai đoạn kéo dài tổng hợp bản sao DNA được thực hiện ở 72°C.



Hình 2.2: Các chu kỳ phản ứng PCR

2.2.2. Một số yếu tố tham gia vào phản ứng PCR

2.2.2.1. Enzyme DNA polymerase

Enzyme được sử dụng đầu tiên là đoạn Klenow của DNA polymerase I.. Đây là enzyme không chịu nhiệt nên thao tác phức tạp và hiệu quả thấp. Phương pháp PCR trở nên thuận lợi hơn với việc phát hiện ra enzyme DNA polymerase chịu nhiệt được tách từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* hiện diện trong suối nước nóng, viết tắt là *Taq* polymerase, enzyme này có tính chịu nhiệt rất cao, nó chịu được nhiệt độ biến tính DNA khoảng 94°C. Nhiệt độ tối ưu cho sự hoạt động của *Taq* polymerase là 70 – 72°C. Trong phản ứng PCR nếu nồng độ enzyme này quá thấp không đủ lượng enzyme xúc tác cho phản ứng thì sẽ tạo ra sản phẩm không mong muốn.

2.2.2.2. Các nucleotide tự do (dNTPs)

dNTP – deoxyribonucleotide-5-triphosphate. Đây là hỗn hợp 4 loại nucleotide

dATP, dTTP, dGTP và dCTP làm nguyên liệu cho phản ứng tổng hợp mạch DNA mới. Mỗi loại dNTP thường được sử dụng với nồng độ từ 20 – 200 μM . Nồng độ cao hơn sẽ dẫn đến việc tạo ra các sản phẩm không mong muốn. Sự mất cân bằng trong thành phần các nucleotide sẽ làm phát sinh các lỗi sao chép của *Taq* polymerase.

2.2.2.3. Primer và nhiệt độ lai

Primer là các đoạn oligonucleotide mạch đơn có trình tự bổ sung với trình tự của hai đầu sợi khuôn để khởi đầu quá trình tổng hợp DNA. Chiều dài của mỗi thường từ 10 – 35 nucleotide. Primer là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới tính đặc hiệu và tính hiệu quả của phản ứng khuếch đại. Trình tự của primer thường được chọn sao cho không có sự bắt cặp bổ sung giữa primer xuôi và primer ngược, không có những cấu trúc “kẹp tóc” do sự bắt cặp bổ sung trong mỗi primer và T_m của 2 primer phải không quá cách biệt nhau. Ngoài ra, thành phần nucleotide của primer phải cân bằng tránh lặp lại nhiều lần các cặp GC. Primer được chọn phải đặc trưng cho trình tự DNA cần khuếch đại, không trùng với các trình tự trên gen. Trình tự nằm giữa hai primer không quá lớn, phản ứng PCR sẽ tối ưu trên những trình tự nhỏ hơn 1 kb (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1998).

2.2.2.4. DNA khuôn

Kết quả phản ứng PCR phụ thuộc rất lớn vào độ tinh sạch cũng như lượng DNA mẫu. Tuy nhiên, có nhiều nghiên cứu cho thấy PCR vẫn tốt trên DNA thu nhận trực tiếp từ dịch chiết tế bào, các vết máu.... Lượng DNA mẫu thường được sử dụng là 100 ng. Lượng mẫu phù hợp có tác dụng hạn chế sự khuếch đại tạo các sản phẩm không mong muốn (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1998).

2.2.2.5. Dung dịch đệm

Thành phần quan trọng nhất trong dung dịch đệm là Mg^{2+} . Nó rất cần thiết cho quá trình liên kết các dNTP, xúc tác cho hầu hết các enzyme DNA polymerase. Nồng độ tối ưu của Mg^{2+} là 1,5 mM. Nồng độ Mg^{2+} quá thấp ($< 0,5$ mM) sẽ làm giảm phản ứng kéo dài mạch DNA do hoạt động của *Taq* polymerase bị ức chế. Nồng độ Mg^{2+} quá cao tuy ổn định mạch kép DNA nhưng lại hạn chế sự biến tính hoàn toàn sản phẩm trong mỗi chu kỳ dẫn đến giảm sản phẩm cuối cùng. Quá thừa Mg^{2+} dẫn đến sự bắt cặp sai giữa primer và khuôn, kết quả là tạo ra nhiều sản phẩm không đặc hiệu (Huỳnh Thùy Hồ Dương, 1998).

2.2.2.6. Số chu kỳ phản ứng

Số lượng chu kỳ phản ứng PCR trong thực tế thường không vượt quá 40 chu kỳ. Số chu kỳ tùy thuộc vào lượng DNA mẫu ban đầu. Nếu số chu kỳ ít thì lượng DNA thu được ít. Nếu số chu kỳ quá nhiều thì hiệu suất của PCR giảm do cạn kiệt nồng độ các thành phần tham gia và sự mệt mỏi của các enzyme.

2.2.2.7. Nhiệt độ và pH

Nhiệt độ có ảnh hưởng mạnh đến độ chuyên biệt và năng suất của sản phẩm PCR. Nhiệt độ biến tính khoảng 94 – 95°C nếu vượt quá sẽ làm mất hoạt tính của enzyme DNA polymerase. Để kéo dài chuỗi người ta sử dụng nhiệt độ 72°C là nhiệt độ tối ưu cho enzyme DNA polymerase. Nhiệt độ khó xác định nhất là nhiệt độ bắt cặp giữa primer và mạch khuôn. Nhiệt độ được xác định tùy thuộc vào trình tự primer.

Hầu hết các enzyme, mẫu DNA được đệm trong môi trường tối ưu pH = 8. Ở pH này DNA rất ổn định. Trong môi trường acid các bazơ purin rất dễ bị tách khỏi sợi DNA, cầu nối phosphodiester bị phá vỡ. Tuy nhiên theo chu kỳ nhiệt độ phản ứng PCR thì pH có thể đổi từ 6,8 – 7,8.

2.2.3. Tổng hợp gen

Nguyên tắc: sử dụng những đoạn oligonucleotide được thiết kế sao cho có thể gộp lên nhau theo nguyên tắc bổ sung. Những đoạn oligonucleotide này sẽ có khoảng 15 – 25 nucleotide bắt cặp với nhau sau khi tác động nhiệt và kéo dài ở đầu 3' của mỗi sợi. Những đoạn oligonucleotide này sẽ được trộn lại với nhau và ủ ở nhiệt độ khoảng 72°C để chúng bắt cặp với nhau, sau đó chạy PCR để tổng hợp đoạn gen hoàn chỉnh (M.J. McPherson và S.G. Moller, 2000).

2.2.4. Ứng dụng của phản ứng PCR

Kể từ khi ra đời, phương pháp PCR ảnh hưởng sâu sắc tới các nghiên cứu về sinh học phân tử. Các ứng dụng tiêu biểu của PCR bao gồm:

- Trong nông nghiệp: xác định tính đa dạng sinh học, dùng trong chọn giống và xác định yếu tố gây bệnh...
- Trong thực phẩm: sử dụng để xem thực phẩm có sử dụng sản phẩm chuyển gen hay không, xác định nguyên nhân gây bệnh trong mẫu thực phẩm là do virus hay vi khuẩn.
- PCR còn được sử dụng để nhân nhanh những đoạn gen quý hiếm và còn được sử dụng trong tổng hợp gen.

- Gần đây nhất là sự đóng góp thiết thực của kỹ thuật PCR trong việc giải mã bộ gen người.

2.3. KỸ THUẬT ĐIỆN DI DNA

Kỹ thuật điện di là kỹ thuật cho phép xác định kích thước đoạn DNA. DNA sẽ được đi qua chất nền được gọi là gel trong một điện trường. DNA tích điện âm cho nên trong điện di mẫu được cho vào những giếng gần cực điện âm và DNA sẽ di chuyển về phía cực dương. Sự di chuyển tỷ lệ nghịch với kích thước phân tử, những phân tử càng nhỏ di chuyển càng nhanh và ngược lại.

Trong điện di người ta thường sử dụng gel làm từ các vật liệu: agarose, acrylamide... Agarose là một trong các dạng của polysaccharide, chúng sẽ tạo thành hạt sau khi tan ở nhiệt độ cao. Khi nguội lại những hạt agarose này sẽ kết tụ lại với nhau. Giữa những hạt như vậy có những lỗ rất nhỏ. Kích thước của những lỗ này có thể xê dịch chút ít tùy theo nồng độ của agarose. Khi DNA di chuyển qua các lỗ của agarose, sự cọ xát giữa hạt agarose và phân tử DNA tạo ra lực kháng làm ngăn cản sự dịch chuyển này của DNA.

Sau khi điện di trên gel, các đoạn DNA được phân ra tùy theo trọng lượng phân tử. Người ta có thể quan sát chúng bằng mắt, nhờ kỹ thuật nhuộm màu DNA với ethidium bromide và chiếu dưới tia cực tím.

2.4. HIỆN TƯỢNG BIẾN NẠP Ở VI KHUẨN

2.4.1. Hiện tượng biến nạp

Hiện tượng biến nạp đã được chứng minh lần đầu tiên năm 1928 trên vi khuẩn *streptococcus pneumoniae* bởi Fred Griffiths và đến năm 1944 đã được kiểm chứng lại bởi Avery và cộng sự. Chúng vi khuẩn mà Griffiths và Avery sử dụng ở trạng thái khả nạp tự nhiên nên có khả năng hấp thu DNA có sẵn trong môi trường sống. Đó là các DNA có nguồn gốc từ các tế bào chết hay các tế bào bị phân hủy. Kết quả thu được là vi khuẩn thể hiện một vài tính trạng mới, ổn định và có khả năng di truyền.

Trạng thái khả nạp tự nhiên xuất hiện ở một vài loài vi khuẩn khi mà nồng độ chất dinh dưỡng và hàm lượng oxy trong môi trường giảm xuống thấp. Thực tế khi nghiên cứu biến nạp phải tiến hành xử lý tế bào để chúng ở trạng thái khả nạp, có khả năng hấp thu DNA.

2.4.2. Vector – công cụ biến nạp

Vector là vật liệu quan trọng trong các thí nghiệm biến nạp DNA và gen cloning.

Vector được chọn phải có khả năng mang một hoặc nhiều gen vào tế bào chủ và cần có các tiêu chuẩn sau:

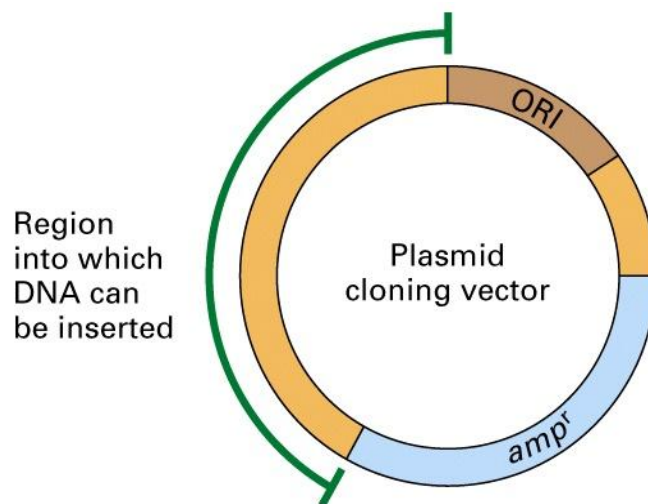
- Có khả năng tự sao chép độc lập không phụ thuộc vào tế bào chủ.
- Mang những gen chọn lọc để dễ dàng phát hiện vi khuẩn có chứa chúng.
- Mang những vị trí duy nhất của một số enzyme cắt giới hạn.
- Có chứa promoter thích hợp cho việc biểu hiện gen của tế bào chủ.

Hai dạng vector thường sử dụng là plasmid và phage:

2.4.2.1. Plasmid

Plasmid được dùng phổ biến và thực hiện trong các phòng thí nghiệm về sinh học phân tử. Trong tự nhiên plasmid có nhiều dạng có kích thước khác nhau từ vài ngàn cặp base tới vài trăm kilobase. Thường các plasmid dùng trong cloning có kích thước từ 2 – 5 kb. Plasmid có các tính chất sau:

- Plasmid là phân tử DNA vòng, xoắn đôi độc lập với tế bào vi khuẩn.
- Chúng có khả năng mang một hoặc nhiều gen, thường là gen có ích cho vi khuẩn như ampicillin giúp cho vi khuẩn tồn tại trên môi trường có kháng sinh này. Và đây cũng được xem như một dấu hiệu để chọn lọc hay đặc điểm xác nhận sự hiện diện của gen ngoại lai



Hình 2.3: Mô hình plasmid sử dụng cho cloning
(Nguồn tài liệu T.A. Brown, 1997)

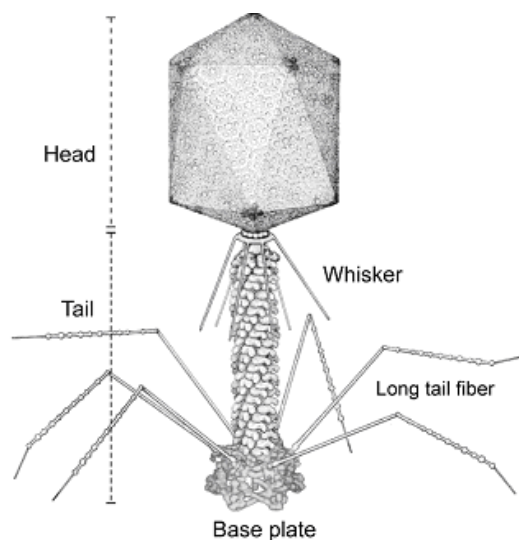
Cấu trúc của plasmid bao gồm vùng ori giúp quá trình nhân nhanh về số lượng nhưng không phụ thuộc vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn chủ. Những plasmid nhỏ có thể sử dụng DNA của tế bào kí chủ cho việc nhân bản của nó, nhưng đối với plasmid

lớn chúng mang những gen mã hóa chuyên biệt giúp cho quá trình tái bản của chính nó. Tuy nhiên một vài plasmid gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn vì vậy số lượng plasmid được nhân lên cùng với sự phân chia tế bào vi khuẩn. Những plasmid hợp nhất gọi là episome thường ổn định qua nhiều chu kỳ phân chia tế bào, nhưng trong một giai đoạn nào đó plasmid cũng có thể ở dạng tự do. Phân loại plasmid dựa vào đặc tính cơ bản mã hóa bởi gen của nó. Được chia làm 5 loại:

- Fertility plasmid chỉ mang tra gen có khả năng chuyển vị và tiếp hợp.
- R plasmid (resistance) mang gen mã hóa các hợp chất kháng lại chất kháng sinh giúp tế bào chủ tồn tại trong môi trường sống.
- Col plasmid tạo ra colycin gây chết vi khuẩn khác.
- Degradative plasmid giúp kí chủ tạo các chất sinh học có tính chất đặc biệt trong điều kiện nào đó như toluen, acid salicylic.
- Virulence plasmid xác định khả năng gây bệnh của vi khuẩn chủ (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2005).

2.4.2.2 Phage

Phages hay bacteriophages xem như phổ biến tiêm vào vi khuẩn, giống như tất cả virus, phage là cấu trúc đơn giản bao gồm phần đầu mang nhiều phân tử DNA chứa nhiều gen, phần đuôi xung quanh là lớp bọc tạo thành khối phân tử protein. Khi tấn công DNA của phage được truyền vào tế bào chủ và ở đó nó trải qua quá trình nhân nhanh về số lượng, người ta lợi dụng đặc tính này để thiết kế các vector mang DNA vào tế bào.



Hình 2.4: Cấu trúc của phage T4

2.4.3. Biến nạp nhân tạo ở *E. coli*

Biến nạp nhân tạo ở *E. coli* là việc đưa một đoạn DNA vào tế bào chủ *E. coli* nhằm nhân nhanh số lượng bản sao, phục vụ cho mục đích nghiên cứu khác. *E. coli* là tế bào chủ được sử dụng rộng rãi vì có cấu trúc đơn giản và các thông tin di truyền được biết tường tận nên dễ phát hiện ra đoạn gen được chèn. Các tế bào *E. coli* có khả năng hỗ trợ cho sự sao chép plasmid DNA và chọn lọc các DNA plasmid tái tổ hợp thông qua gen kháng sinh hay các phức hợp màu với X-gal.

2.4.3.1. Chuẩn bị tế bào khả nạp

Trong phòng thí nghiệm nhằm tăng cường khả năng biến nạp người ta thường xử lý tế bào, tế bào được xử lý gọi là tế bào khả nạp. Người ta thường sử dụng phương pháp hóa học hoặc vật lý:

Phương pháp hóa học: Là phương pháp sử dụng hóa chất để xử lý tế bào có thể kết hợp với nhiệt độ. Phương pháp này thực hiện lâu, hệ số biến nạp của tế bào thấp nhưng đơn giản và dễ thực hiện.

Phương pháp vật lý: Là phương pháp sử dụng điện trường mạnh trong thời gian ngắn làm tạm thời mất tính ổn định của màng tế bào. Tế bào được cho vào cuvette cùng với DNA, cho xung điện qua cuvette. Khi xung điện đi qua, điện trường tạo thành các lỗ trên màng tế bào. Trong thời gian này, màng tế bào có khả năng thấm cao đối với các phân tử hiện diện trong môi trường xung quanh, nhờ đó DNA có thể được chuyển vào tế bào. Khi xung điện tắt các lỗ trên màng tế bào đóng lại, giữ các DNA bên trong tế bào. Ưu điểm của phương pháp này là dễ thực hiện, thời gian ngắn, không độc hại, hiệu quả cao, có thể áp dụng cho nhiều loại tế bào.

2.4.3.2. Chọn lọc tế bào vi khuẩn đã được biến nạp

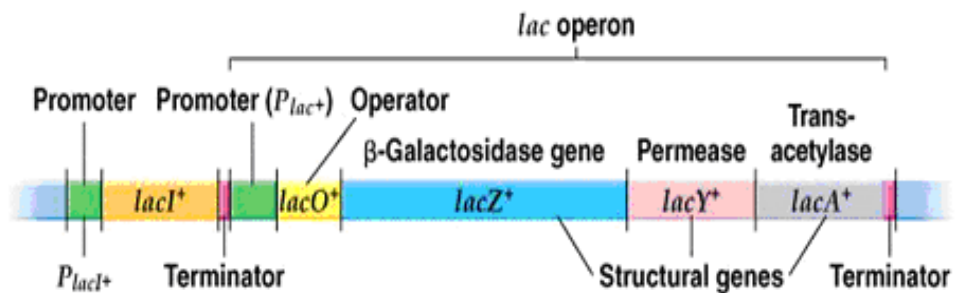
Sự điều hòa operon *lac* ở *E. coli*

Trong trường hợp có glucose, *E. coli* tăng trưởng nhanh chóng. Nếu thay glucose bằng lactose (β -galactosido-glucose), *E. coli* ngừng tăng trưởng và hồi phục sau đó nhờ tổng hợp được 3 enzyme:

- Permerase kích thích sự thấm lactose
- Acetylase (vai trò chưa rõ)
- β -galactosidase xúc tác sự thủy giải lactose thành galactose và glucose

Ba enzyme này chỉ được tổng hợp khi cần để phóng thích glucose từ lactose, chúng được cảm ứng bởi lactose. Jacobs và Monod (1961) giải thích sự cảm ứng này

qua mô hình hoạt động của operon *lac* (lactose operon). Operon *lac* là đoạn DNA chứa: ba gen cấu trúc *lac Z* (mã hoá β -galactosidase), *lac Y* (mã hóa permease) và *lac A* (mã hóa acetylase). Một trình tự nucleotide gọi là promoter (vùng khởi động: P), đánh dấu điểm khởi đầu sao chép của cả 3 gen. Một trình tự nucleotide gọi là operator (vùng hoạt động: O) nằm giữa promoter và các gen mã hoá enzyme. Operator quyết định RNA polymerase không liên kết hay liên kết với promoter và di chuyển dọc theo các gen (trích dẫn bởi Bùi Trang Việt, 2002).



Hình 2.5: Cấu trúc của operon *lac*.

Người ta gọi một nhóm gen với các chức năng liên hệ cùng với promoter và operator là operon. Operon chỉ có ở prokaryote; sự tập hợp các gen trong operon giúp các gen liên hệ biểu hiện nhanh chóng (do sự thay đổi môi trường), vì chúng được kiểm soát chỉ bởi một “nút đóng mở” duy nhất (đó chính là operator). Trước operon *lac Z* là gen điều hoà I, gen này mã hóa repressor, tức protein có vai trò kìm hãm sự biểu hiện gen (I có promoter riêng) để tạo ra repressor. Repressor nhận biết và liên kết với operator, cản sự liên kết của RNA polymerase và promoter. Khi có lactose (và không có glucose), lactose liên kết với repressor và làm biến đổi hình thể của repressor, do đó repressor không liên kết với operator, operon *lac* mở, RNA polymerase liên kết với promoter và trượt dài theo các gen của operon, mRNA (mã hóa cho cả 3 enzyme) được tạo thành và được dịch mã thành các polypeptide riêng biệt. Với hỗn hợp glucose và lactose, *E. coli* dùng glucose trước, sự dùng lactose bị đàn áp đó là sự “kìm hãm dị hoá”. Khi glucose giảm, người ta chứng minh cAMP gia tăng và cố định trên một protein gọi là CAP (catabolyte gen activator protein) hay CRP (cAMP receptor protein). Phức hợp cAMP – CAP cố định trên promoter và làm tăng khả năng liên kết của RNA polymerase với promoter.

Nhằm duy trì sự tồn tại của các vector bacteriophage trong tế bào chủ, thông thường *E. coli* dùng để biến nạp được cải tiến thành các chủng theo hướng cơ bản là loại bỏ các hệ thống sửa đổi hạn chế vì các hệ thống này sẽ can thiệp vào sự sao chép của DNA lạ trong tế bào vi khuẩn. Khi đó DNA lạ sẽ bị phân giải và thay đổi hoạt tính endonuclease nhằm tăng lượng plasmid tích lũy trong tế bào. Thông thường người ta sẽ gây đột biến trên gen *endA* (*endA*⁻) là gen mã hóa cho endonuclease I. Việc mất endonuclease này sẽ tăng sản lượng plasmid và cải thiện chất lượng DNA chiết tách bằng các phương pháp sinh hóa chuẩn (Bùi Trang Việt, 2002).

Chọn lọc tế bào đã được biến nạp

Sau khi xâm nhập vào tế bào chủ, plasmid sẽ tự tái bản và thể hiện gen kháng kháng sinh trong tế bào chủ. Khi được nuôi cấy trên môi trường có chứa kháng sinh thì tế bào chủ đã thu nhận plasmid mới có khả năng tồn tại, những tế bào nào không được tiếp nhận plasmid sẽ không thể phát triển.

Tuy nhiên, kết quả phản ứng nối giữa vector và DNA là một tổ hợp của nhiều kết quả nối: vector – vector, vector – DNA. Vì vậy có những tế bào có khả năng phát triển trên môi trường có chứa kháng sinh nhưng không mang đoạn gen mong muốn. Việc chọn lọc các tế bào biến nạp mang gen mong muốn có nhiều cách:

- PCR: sau khi tách plasmid của những khuẩn lạc tồn tại được trên môi trường có chứa kháng sinh, chạy phản ứng PCR với các primer của gen chèn. Sau đó sẽ chạy điện di để kiểm tra kết quả.

- Xác định thể biến nạp có mang plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp lai khuẩn lạc.

- Sử dụng enzyme cắt plasmid để xác định sự hiện diện của gen chèn.

- Sử dụng phương pháp α -complementation. Nhiều plasmid mang một đoạn ngắn DNA của *E. coli* chứa những trình tự điều hòa và mã hóa cho α -protein của β -galactosidase. Các vector loại này sẽ được sử dụng với chủng *E. coli* thể hiện phần đầu carboxyl của β -galactosidase. Nếu là trường hợp vector – vector thì sản phẩm của gen *lac I* không thể kết dính với vùng hoạt động của promoter – operator của gen *lac Z'*, cho nên gen *lac Z'* trong plasmid được chuyển mã và giải mã. Protein *lac Z'* phối hợp với protein đã được mang tín hiệu di truyền của DNA nhiễm sắc thể để tạo ra một galactosidase lai. Cuối cùng thì 5-bromo-4 chloro-3 indolyl- β -D galactopyranoside (X-gal) trong môi trường sẽ bị thủy phân bởi galactosidase lai này,

cho ra một sản phẩm màu xanh. Trong điều kiện như vậy thì khuẩn lạc có chứa thể vector – vector sẽ có màu xanh. Ngược lại, những khuẩn lạc mang thể vector – DNA chèn sẽ có màu trắng bởi vì DNA được chèn vào vị trí restriction endonuclease. Trong nhiều chuỗi mã của dòng sẽ đột phá khả năng đọc của gen *lac Z'* và ngăn cản việc sản xuất protein *lac Z'* chức năng, tạo ra hệ quả là không có một galactosidase lai nào được sản xuất. Sự vắng mặt của galactosidase lai làm cho X-gal trong môi trường không được chuyển đổi thành hợp chất màu xanh. Để có sự biểu hiện của β -galactosidase cần có chất kích hoạt isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG).

2.4.4. Vai trò và ứng dụng

Hiện tượng biến nạp giúp cho vi khuẩn có thêm các tính trạng mới để dễ thích nghi với môi trường mới. Đồng thời đây cũng là cơ sở của sự tiến hóa.

Biến nạp là bước đầu trong kỹ thuật cloning. Vi sinh vật được xem như là một cỗ máy sản xuất phục vụ nhu cầu con người. Ngày càng có nhiều những sản phẩm được sản xuất từ những vi sinh vật chuyển gen như: các kháng sinh, các kháng thể, các loại protein...

Biến nạp gen còn phục vụ cho các nghiên cứu khác như: kiểm tra đa dạng sinh học, bảo tồn sự ổn định của một đoạn gen được dễ dàng.

2.5. TÁCH CHIẾT DNA PLAMID

Sau khi được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, tế bào chủ có chứa plasmid tái tổ hợp sẽ được chọn lọc và thu sinh khối. Để được plasmid dưới dạng tinh người ta thực hiện tách chiết plasmid. Có nhiều phương pháp tách chiết plasmid như: phương pháp nhiệt độ cao, phương pháp lythium, phương pháp SDS-kiềm... Nhưng quy trình của nó có các bước chính sau: phá vỡ màng tế bào, biến tính, tủa và loại bỏ protein, tủa và thu nhận DNA plasmid.

2.6. MỘT SỐ ENZYME SỬ DỤNG TRONG BIẾN NẠP

2.6.1. Enzyme cắt giới hạn

Trong thiên nhiên, các vi khuẩn thường bị kí sinh bởi các virus với DNA. Để tự bảo vệ, tránh sự xen của DNA phage, vi khuẩn tạo các enzyme cắt hạn chế để cắt DNA virus, nói cách khác để hạn chế sự tồn tại của DNA lạ. Hiện tượng giới hạn và enzyme giới hạn do Hamilton Smith phát hiện đầu tiên (1970) ở vi khuẩn *Hemophilus influenzae*. Chúng R_d đặt tên là *Hind II*. Enzyme giới hạn (Restriction Enzyme) thuộc nhóm enzyme endonuclease, cắt các liên kết trong phân tử DNA.

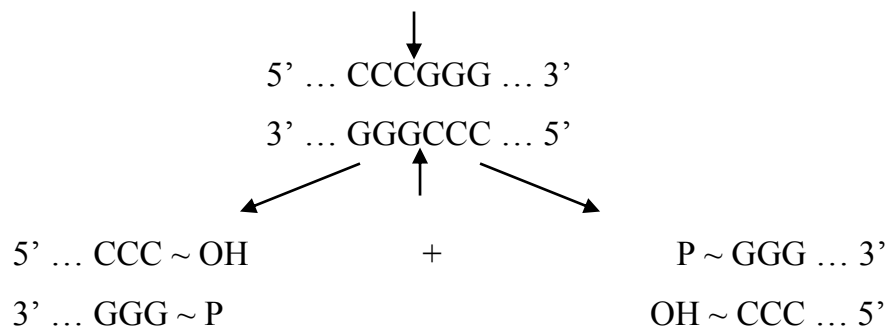
Các enzyme cắt giới hạn có đặc tính cắt DNA không đặc hiệu loài, nghĩa là enzyme cắt giới hạn tách chiết từ vi khuẩn có thể cắt DNA của tế bào động vật, thực vật và vi khuẩn khác ở cùng vị trí giới hạn hay điểm giới hạn. Số lượng và kích thước đoạn cắt dài hay ngắn tùy thuộc vào số lượng điểm giới hạn trên phân tử DNA. Bản đồ trình tự các vị trí cắt bởi enzyme giới hạn gọi là bản đồ giới hạn.

Mỗi loại enzyme giới hạn chỉ hoạt động tốt trong những điều kiện nhất định về nhiệt độ và dung dịch đệm thích hợp. Tiến hành phản ứng của các enzyme giới hạn cần thực hiện trong một thể tích càng nhỏ càng tốt để enzyme cắt giới hạn tiếp xúc tốt với cơ chất.

Mỗi enzyme giới hạn nhận biết và cắt đặc hiệu một đoạn DNA từ 4 – 6 cặp nucleotide (nếu 4 loại nucleotide của phân tử DNA sắp xếp ngẫu nhiên có bốn kiểu sắp xếp khác nhau). Trường hợp enzyme giới hạn nhận biết trình tự DNA đặc hiệu gồm bốn cặp nucleotide, cứ $4^4 = 256$ cặp nucleotide có một vị trí cắt. Khi các enzyme giới hạn nhận biết trình tự DNA đặc hiệu có 6 cặp nucleotide, cứ $4^6 = 4096$ cặp nucleotide có một chỗ bị cắt. Mỗi enzyme giới hạn nhận biết và cắt đặc hiệu một đoạn DNA ở những vị trí nhất định. Có hai kiểu cắt khác nhau là cắt tạo đầu bằng và cắt tạo đầu dính.

Enzyme giới hạn cắt cả 2 mạch DNA cùng một điểm tạo các đầu bằng (blunt ends). Các đầu bằng bị cắt của phân tử DNA không có khả năng tự kết hợp lại với nhau. Để nối các đoạn DNA với nhau cần sử dụng enzyme nối DNA ligase, hoặc các adaptor chuyên dụng cho mỗi loại enzyme.

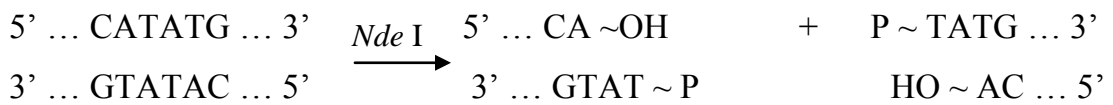
Ví dụ: Enzyme *Sma* I cắt tạo đầu bằng giữa các đoạn 6 bp



Nhiều enzyme giới hạn nhận biết và cắt phân tử DNA ở các vị trí lệch nhau giữa hai mạch đơn, tạo nên các đầu dính (cohesive ends). Các đầu dính tạo nên sau khi cắt có thể tự nối lại với nhau không cần sự có mặt của enzyme nối DNA ligase, nhờ đặc

tính này enzyme giới hạn cắt đầu dính được sử dụng nhiều trong công nghệ DNA tái tổ hợp (T.A. Brown, 1997).

Ví dụ: Vị trí phân cắt phân tử DNA của enzyme *Nde* I



2.6.2. Enzyme nối

Phản ứng nối giữa một đoạn phân tử DNA và vector đã mở vòng bằng enzyme cắt giới hạn liên quan đến sự hình thành liên kết cộng hóa trị giữa gốc phosphate và gốc hydroxyl của hai phân tử DNA mạch đôi liền kề. Sự hình thành liên kết này có thể được xúc tác bởi enzyme T_4 DNA ligase.

2.7. NGUYÊN TẮC ĐỌC TRÌNH TỰ

2.7.1. Phương pháp đọc trình tự của Sanger

Phương pháp “sequencing” do Sanger và cộng sự tìm ra năm 1977, họ dùng một DNA polymerase để tổng hợp một bản sao có tính chất bổ sung từ dây nền của phân tử DNA. Mỗi dây đơn của DNA được tác động với một môi trường tương ứng trong phản ứng polymer. Trong các phản ứng tổng hợp sợi bổ sung, dideoxynucleotide được bổ sung vào thành phần phản ứng. Dideoxynucleotide (ddNTP) là các deoxynucleotide đã được khử nhóm OH ở 3', khi dideoxynucleotide gia nhập vào chuỗi, sự kéo dài chuỗi sẽ ngưng lại. Các ddNTP được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ P^{32} . Mỗi chương trình với một loại ddNTP đều có phân chung đầu 5' nhưng mỗi đầu có sự thay đổi chiều dài ở vị trí 3'. Sau khi ủ DNA, trộn lại và làm nóng lên sau đó dùng điện di tách băng DNA với sợi đơn DNA được đánh dấu phóng xạ. Mã trình tự có thể được đọc trực tiếp từ dấu hiệu phóng xạ.

2.7.2. Giải mã trình tự bằng hệ thống tự động

Nguyên tắc chung của máy giải trình tự gen tự động dựa trên cơ sở phương pháp dideoxy. Máy đọc trình tự cả trên hai mạch đơn, do vậy có thể phát hiện và giảm các nhầm lẫn do kỹ thuật. Cả hai loại primer xuôi và ngược đều được sử dụng để đọc cả hai mạch đơn DNA.

Giải trình tự theo phương pháp tự động không phải dùng chất phóng xạ mà sử dụng các chất huỳnh quang để đánh dấu DNA, máy sequencer có thể phát hiện cùng một lúc hiện tượng huỳnh quang ở bốn độ dài sóng khác nhau (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999).

Phần III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

3.1. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

Thời gian được tiến hành từ 2/2006 đến 7/2006 tại phòng thí nghiệm sinh học phân tử, công ty NTL Biotech.

3.2. VẬT LIỆU

Hóa chất và vật liệu được sử dụng trong khóa luận này được cung cấp từ các công ty có uy tín như: Qiagen, Invitrogen, Promega, Merck...

3.2.1. Vật liệu làm thí nghiệm

Vật liệu làm thí nghiệm gồm có: 6 đoạn oligonucleotide, 2 primer Reverse và Forward, vi khuẩn Top10F', plasmid pGEM-T.

3.2.1.1. Sáu đoạn oligonucleotide và hai primer

Sáu đoạn oligonucleotide được thiết kế để tổng hợp gen IFN- α 2a.

1. 5'- TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAT AGC CTG GGC AGC CGT CGT ACC CTG ATG CTG CTG GCG CAG ATG CGT AAA ATC AGC CTG TTT AGC TGC CTG AAA GAT CGT -3' (99)
2. 5'- CTG GAT CAT TTC ATG CAG AAC CGG GAT GGT TTC CGC TTT CTG AAA CTG GTT GCC AAA TTC TTC CTG CGG AAA GCC AAA ATC ATG ACG ATC TTT CAG GCA GCT -3' (102)
3. 5'- GTT CTG CAT GAA ATG ATC CAG CAG ATC TTT AAC CTG TTT AGC ACC AAA GAT AGC AGC GCG GCG TGG GAT GAA ACC CTG CTG GAT AAA TTT TAT ACC GAA -3' (99)
4. 5'- ATC TTC TTT CAT CAG CGG GGT TTC GGT AAC GCC AAC GCC CTG GAT AAC GCA CGC TTC CAG ATC GTT CAG CTG CTG ATA CAG TTC GGT ATA AAA TTT ATC CAG -3' (102)
5. 5'- CCG CTG ATG AAA GAA GAT AGC ATC CTG GCG GTT CGT AAA TAT TTT CAG CGT ATC ACC CTG TAT CTG AAA GAA AAA AAA TAT AGC CCG TGC GCG TGG GAA -3' (96)
6. 5'- GGA TCC TCA TTC CTT ACT ACG CAG GCT TTC CTG CAG GTT GGT GCT CAG GCT AAA GCT ACG CAT GAT TTC CGC ACG AAC AAC TTC CCA CGC GCA CGG GCT -3' (96)

Hai primer được thiết kế cho chạy phản ứng PCR. Primer Forward chứa một trình tự nhận biết enzyme cắt *Xho* I và primer Reverse chứa vị trí cắt *Xba* I.

Forward primer

5'-TCTCGAGAAAAGATGTGATCTGCCTCAAACCCATAG-3' (*Xho* I)

Reverse primer

5'-CTTAATTCTAGATTATTCCTTACTACGCAGGCTTTC-3' (*Xba* I)

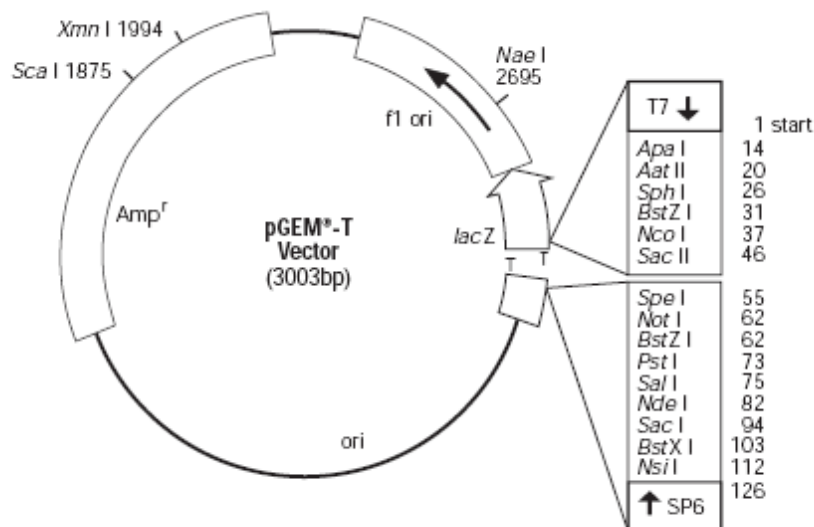
3.2.1.2. Vi khuẩn *E. coli* Top10 F'

Đây là chủng dùng để biến nạp và nhân nhanh số lượng plasmid và cho phép xảy ra hiện tượng α -complementation. Kiểu gen như sau:

F' {*lacIq*, Tn10(TetR)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*.

3.2.1.3. Plasmid pGEM-T

Đây là plasmid được sử dụng trong cloning và giải trình tự. Plasmid này chứa vùng MSC (vùng gen được chèn) với trình tự nhận biết của 15 enzyme cắt giới hạn. Và chứa vùng trình tự promoter T7 và promoter SP6 có thể được dùng trong giải trình tự đoạn gen chèn.



Hình 3.1: Vector pGEM-T

3.2.2. Dụng cụ thí nghiệm

Đĩa petri, ống nghiệm, lọ thủy tinh, bình tam giác, pipet, đầu tít, eppendorf các loại, ống falcon, cuvette 0,2 cm...

3.2.3. Thiết bị máy móc

Tủ cấy vô trùng, thiết bị điện di, tủ vi khí hậu, máy lắc vi khuẩn, máy ly tâm, tủ sấy, máy đo OD, thiết bị PCR, máy chụp gel, lò vi sóng, tủ lạnh, nồi hấp...

3.2.4. Hóa chất sử dụng

Hóa chất sử dụng trong PCR

Taq DNA polymerase, ThermoPol buffer, dNTPs, MgCl₂, Platinum® *Pfx* DNA Polymerase.

Hóa chất sử dụng cho tách plasmid

TE	+ Tris-HCl (pH 8)	10 mM
	+ EDTA	1 mM
Dung dịch II	+ NaOH	200 mM
	+ SDS	1 %
Dung dịch III	+ Potassium acetate	0,3 M
	+ Acetic acide	11,5 ml/l

Hóa chất sử dụng cho điện di

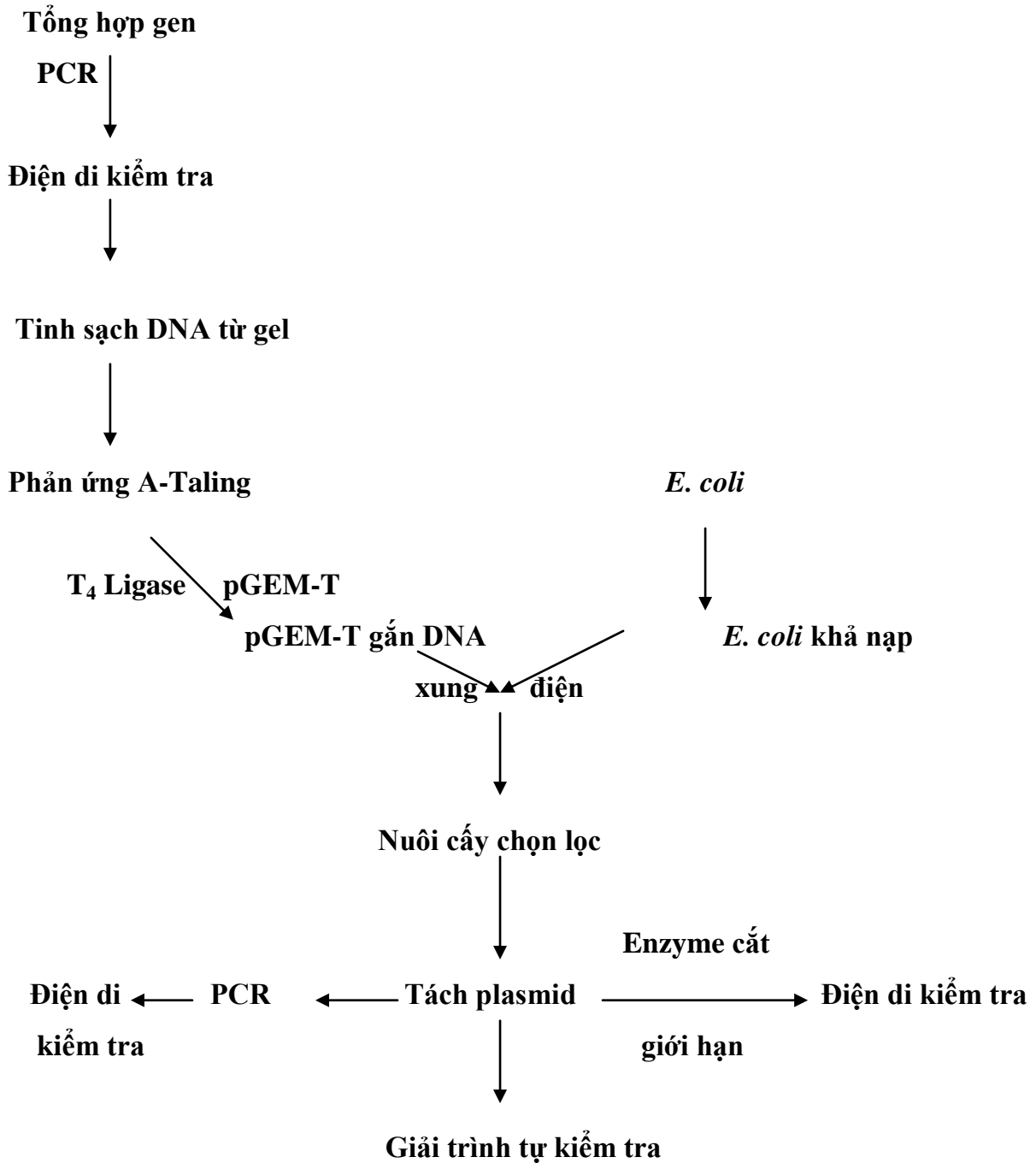
Loading buffer	+100 % glycerol	5 ml
	+TE 5X buffer	2,5 ml
	+Bromphenol Blue	0,015 ml
TAE 50X	+ Tris-Base	242 g/l
	+ Acetic acide	57,1 ml/l
	+ EDTA (pH 8)	50 mM

Các loại môi trường nuôi cấy và biến nạp

- Môi trường LB lỏng có tetracyclin (10 g pepton, 5 g bacto yeast extract, 5 g NaCl trên 1 lít +10 µg/ml tetracyclin).
- Môi trường LB lỏng có tetracyclin và ampicillin (10 g pepton, 5 g bacto yeast extract, 5 g NaCl trên 1 lít + 10 µg/ml tetracyclin + 100 µg/ml ampicillin).
- Môi trường LB agar có tetracyclin (10 g pepton, 5 g bacto yeast extract, 5 g NaCl, 15 g agar +10 µg/ml tetracyclin).
- Môi trường LB agar có tetracyclin và ampicillin (10 g pepton, 5 g bacto yeast extract, 5 g NaCl, 15 g agar + 10 µg tetracyclin + 100 µg ampicillin, 0,5 mM IPTG, 80 µg/ml X-Gal).

3.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tóm tắt quy trình nghiên cứu:



3.3.1. Tổng hợp đoạn gen IFN- α 2a bằng PCR và chạy điện di kiểm tra

3.3.1.1. Tổng hợp đoạn gen

Sử dụng 6 đoạn oligonucleotide được thiết kế ở trên. Những đoạn oligonucleotide này có 18 đến 21 nucleotide ở đầu 5' và 3' có khả năng bắt cặp bổ sung với nhau. Phản ứng tổng hợp gen IFN- α 2a được thực hiện qua hai bước:

- Bước nối các oligonucleotide, các oligonucleotide được biến tính ở 94°C trong khoảng 1 phút, phản ứng nối gồm 15 chu kỳ nhiệt như sau:

94°C	30 giây	} 15 chu kỳ
50°C	30 giây	
72°C	40 giây	

Chuẩn bị phản ứng 48 μ l gồm các thành phần sau:

Mỗi oligonucleotide (15 μ M)	1 μ l
Platinum® <i>Pfx</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)	1 μ l
dNTPs (10 mM)	5 μ l
10X PCR buffer	5 μ l
Nước khử ion	31 μ l

- Bước thực hiện phản ứng PCR: sau khi thực hiện xong việc nối các oligonucleotide, 1 μ l của mỗi primer Forward và Reverse được thêm vào phản ứng. Sau đó phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình sau:

94°C	1 phút	} 30 chu kỳ
94°C	30 giây	
50°C	30 giây	
72°C	35 giây	
72°C	3 phút	

3.3.1.2. Chạy điện di kiểm tra

Chuẩn bị đổ gel, gắn lược vào khuôn; cân 0,5 g agarose cho vào 50 ml 1X TAE sau đó đun nóng bằng lò vi sóng khoảng 2 phút. Cho thêm khoảng 2 μ l ethiumbromide lắc đều. Để nguội khoảng 50 – 60°C, đổ gel vào khuôn. Khi gel đã nguội gỡ lược ra khỏi gel, sau đó đặt gel vào bồn điện di đã có sẵn 1X TAE một cách nhẹ nhàng.

Chuẩn bị một miếng parafilm hút 4 μ l loading buffer cho mỗi mẫu điện di, hút mẫu cần điện di trộn đều với loading buffer, hút toàn bộ dung dịch vừa trộn vào giếng. Đậy nắp bồn điện di, cắm điện cực, chạy với hiệu điện thế 100 V, thời gian 30 phút. Sau khi điện di xong lấy gel ra và đọc kết quả dưới tia UV.

3.3.2. Tinh sạch DNA từ gel và thực hiện phản ứng A-Tailing cho đoạn DNA

Quy trình tinh sạch DNA từ gel

Nhằm phân tách và thu nhận đoạn gene IFN- α 2a mong muốn từ bản gel agarose sau khi điện di. Phương pháp sử dụng bộ kit QIAquick Gel Extraction của Qiagen. Quy trình thực hiện như sau:

Bước 1: Gel sau khi chạy điện di, được đưa lên hệ thống UV.

Bước 2: Dùng dao sạch cắt phần gel chứa băng DNA cần được tinh sạch cho vào eppendorf 1,5 ml.

Bước 3: Thêm buffer QG vào eppendorf chứa gel trên với tỷ lệ 100 mg gel \approx 300 μ l buffer QG.

Bước 4: Đậy nắp lại ủ ở 50°C khoảng 10 – 15 phút cho đến khi agarose tan hoàn toàn.

Bước 5: Sau khi gel đã tan, kiểm tra màu của hỗn hợp gel. Nếu có màu cam hoặc tím, thêm 10 μ l 3 M sodium acetate pH 5,0 và trộn để hỗn hợp chuyển sang màu vàng.

Bước 6: Thêm isopropanol vào eppendorf với tỷ lệ 100 mg gel \approx 100 μ l isopropanol.

Bước 7: Chuẩn bị cột QIAquick, đặt vào eppendorf tương ứng với số mẫu cần tinh sạch.

Bước 8: Hút mẫu cho vào các cột đã chuẩn bị ở trên, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ phần dịch.

Bước 9: Thêm 0,75 ml buffer PE, ly tâm 13000 vòng/ phút trong 1 phút.

Bước 10: Loại bỏ phần dịch ở dưới, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút.

Bước 11: Lấy cột ra và để vào eppendorf 1,5 ml.

Bước 12: Thêm 50 μ l buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) vào cột. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút. Thu dịch chứa DNA.

Thực hiện phản ứng A-Tailing

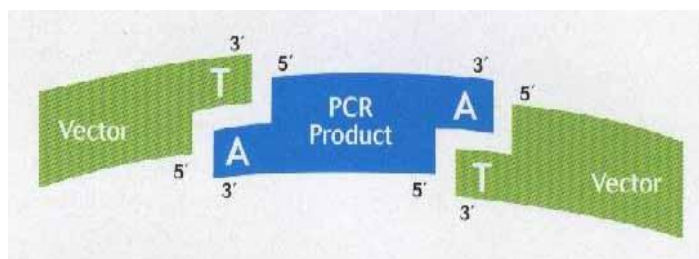
Phản ứng nhằm gắn dATP vào hai đầu 3' của đoạn gen IFN- α 2a. Phản ứng 10 μ l bao gồm:

Sản phẩm PCR	7 μ l
10X buffer PCR	1 μ l
dATP (10 mM)	0,5 μ l
Taq DNA polymerase	0,5 μ l
H ₂ O	1 μ l

Trộn nhẹ bằng pipet, ủ ở 72°C khoảng 15 – 30 phút.

3.3.3. Thực hiện phản ứng nối DNA đã được A-Tailing vào plasmid pGEM-T

Nguyên tắc: dATP ở đầu 3' của gen IFN- α 2a sẽ bắt cặp bổ sung với dTTP ở đầu 3' của vector pGEM-T nhờ enzyme T₄ ligase.



Hình 3.2: Mô hình nối gen chèn vào vector pGEM-T

Thực hiện phản ứng nối 10 μ l với những thành phần như sau:

- 2X buffer 5 μ l
- IFN- α 2a đã gắn A 3 μ l
- Vector pGEM-T 1 μ l
- T₄ ligase (1 U/ μ l) 1 μ l

Trộn phản ứng bằng pipet và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

3.3.4 Chuẩn bị tế bào khả nạp và thực hiện phản ứng biến nạp

Chuẩn bị tế bào khả nạp

Bước 1: Trãi một ít giống lên đĩa môi trường LB có chứa 10 μ g/ml tetracyclin, nuôi qua đêm ở 37°C.

Bước 2: Chọn một khuẩn lạc đường kính 2 – 3 mm vào một ống nghiệm chứa 2 – 5 ml môi trường LB có tetracyclin, nuôi cấy ở tủ lắc 37°C qua đêm.

Bước 3: Hút dịch nuôi cấy qua đêm vào lọ thủy tinh chứa 100 ml môi trường LB có tetracyclin. Khi OD đạt khoảng 0,7 chuyển lọ chứa môi trường nuôi cấy sang thùng đá giữ lạnh trong 10 phút.

Bước 4: Ly tâm dịch tế bào 5000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C.

Bước 5: Sau khi ly tâm đổ bỏ phần dịch nổi, giữ lại phần tủa.

Bước 6: Thêm 20 ml glycerol 10 %, vortex nhẹ nhàng sau đó ly tâm 5000 vòng trong 10 phút ở 4°C, đổ bỏ phần dịch nổi. Lặp lại bước này 2 lần.

Bước 7: Thêm khoảng 300 μ l glycerol 10 %, lắc nhẹ cho tế bào tan ra. Hút khoảng 40 μ l cho vào mỗi eppendorf 1,5 ml, trữ ở -70°C.

Thực hiện phản ứng biến nạp

Sử dụng phương pháp chuyển gen xung điện. Sử dụng một điện trường mạnh trong thời gian ngắn làm tạm thời mất tính ổn định của màng tế bào và tạo thành các lỗ trên màng cho DNA plasmid đi qua. Quy trình thực hiện như sau:

Bước 1: Lấy ống eppendorf chứa 40 μ l tế bào khả nạp từ -70°C ra và đặt trên đá cho tế bào tan ra, thêm 1 μ l DNA plasmid, trộn nhẹ nhàng bằng pipet.

Bước 2: Cho hỗn hợp tế bào vào cuvette 0,2 cm, để trên đá khoảng 1 phút.

Bước 3: Để cuvette vào máy cho dòng điện 2,5 kV đi qua.

Bước 4: Thêm 200 μ l môi trường LB lỏng vào cuvette, ủ ở 37°C cho 1 giờ.

Bước 5: Hút lần lượt khoảng 40 μ l, 60 μ l và 100 μ l cấy sang các đĩa môi trường LB agar chứa tetracyclin và ampicillin. Nuôi ở 37°C qua đêm.

3.3.5. Chọn lọc khuẩn lạc mong muốn

Nguyên tắc của chọn lọc khuẩn lạc mong muốn là dựa vào kháng sinh ampicillin và phản ứng tạo màu của X-Gal trên môi trường có IPTG.

Sau khi ủ qua đêm, trên đĩa sẽ xuất hiện những khuẩn lạc màu trắng và màu xanh. Những khuẩn lạc màu trắng thường chứa plasmid mang gene ngoại lai. Để kiểm tra sự hiện diện của đoạn gene trong vector tạo dòng chúng tôi tiến hành chọn khoảng 10 khuẩn lạc cho vào 10 ống nghiệm chứa 5 ml môi trường LB lỏng có tetracyclin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) và ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nuôi cấy qua đêm ở trong tủ lắc 37°C .

3.3.6. Quy trình tách plasmid

Bước 1: Hút 1,5 ml dịch vi khuẩn đã nuôi cấy qua đêm ở 37°C vào eppendorf, ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 2: Loại bỏ phần dịch nổi, thêm 100 μ l TE, vortex cho đến khi tế bào tan hết.

Bước 3: Thêm 200 μ l dung dịch II, đảo nhẹ.

Bước 4: Thêm 150 μ l dung dịch III, đảo nhẹ, để vào trong đá khoảng 10 phút.

Bước 5: Ly tâm 13000 vòng/phút khoảng 5 phút. Hút phần dịch nổi chuyển qua eppendorf có 900 μ l ethanol 100 %. Giữ trong đá khoảng 10 phút.

Bước 6: Ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ phần dịch nổi, giữ tủ lạnh.

Bước 7: Rửa tủ bằng 500 μ l ethanol 70 %, ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ phần dịch nổi. Lập lại hai lần bước này.

Bước 8: Để khô mẫu, thêm vào mỗi eppendorf 40 μ l TE.

Sau khi tách plasmid, thực hiện điện di trên gel agarose theo quy trình 3.3.1.2 để kiểm tra.

3.3.7. Chạy PCR kiểm tra

Sau khi tách plasmid theo quy trình 3.3.6 và kiểm tra chúng tôi thực hiện phản ứng PCR để nhân đoạn gen chèn. Phản ứng 25 μ l với những thành phần sau:

- 10X PCR buffer	2,5 μ l
- dNTPs 10 mM	2 μ l
- primer Forward 2 μ M	1 μ l
- primer Reverse 2 μ M	1 μ l
- Tag DNA polymerase (5 U/ μ l)	0,25 μ l
- Plasmid	2 μ l
- H ₂ O	16,25 μ l

Thực hiện phản ứng theo chương trình chạy PCR tổng hợp gen ở 3.3.1.1. Sau khi chạy PCR thực hiện chạy điện di như quy trình 3.3.1.2 để kiểm tra đoạn gen chèn.

3.3.8 Thực hiện phản ứng cắt plasmid bằng enzyme giới hạn

Sau khi kiểm tra bằng phương pháp PCR, chúng tôi thực hiện phản ứng cắt plasmid bằng enzyme giới hạn để khẳng định sự hiện diện của đoạn gen. Enzyme giới hạn được dùng ở đây là *Xho*I và *Xba*I. Trộn phản ứng 20 μ l với những thành phần sau:

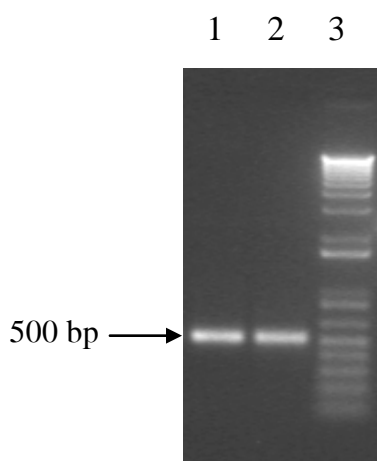
Plasmid	7 μ l
10X buffer	2 μ l
BSA 100X	0,2 μ l
<i>Xho</i> I (20 U/ μ l)	0,3 μ l
<i>Xba</i> I (20 U/ μ l)	0,3 μ l
H ₂ O	10,2 μ l

Trộn phản ứng nhẹ nhàng, sau đó ủ ở 37°C trong 2 giờ. Dem điện di xem kết quả.

PHẦN IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Phản ứng tổng hợp IFN- α 2a

Như chúng ta đã biết IFN- α 2a là một đoạn gen nằm trên NST số 9 ở người. Để có được đoạn gen IFN- α 2a người ta có thể phân lập đoạn gen này từ genome hoặc tổng hợp nhân tạo đoạn gen. Dựa vào những điều kiện của phòng thí nghiệm chúng tôi tiến hành với phương pháp tổng hợp nhân tạo. Những đoạn oligonucleotide ở đây sẽ được thiết kế sao cho phù hợp để *E. coli* có thể nhận biết trong quá trình dịch mã acid amin. Bên cạnh đó chúng tôi cũng thiết kế hai primer có vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn lần lượt trên từng primer là *Xho* I và *Xba* I để phục vụ cho quá trình kiểm tra sự hiện diện của đoạn gen và dễ dàng hơn trong quá trình chuyển gen vào vector biểu hiện sau này. Sau khi tiến hành tổng hợp gen IFN- α 2a từ 6 oligonucleotide ở trên cùng với 2 primer Forward và Reverse chúng tôi thực hiện điện di trên gel agarose 1 % và có kết quả sau:



Hình 4.1: Kết quả tổng hợp gen
1;2: Đoạn gen tổng hợp
3: Leader 1 kb plus

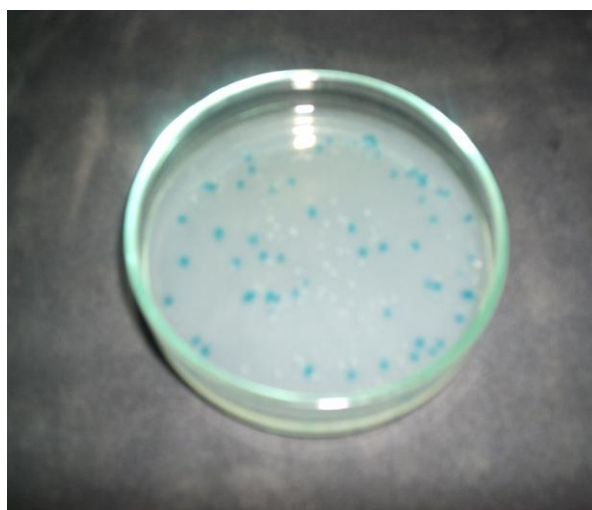
Kết quả ở hình 4.1 cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng 500 bp, phù hợp với kích thước đoạn gen mong muốn.

Để có được lượng DNA mong muốn sử dụng cho tạo dòng và thực hiện các biện pháp kiểm tra, chúng tôi tiến hành tinh sạch đoạn DNA này từ gel. Ở khóa luận này chúng tôi sử dụng bộ kit QIAquick Gel Extraction (của hãng Qiagen). Sau khi tinh sạch chúng tôi thực hiện kiểm tra trên gel.

4.2. Tạo dòng phân tử IFN- α 2a

4.2.1. Kết quả biến nạp

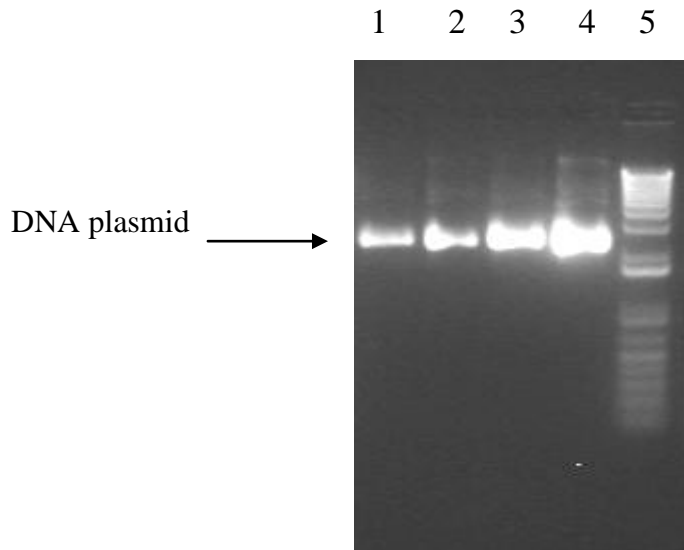
Sau khi DNA được tinh sạch, chúng tôi thực hiện phản ứng A-Tailing để gắn dATP vào các đầu 3' của sợi DNA. Tiếp đó DNA này sẽ được chèn vào vector pGEM-T nhờ enzyme T₄ ligase. Vector đã được gắn gen sẽ được chuyển vào vi khuẩn *E. coli* Top10F' nhờ phương pháp biến nạp bằng xung điện. Sau khi biến nạp, để có thể xác định được những vi khuẩn nào mang vector có chứa đoạn gen chèn chúng tôi thực hiện chọn lọc dựa trên phương pháp α -complementation. Ủ dịch biến nạp ở 37°C khoảng 1 giờ sau đó cấy ra đĩa môi trường chọn lọc có ampicillin, tetracycline, X-Gal và IPTG, tiếp tục ủ qua đêm ở 37°C. Trên đĩa xuất hiện các khuẩn lạc màu xanh và màu trắng. Những khuẩn lạc màu trắng thường chứa vector có đoạn gen chèn mong muốn, những khuẩn lạc màu xanh chứa vector tái bắt vòng.



Hình 4.2: Kết quả cấy vi khuẩn biến nạp trên môi trường chọn lọc chứa ampicillin (100 μ g/ml), tetracyclin (10 μ g/ml) và X-Gal/IPTG.

4.2.2. Tách plasmid

Sau khi chọn lọc được vi khuẩn trên môi trường chọn lọc, để có thể kiểm tra xem vi khuẩn có vector chứa gen hay không đồng thời để có mẫu vector biến nạp đem đọc trình tự thì phải có được plasmid từ vi khuẩn mà chúng ta nghi ngờ là mang gen mong muốn. Chúng tôi chọn đĩa có nhiều khuẩn lạc rời, sau đó dùng đầu tip sạch chấm từng khuẩn lạc lớn màu trắng cấy sang môi lỏng chọn lọc có ampicillin và tetracyclin, nuôi cấy tới khi OD đạt khoảng 0,7 thì tiến hành tách plasmid. Sau đó chúng tôi chạy điện di trên gel agarose 1 % để kiểm tra:



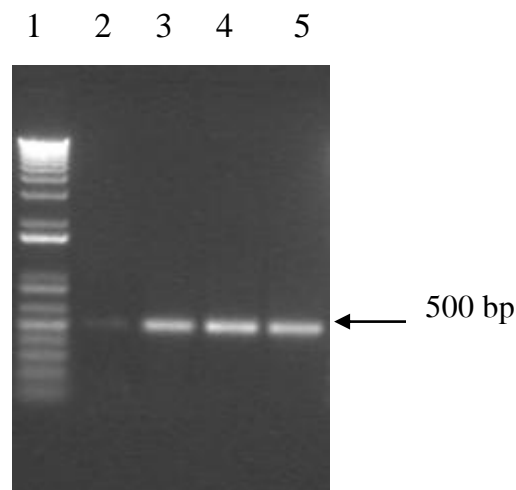
Hình 4.3: Kết quả điện di plasmid trên gel agarose 1 %
1, 2, 3, 4: Sản phẩm DNA plasmid chiết tách
5: Leader 1 kb plus

Kết quả cho thấy đã tách plasmid thành công. Những plasmid này sẽ được kiểm tra bằng enzyme cắt và PCR để xác định sự hiện diện của đoạn gen IFN- α 2a.

4.3. Kết quả kiểm tra

4.3.1. Kiểm tra PCR

Để kiểm tra đoạn gen chèn trong vector chúng tôi thực hiện phản ứng PCR. Chúng tôi thực hiện PCR kiểm tra với hai primer Forward và Reverse:

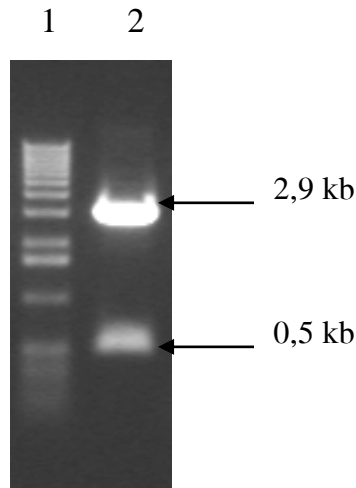


Hình 4.4: Kết quả PCR kiểm tra
1: Leader 1 kb plus
2, 3, 4, 5: Sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 500 bp chứng tỏ đã có đoạn gen IFN- α 2a chèn mong muốn.

4.3.2. Cắt bằng enzyme giới hạn

Sau khi kiểm tra bằng PCR có kết quả mong muốn, để có thể khẳng định thêm phần chính xác sự hiện diện của đoạn gen chèn chúng tôi kiểm tra bằng phản ứng cắt giới hạn với hai enzyme *XhoI* và *XbaI*.



Hình 4.5 Kiểm tra bằng enzyme cắt
1: Leader 1 kb
2: Sản phẩm plasmid được cắt

Kết quả cho thấy sau khi cắt plasmid xuất hiện hai băng ở khoảng kích thước mong muốn.

4.4. Kết quả giải trình tự

Sau khi qua các phương pháp kiểm tra bằng điện di plasmid, PCR có kết quả mong muốn chúng tôi gửi mẫu để giải trình tự. Cặp mồi được sử dụng để giải trình tự là: T7 promoter và SP6, đây là hai mồi có vị trí bắt cặp bổ sung trên trình tự DNA của vector pGEM-T.

```
TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAT AGC CTG GGC AGC CGT CGT ACC CTG ATG
CTG CTG GCG CAG ATG CGT AAA ATC AGC CTG TTT AGC TGC CTG AAA GAT
CGT CAT GAT TTT GGC TTT CCG CAG GAA GAA TTT GGC AAC CAG TTT CAG
AAA GCG GAA ACC ATC CCG GTT CTG CAT GAA ATG ATC CAG CAG ATC TTT
AAC CTG TTT AGC ACC AAA GAT AGC AGC GCG GCG TGG GAT GAA ACC CTG
CTG GAT AAA TTT TAT ACC GAA CTG TAT CAG CAG CTG AAC GAT CTG GAA
GCG TGC GTT ATC CAG GGC GTTGGC GTT ACC GAA ACC CCG CTG ATG AAA
GAA GAT AGC ATC CTG GCG GTT CGT AAA TAT TTT CAG CGT ATC ACC CTG
TAT CTG AAA GAA AAA AAA TAT AGC CCG TGC GCG TGG GAA GTT GTT CGT
GCG GAA ATC ATG CGT AGC TTT AGC CTG AGC ACC AAC CTG CAG GAA AGC
CTG CGT AGT AAG GAA TGA
```

Hình 4.6: Trình tự đoạn gen IFN- α 2a tổng hợp được

Kết quả giải trình tự được dịch mã sang trình tự acid amin nhờ công cụ dịch mã (translate tool) của ExPASy. Sau đó sẽ được so sánh với trình tự acid amin của IFN- α 2a trên ngân hàng gen NCBI.

```
100.0% identity in 165 residues overlap; Score: 851.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 1 CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMI
UserSeq2, 1 CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMI
*****

UserSeq1, 61 QQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVR
UserSeq2, 61 QQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVR
*****

UserSeq1, 121 KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
UserSeq2, 121 KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
*****
```

Hình 4.7: Kết quả so sánh trình tự acid amin

Kết quả cho thấy trình tự acid amin của đoạn gen tổng hợp được tương đồng với trình tự acid amin trên ngân hàng gen NCBI là 100 %.

PHẦN V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ những kết quả thu được chúng tôi có những kết luận sau:

- Tối ưu hóa được quy trình tổng hợp gen IFN- α 2a bằng kỹ thuật PCR.
- Tạo dòng thành công gen IFN- α 2a trong vi khuẩn *E. coli* và thu nhận được trình tự DNA có thể mã hóa để nhận được trình tự acid amin đúng phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

5.2. Đề nghị

Trong khóa luận này chúng tôi đã tổng hợp thành công gen IFN- α 2a, đồng thời kết quả giải trình tự cũng cho thấy trình tự acid amin là đúng. Từ đó chúng tôi có một số đề nghị như sau:

- Thực hiện chuyển gen IFN- α 2a vào vector biểu hiện và chuyển vào *E. coli* phù hợp cho sản xuất interferon.
- Tiếp tục nghiên cứu biểu hiện gen IFN- α 2a trên *E. coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bùi Chí Bửu – Nguyễn Thị Lang, 1999. *Di truyền phân tử - Những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. TP Hồ Chí Minh.
2. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1998. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Giáo Dục.
3. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
4. Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2005. *Sinh học phân tử giới thiệu phương pháp và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
5. Phạm Hoàng Phiệt, 1999. *Miễn dịch sinh lý bệnh (tập 1)*. Nhà xuất bản thành phố Hồ Chí Minh.
6. Bùi Trang Việt, 2002. *Bài giảng sinh học phân tử (chương trình cao học)*. Nhà xuất bản đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Tài liệu nước ngoài

7. T.A. Brown, 1997. *Gene cloning an introduction (third edition)*. Chapman and Hall.
8. Daniel j.j. Carr, 2005. *Interferon methods and protocols*. Humana Press Totowa, New Jersey.
9. Eric Dieperink, M.D., Mark Willenbring, M.D. and Samuel B. Ho, M.D. Neuropsychiatric Symptoms Associated With Hepatitis C and Interferon Alpha: A Review. *Am J Psychiatry* 157:867-876, June 2000.
10. Fernanda O. Neves et al. Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 35 (2004) 353–359.
11. DV Goeddel, H M Shepard, E Yelverton, D Leung, R Crea, A Sloma, and S Pestka. Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 1980 September 25; 8(18): 4057–4074.
12. Isaacs, A. and Lindenmam, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Lond. B. Biol. Sci.* 174, 258.

13. M.J. McPherson and S.G. Møller, 2000. *PCR*. Springer.
14. Mullis K et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
15. Poonam Srivastava et al. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 41 (2005) 313–322.
16. F. H. Reynolds, JR., E. Premkumart, and P. M. Pitha. Interferon activity produced by translation of human interferon messenger RNA in cell-free ribosomal systems and in *Xenopus oocytes*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 72, No. 12, pp. 4881-4885, December 1975 Biochemistry*.
17. Sambrook and Russell. *Molecular cloning - Laboratory manuals, volume 2*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
18. Scott M. Lippman. 13-cis-Retinoic Acid and Interferon α -2a: Effective Combination. Therapy for Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Journal of the National Cancer Institute, Vol. 84, No. 4, 235-241, February 19, 1992*.
19. Spiegel RJ. Intron A (Interferon Alfa-2B): clinical overview and future directions. *Seminars in Oncology* 13(3, Suppl 2): 89-101, 1986.
20. Woojin Jeong and Hang-Cheol Shin. Supply of the argU gene product allows high-level expression of recombinant human interferon-a2a in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters, Vol 20, No 1, January 1998, pp. 19–22*.

Tài liệu web

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=Nucleotide&dopt=GenBank&val=11067750>
2. <http://www.biochemeng.bio.titech.ac.jp/image/phage.jpg>
3. <http://www.bioon.com/experiment/UploadFiles/200412/20041221004623826.jpg>
4. [http://nsm1.utdallas.edu/bio/gonzalez/fall05/LECTURE07\(OVERHEAD\)_files/image024.jpg](http://nsm1.utdallas.edu/bio/gonzalez/fall05/LECTURE07(OVERHEAD)_files/image024.jpg)
5. <http://www.roche.com/pages/facets/10/interferon3de.jpg>

PHỤ LỤC

Phụ lục : Kết quả đọc trình tự từ Macrogen ở Hàn Quốc

>060308-02_N16_pGEM-2a-7-T7promoter.ab1 855 0 855 ABI
NNNNAACGGCTATCGAGCTCCGGCCCGCCTGGCCGCGGGATTGCGGCCGC
TCTAGATTATTCCTTACTACGCAGGCTTTCCTGCAGGTTGGTGCTCAGGC
TAAAGCTACGCATGATTTCCGCACGAACAACCTCCACGCGCACGGGCTA
TATTTTTTTTTCTTTCAGATACAGGGTGATACGCTGAAAATATTTACGAAC
CGCCAGGATGCTATCTTCTTTCATCAGCGGGGTTTCGGTAACGCCAACGC
CCTGGATAACGCACGCTTCCAGATCGTTCAGCTGCTGATACAGTTCGGTA
TAAAATTTATCCAGCAGGGTTTCATCCACGCCGCGCTGCTATCTTTGGT
GCTAAACAGGTTAAAGATCTGCTGGATCATTTCATGCAGAACC GGATGG
TTTCCGCTTTCTGAAACTGGTTGCCAAATTCTTCCTGCGGAAAGCCAAA
TCATGACGATCTTTCAGGCAGCTAAACAGGCTGATTTTACGCATCTGCGC
CAGCAGCATCAGGGTACGACGGCTGCCCAGGCTATGGGTTTGAGGCAGAT
CACATCTTTTCTCGAGAAATCACTAGTGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACCAT
ATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG
TCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAA
ATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG
TGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATAAATGCGNTG
CGCTCACTGCCNGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA
ATGAN



File: 060305-02_N16_pGEM-2a-7-T7promoter.ab1 Run Ended: 2006/03 23:7:35 Signal G:796 A:604 C:674 T:590
Sample: pGEM-2a-7-T7promoter Lane: 52 Base spacing: 14.219999 855 bases in 10165 scans Page 1 of 2

