

# Kỹ thuật Lai phân tử

Nguyễn Minh Hà

[drnguyenminhha@gmail.com](mailto:drnguyenminhha@gmail.com)

BM Hóa sinh – SHPTYH, Trường DHYK PNT

# Mục tiêu

- Nêu được nguyên lý chính của KT Lai phân tử
- Liệt kê được một số ứng dụng của các KT Lai phân tử khác nhau.

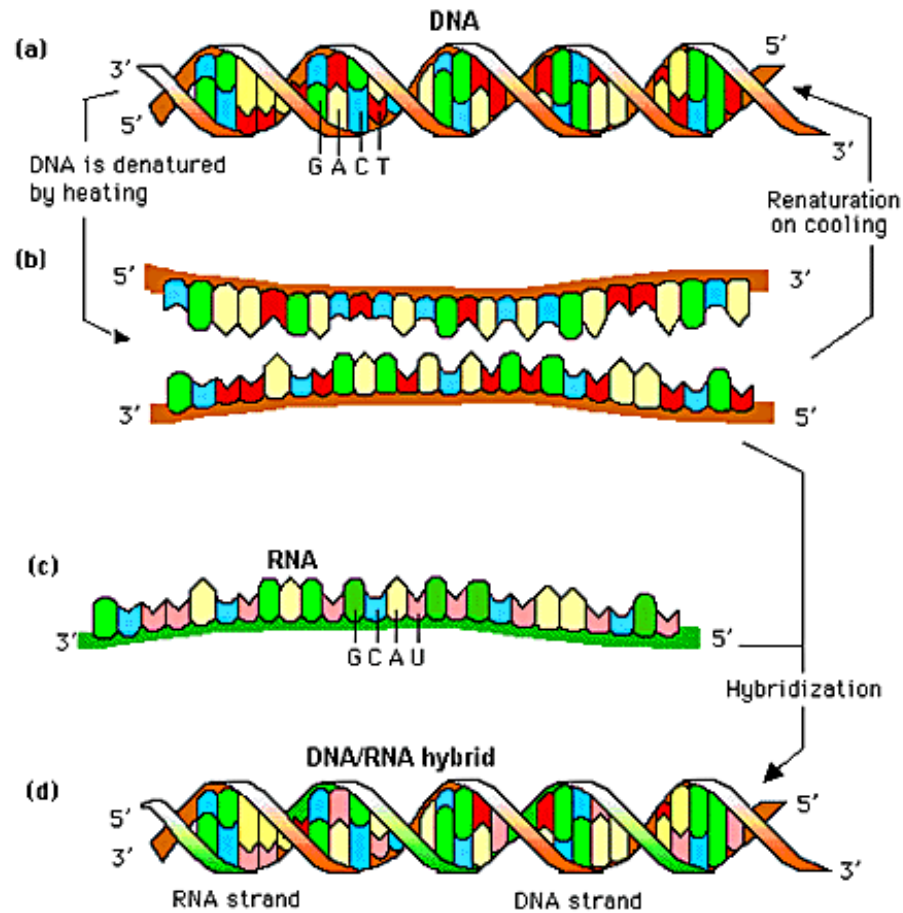
# Nội dung

- Nguyên lý
- Đoạn dò và phương pháp phát hiện
- Các KT Lai phân tử:
  - Northern blotting/Southern blotting
  - Dot blot/Microarray
  - FISH

# NGUYÊN LÝ

- Sự biến tính và hồi tính của DNA

Nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ )



Nhiệt độ bắt cặp ( $T_h$ )

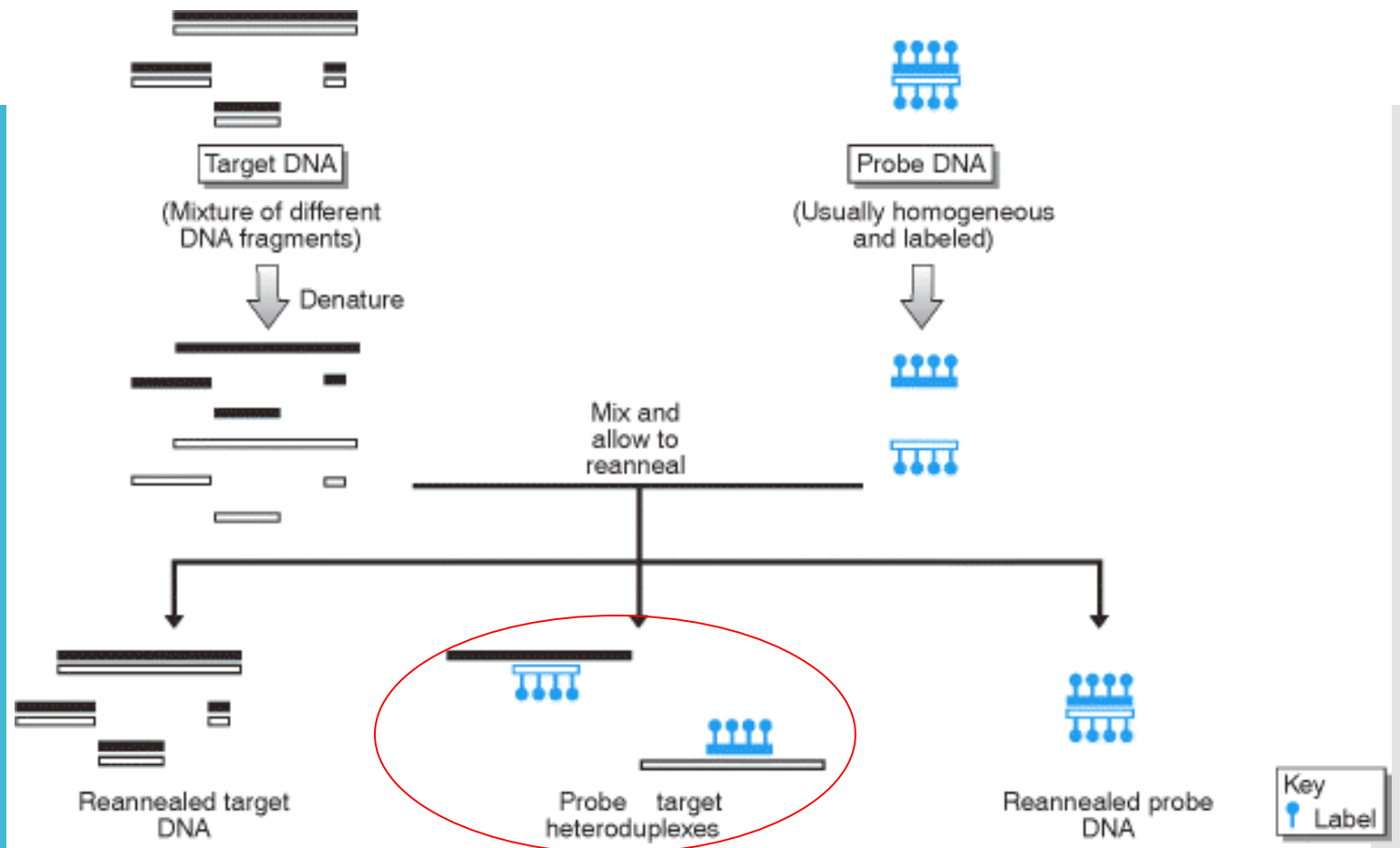
# NGUYÊN LÝ

- Là KT sử dụng các sợi đơn acid nucleic, được gọi là **đoạn dò (probe)**, bắt cặp bổ sung với một sợi đơn acid nucleic khác, được gọi là **phân tử đích (target)**.
- Nhằm phát hiện và/hoặc phân lập phân tử đích trong một hỗn hợp nhiều sợi acid nucleic.

# NGUYÊN LÝ

- Phân loại bản chất hóa học của phân tử lai trong hỗn hợp:
  - DNA:DNA
  - DNA:RNA
  - RNA:RNA
- Phân loại nguồn gốc của phân tử lai trong hỗn hợp :
  - Probe-Probe
  - Target-Target
  - **Target-Probe**

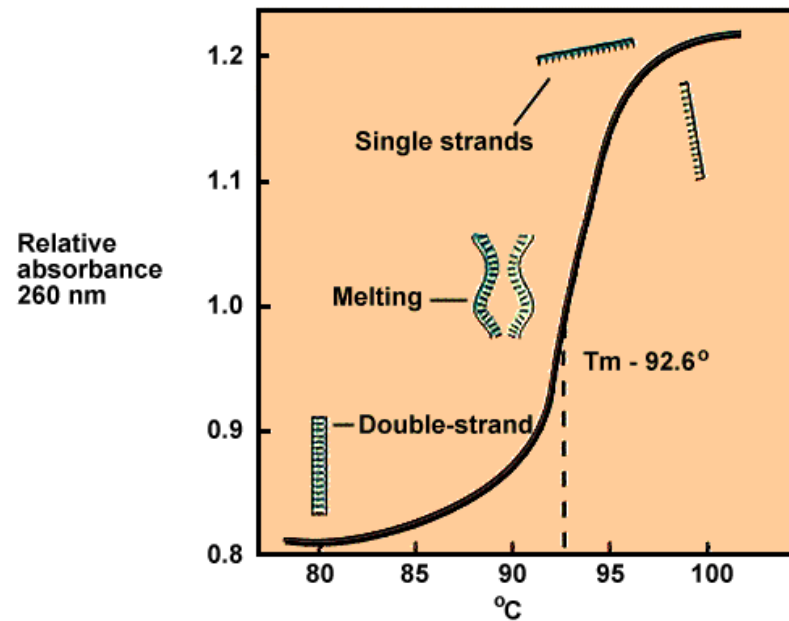
# NGUYÊN LÝ



2 đặc điểm quan trọng của quá trình lai là:

- (1) đoạn dò chỉ gắn với trình tự đích;
- (2) đoạn dò có thể tìm thấy phân tử đích trong hàng triệu phân tử liên quan.

# NGUYÊN LÝ



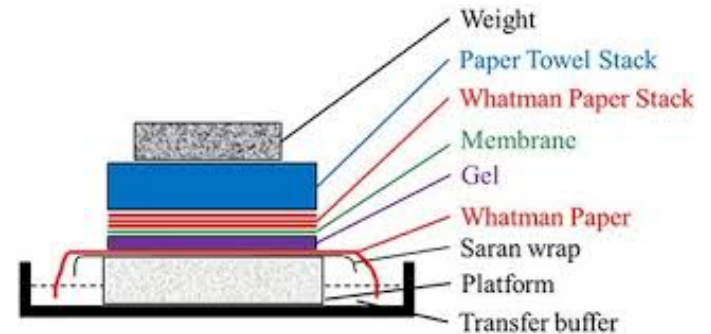
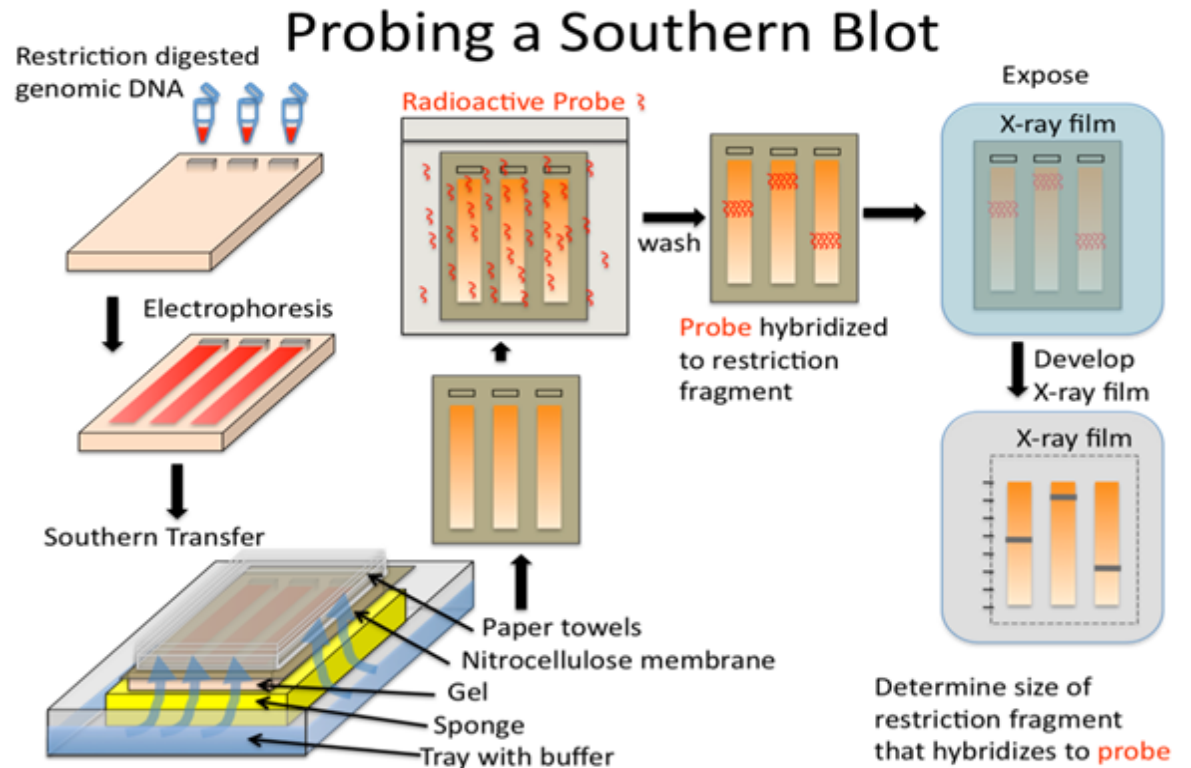
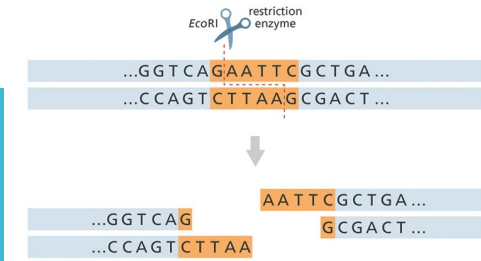
- **Nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ):** là điểm nhiệt mà tại đó, 50% phân tử DNA trong dung dịch phân tách thành sợi đơn.
- Nhiệt độ bắt cặp ( $T_h$ ) được tính toán từ  $T_m$
- $T_m$  và  $T_h$  bị ảnh hưởng bởi: chiều dài, cấu trúc, % GC trong đoạn dò và phân tử đích, nồng độ muối trong dung dịch ...



## ĐOẠN DÒ (PROBES)

- Là một đoạn DNA or RNA (20 bp - < 2kb), bổ sung đôi base với phân tử đích.
- Có thể ở dạng sợi đơn hoặc sợi đôi → nhưng sẽ chuyển thành dạng sợi đơn khi tham gia phản ứng lai.
- Được đánh dấu để nhận diện:
  - Đồng vị phóng xạ ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) → KT phóng xạ tự ghi
  - Biotine/Streptavidine → KT so màu
  - Chất phát quang sinh học → KT đo quang phổ

# SOUTHERN BLOTTING



# SOUTHERN BLOTTING

- Là KT giúp chuyển DNA đích từ gel lên màng.
- Tiến trình KT:
  1. Phân cắt DNA đích bằng enzym cắt hạn chế phù hợp.
  2. Điện di sản phẩm trên gel agarose.
  3. Phân tách phân tử DNA sợi đôi thành sợi đơn.
  4. Chuyển DNA sợi đơn lên màng nylon hoặc nitrocellulose bằng phương pháp thẩm thấu.
  5. Cho các đoạn dò bắt cặp với DNA đích trên màng.
  6. Hiện thị kết quả bằng KT phóng xạ tự ghi.

# SOUTHERN BLOTTING

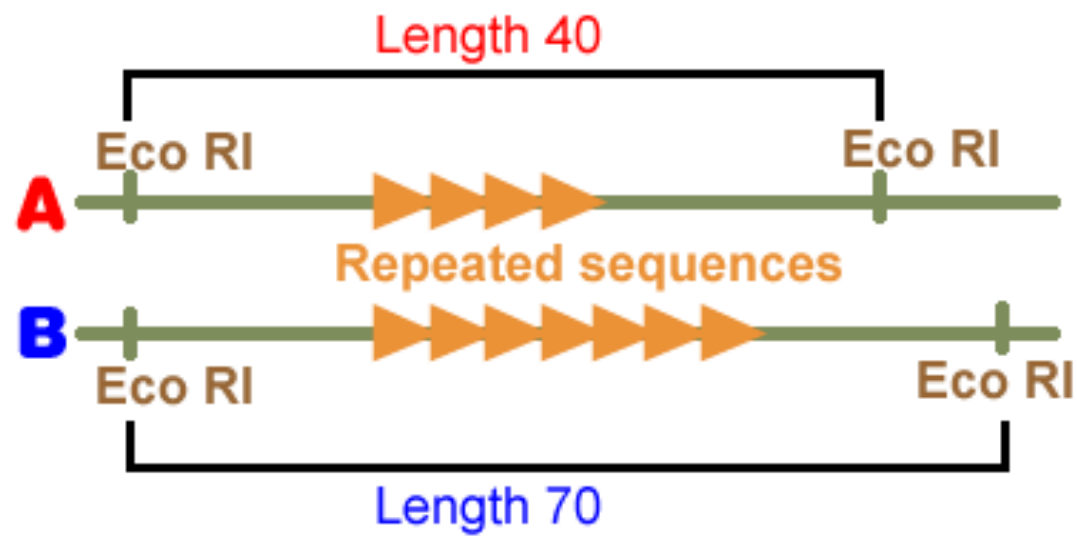
- **KT Vân tay DNA (DNA fingerprinting):**
  - Truy nhận huyết thống
  - Truy tìm bằng chứng trong pháp y và tội phạm học.
  - Mã vạch định danh
- Nguyên lý: phát hiện các đoạn trình tự lặp lại (repeated sequences)

# DNA fingerprinting

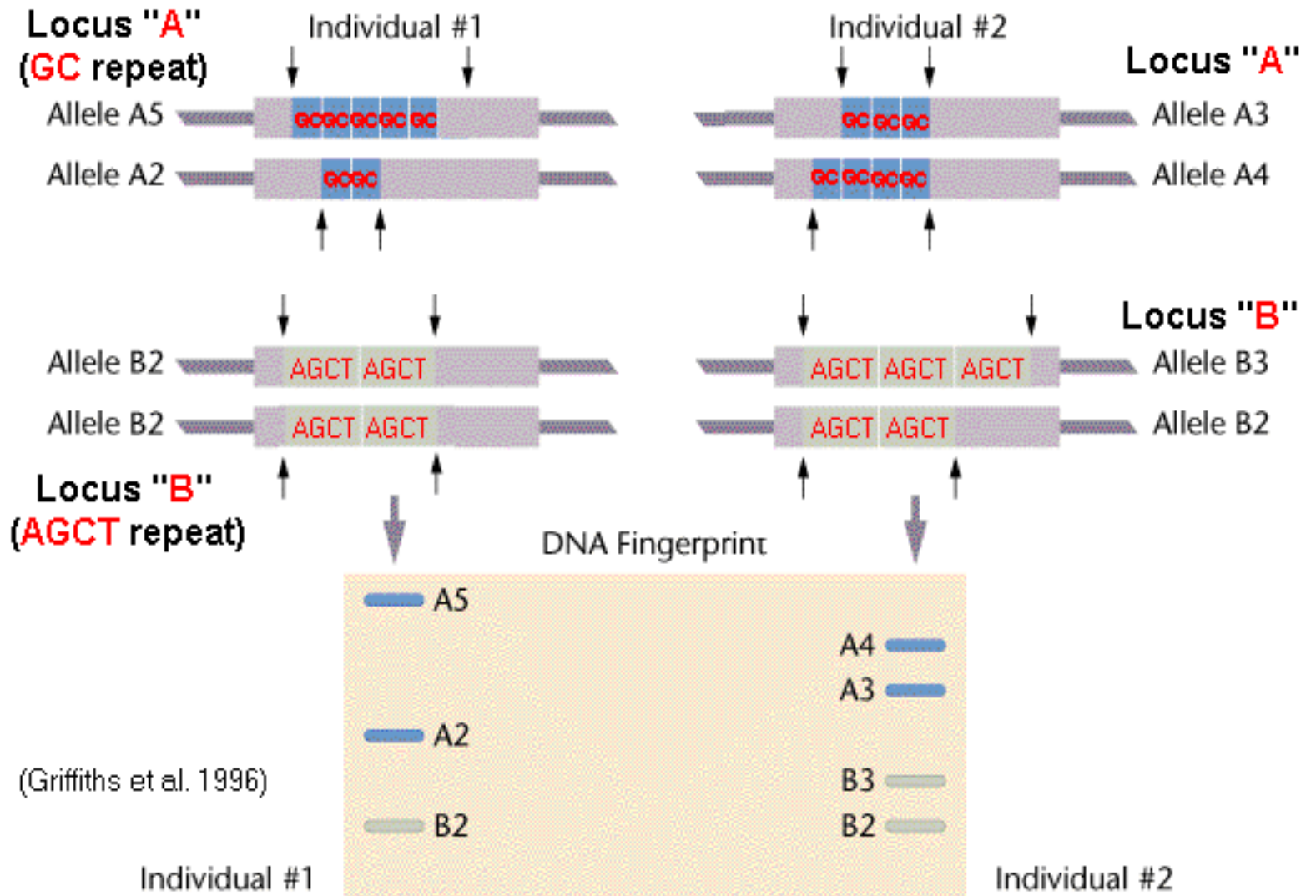
## Intron:

-STR : short Tandem Repeat .

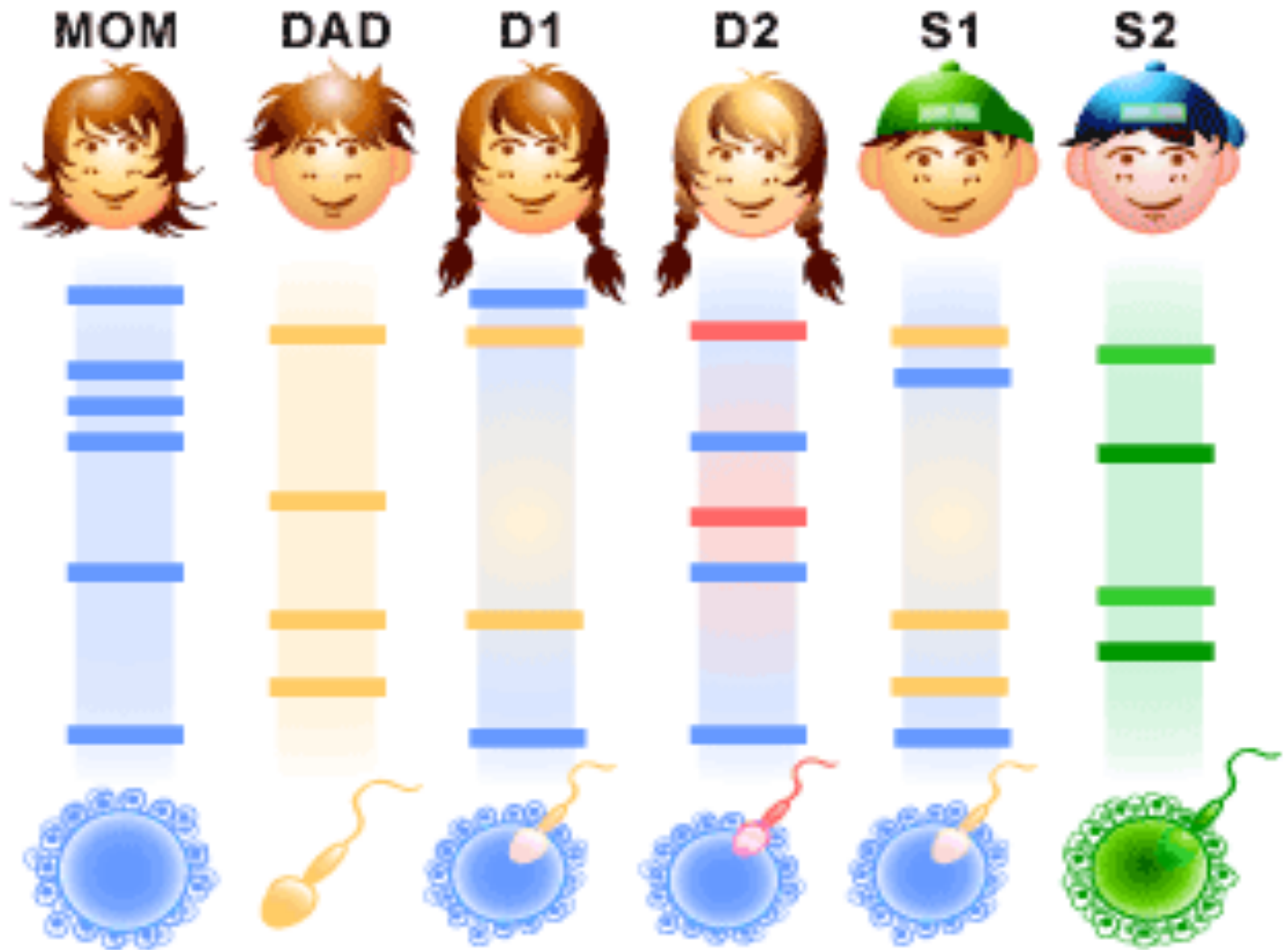
-VNTR : Variable Number of tandem Repeat .



# DNA fingerprinting

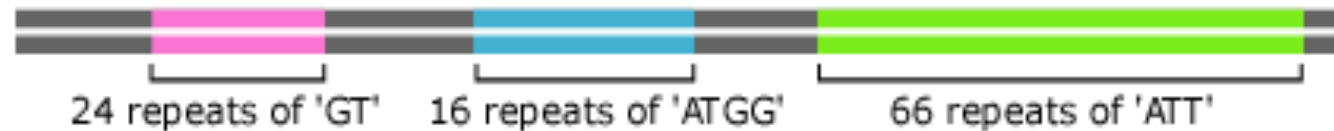


# DNA fingerprinting



# DNA fingerprinting

## 1. Section of victim's DNA:



There are three regions of repetitive DNA.

## 2. Section of suspect's DNA:



The same three regions of repetitive DNA are present here, but some include different numbers of repeats. Now let's compare this sample to...

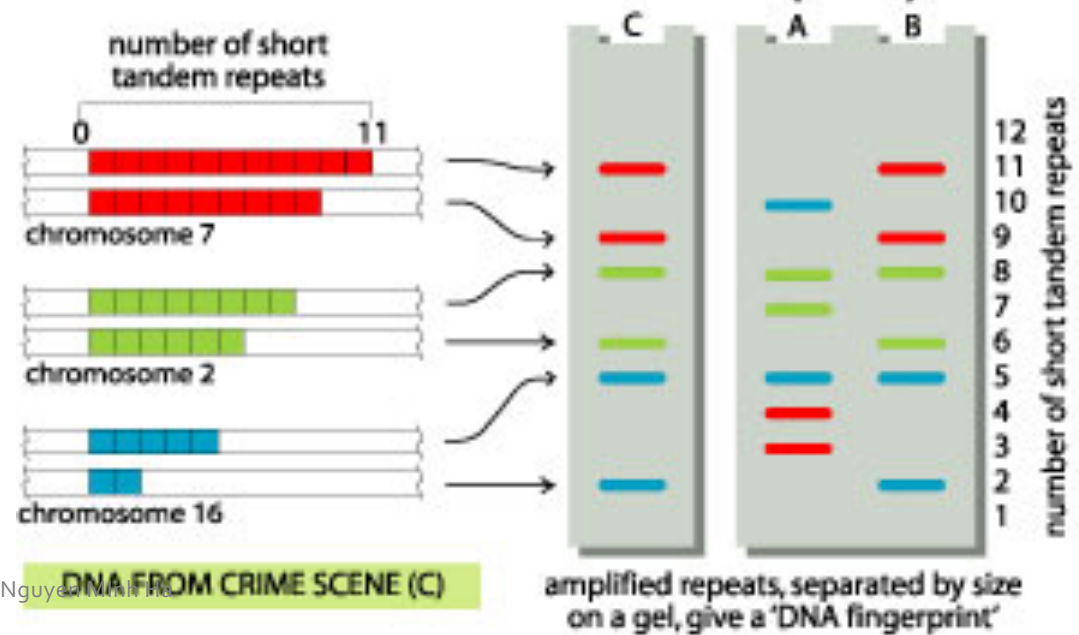
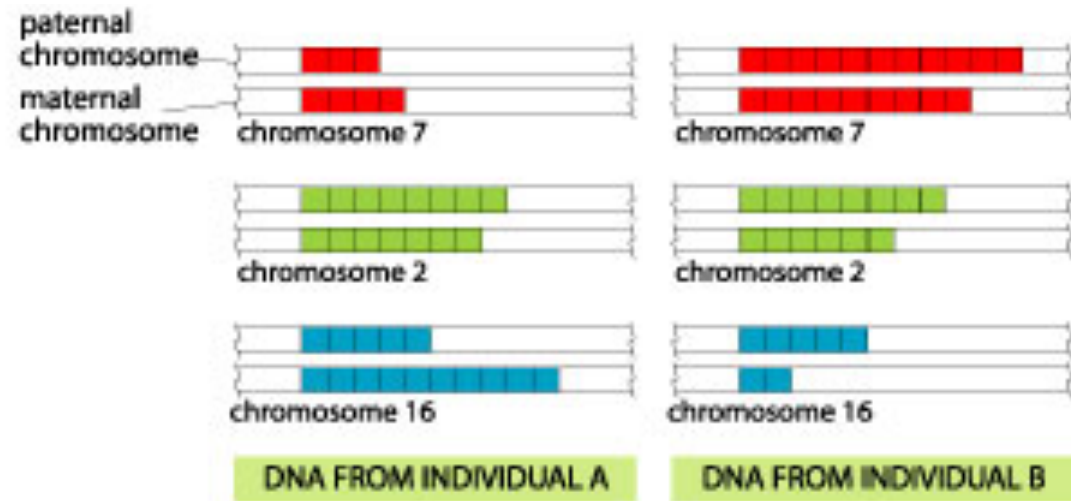
## 3. Section of DNA from crime scene hair:



The lengths of the repetitive sequences match the lengths in the suspect's DNA — so the DNA found at the crime scene belongs to the suspect.



# DNA fingerprinting



# DNA fingerprinting

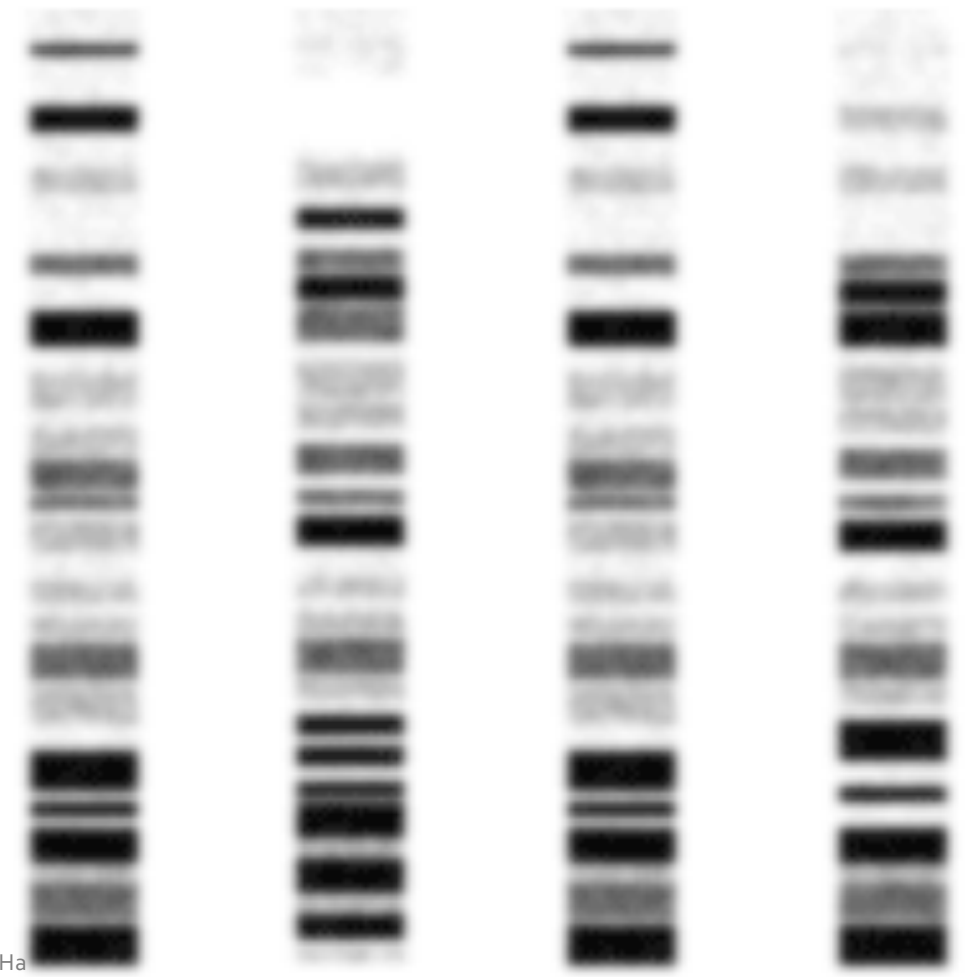
## DNA samples from:

crime scene

suspect #1

suspect #2

suspect #3



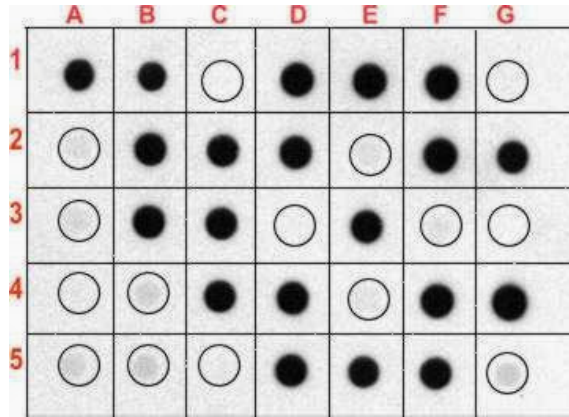
# NORTHERN BLOTTING

- Là KT giúp chuyển RNA đích từ gel lên màng.
- Các bước tiến hành tương tự như Southern blotting.
- Chủ yếu được sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện gen hoặc các bất thường trong quá trình phiên mã.

# DOT BLOTTING

- Là KT sàng lọc nhanh
- Sử dụng pp Allele-Specific Oligonucleotide (ASO): phân biệt 2 allele khác nhau 1 nucleotide.
- Không cần KT điện di.
- Không xác định chiều dài của phân tử đích.
- Có thể tiến hành nhiều mẫu cùng lúc.

# DOT BLOTTING

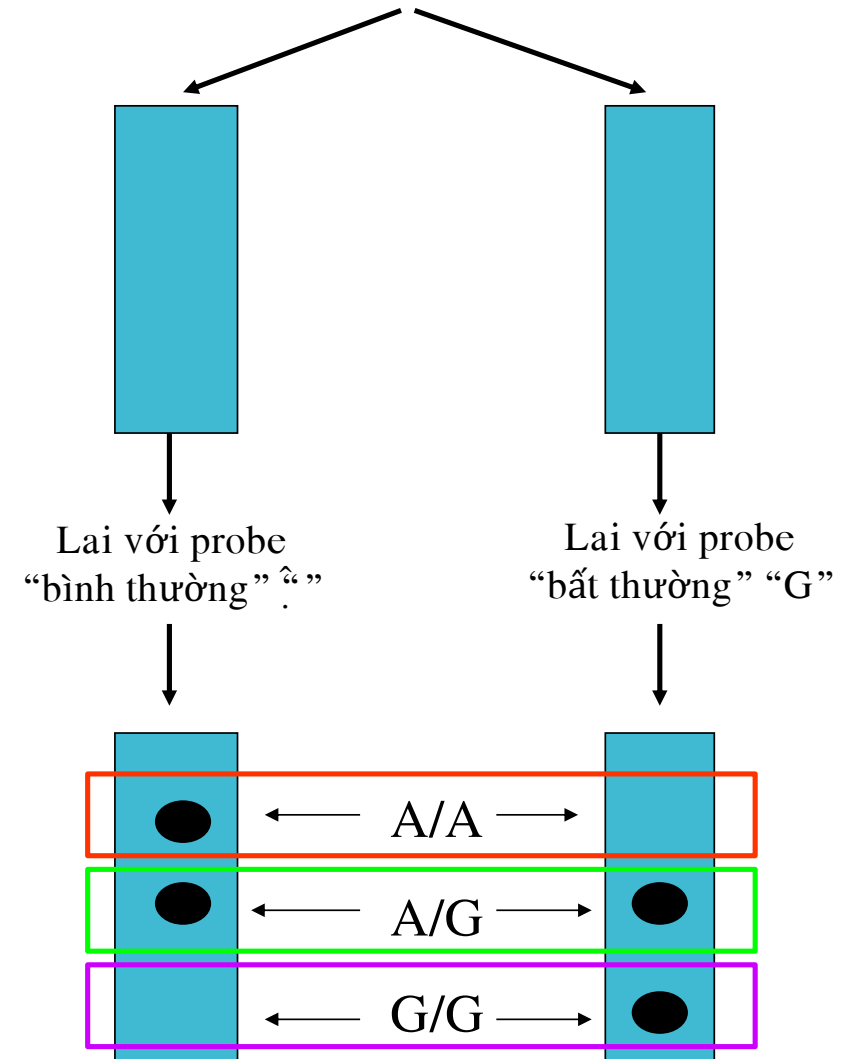


Ví dụ:

- Mẫu bình thường A/A
- Mẫu dị hợp A/G
- Mẫu đồng hợp G/G

Nguyen Minh Ha

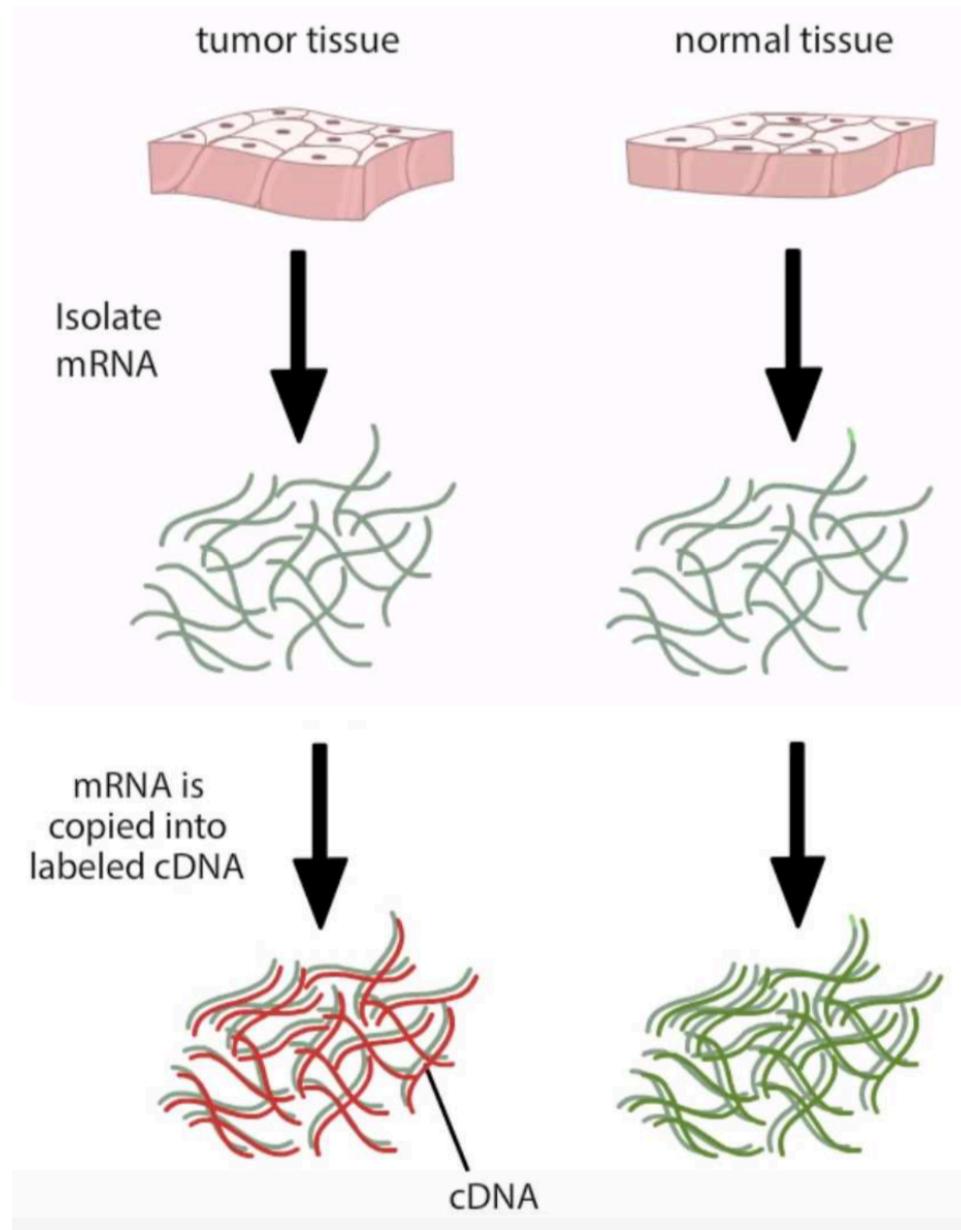
Chuyển mẫu 1n 2 mề



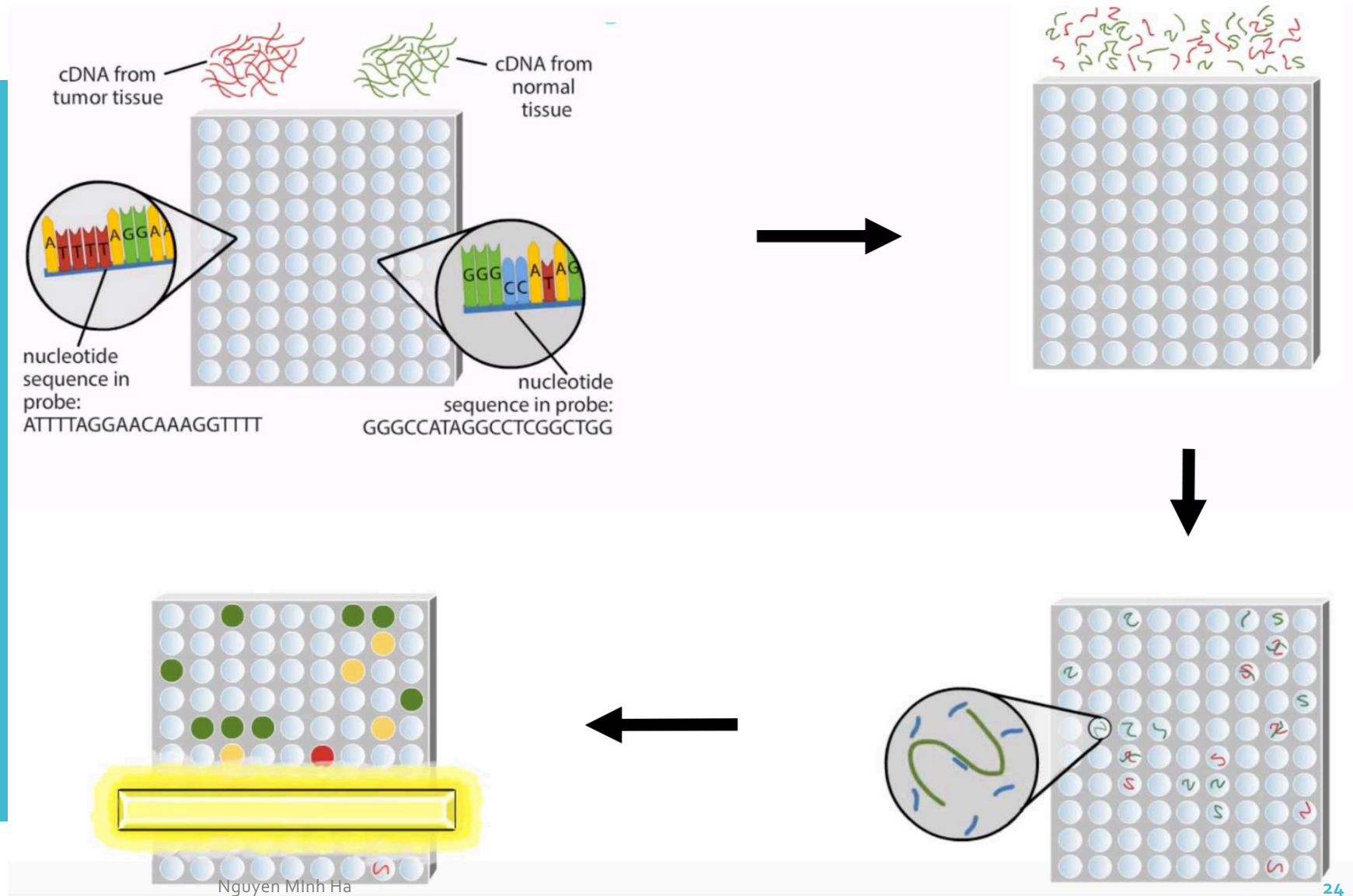
# DNA microarray

- Microarray = DNA chip = biochip = gene array
- Nguyên lý:
  - Lai phân tử.
  - Set of DNA spots (probes) được gắn trên giá đỡ rắn (thủy tinh, nhựa, silicon). Mỗi điểm gắn DNA chứa 10-12 mol probe.
  - Các phân tử lai được phát hiện và định lượng bằng độ mạnh của tín hiệu huỳnh quang.
  - KQ được phân tích bằng các phần mềm dữ liệu hoặc mã nguồn mở.
- Ứng dụng: nghiên cứu trạng thái biểu hiện của một số lượng lớn các gen; tạo ra một lượng lớn dữ liệu, nghiên cứu đánh giá trạng thái tổng thể của 1 tế bào hoặc sinh vật.

# DNA microarray

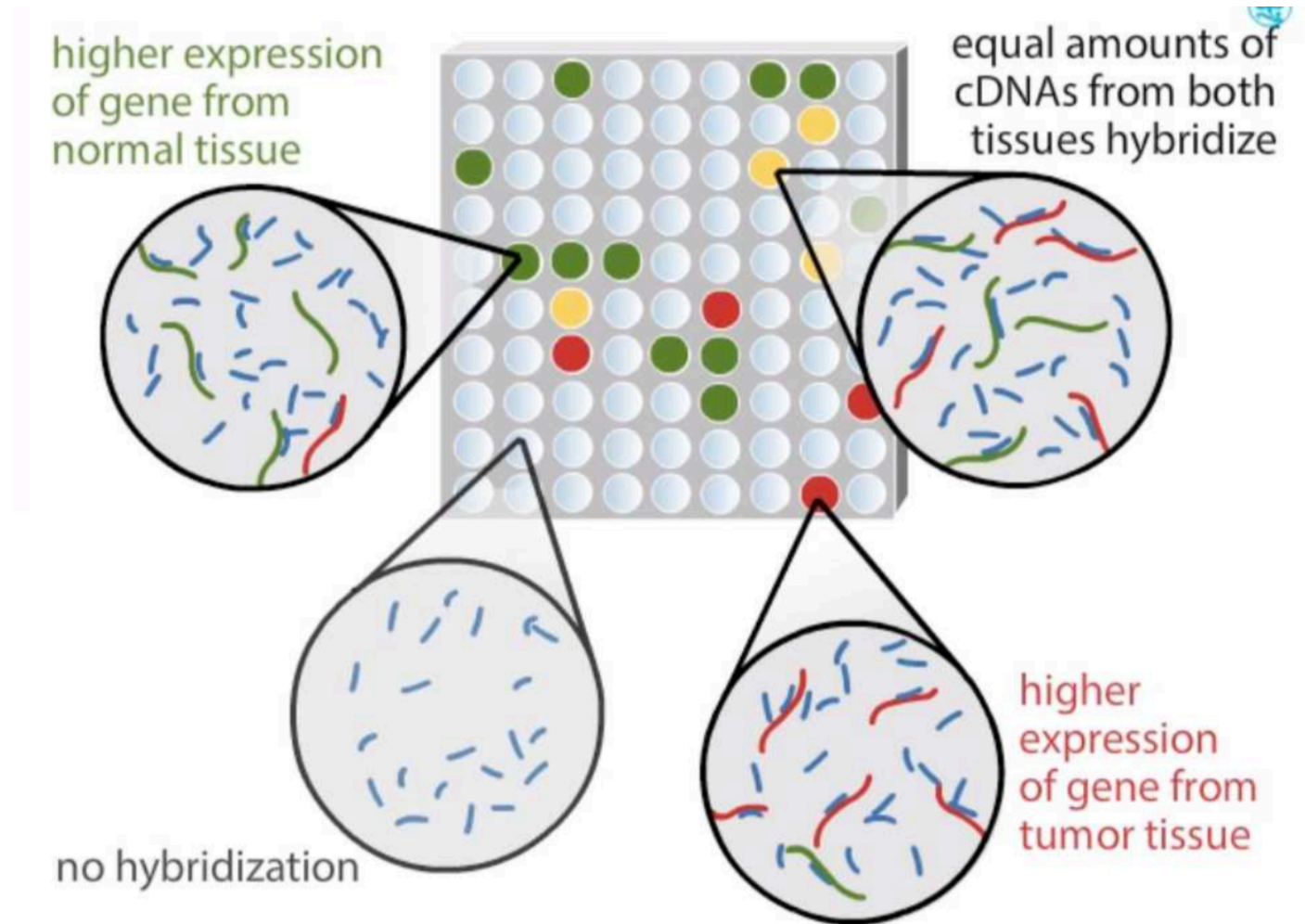


# DNA microarray

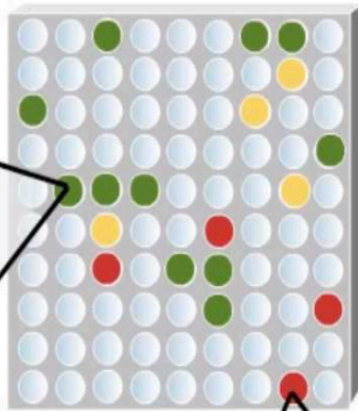
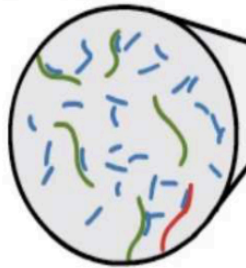




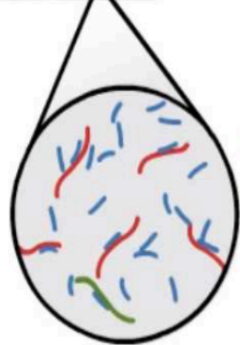
# DNA microarray



higher expression of gene from normal tissue



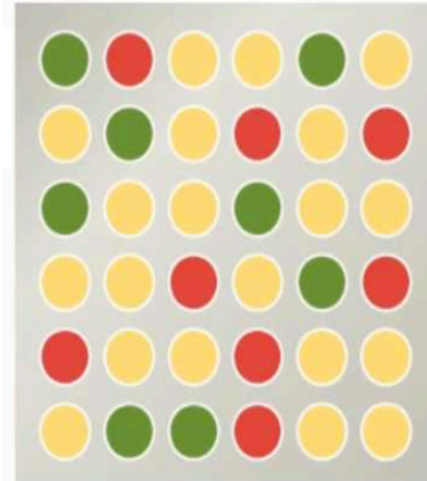
**differentially expressed genes: green and red signals**



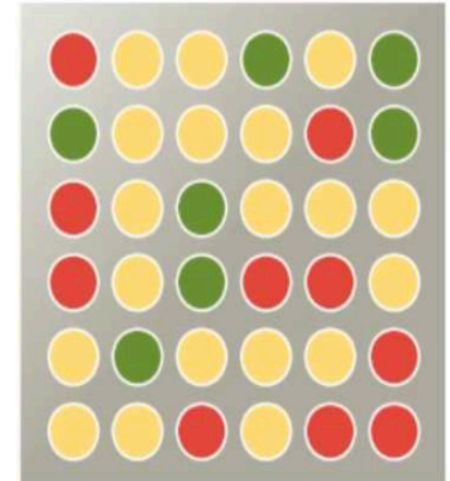
higher expression of gene from tumor tissue



Pattern associated with good prognosis



Pattern associated with poor prognosis



Lower expression of this gene in tumor tissue compared to normal tissue



Higher expression of this gene in tumor tissue compared to normal tissue

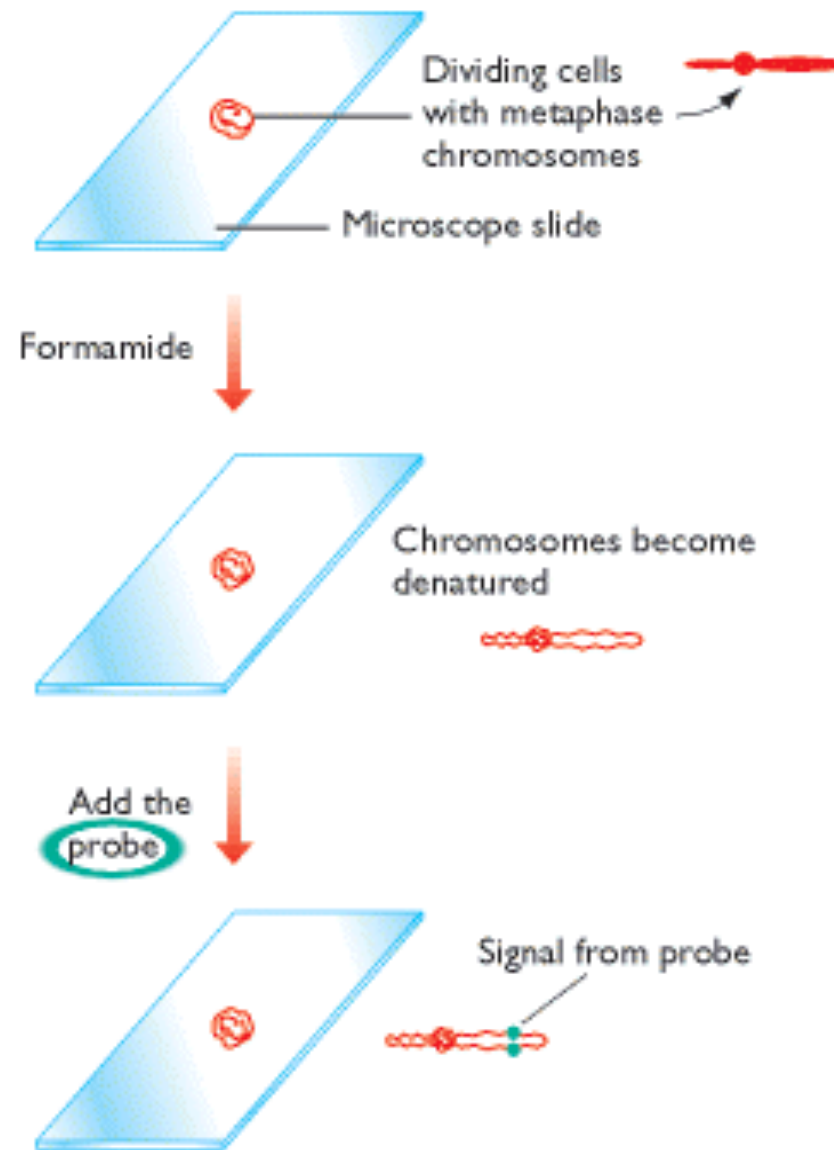


Expression of this gene is the same in tumor and normal tissue

# FISH

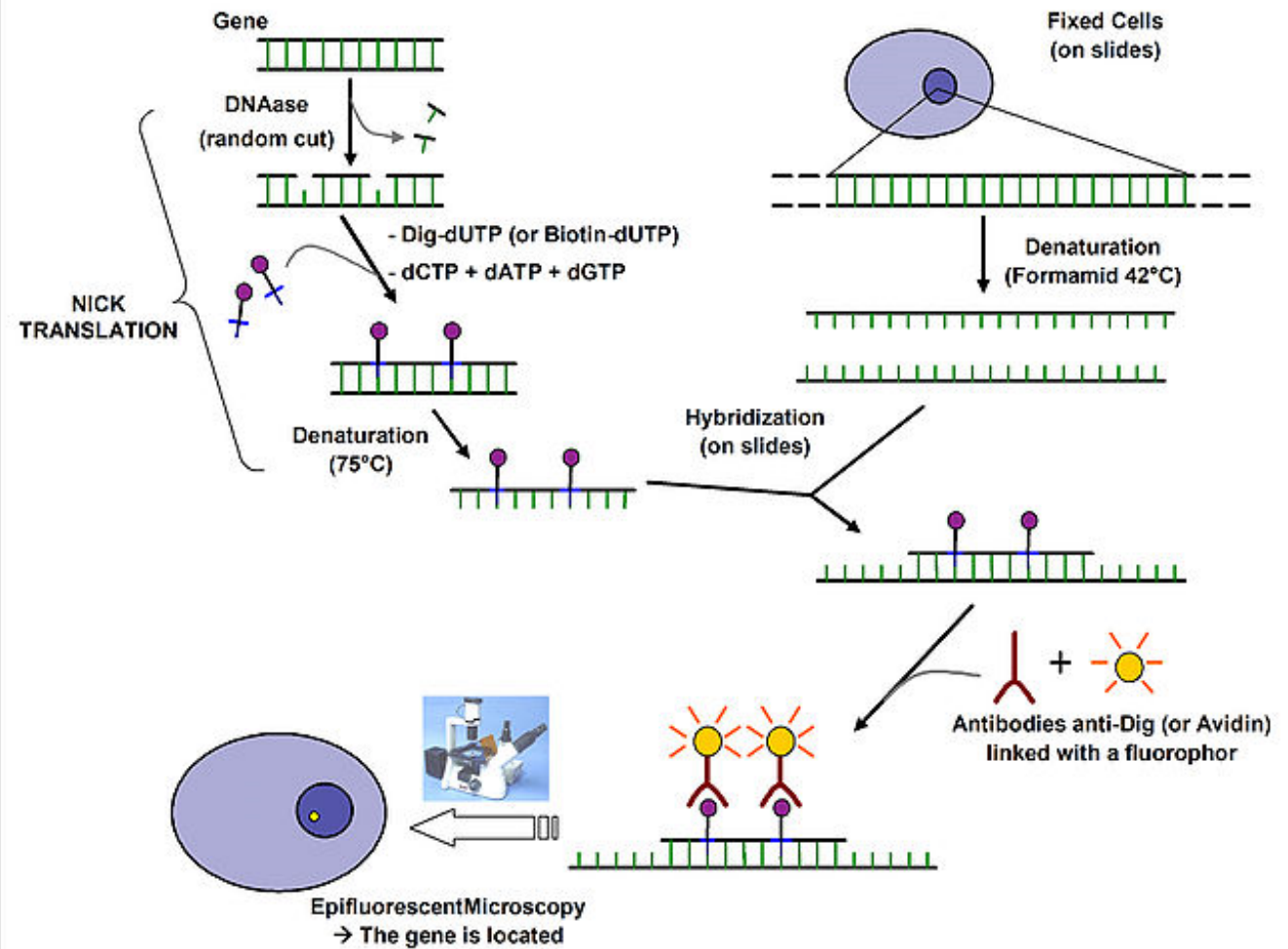
- FISH = Fluorescent In-Situ Hybridization.
- Phản ứng lai được tiến hành trực tiếp trên tế bào hoặc mô mà không cần tách chiết acid nucleic khỏi tế bào.
- Sử dụng các probe đặc hiệu có gắn tín hiệu huỳnh quang,, nhằm phát hiện sự hiện diện (hoặc không) của đoạn gen hoặc NST đang quan tâm.
- KO được đọc dưới KHV huỳnh quang.
- Ứng dụng: xác định các biến đổi di truyền ở cấp độ gen và NST .

# FISH

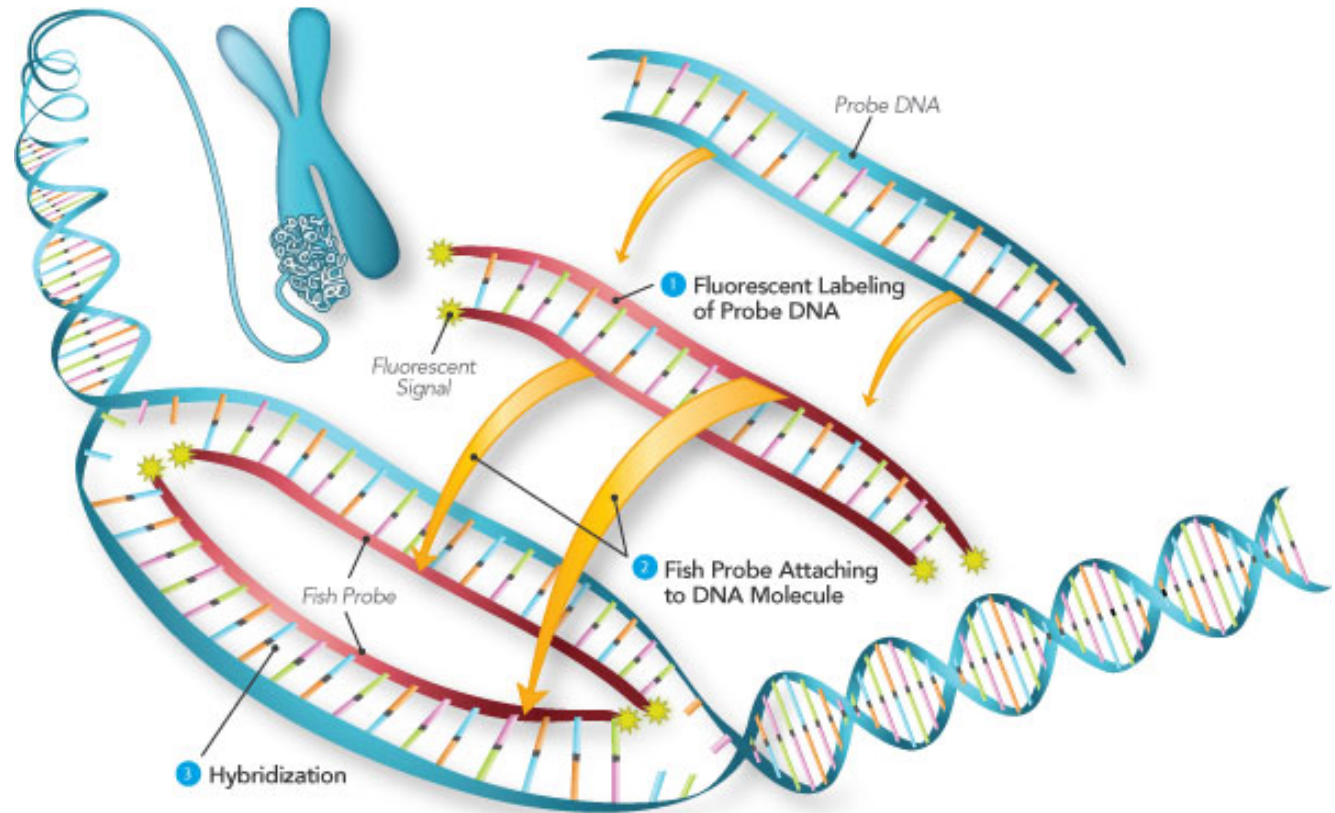


# FISH

## FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

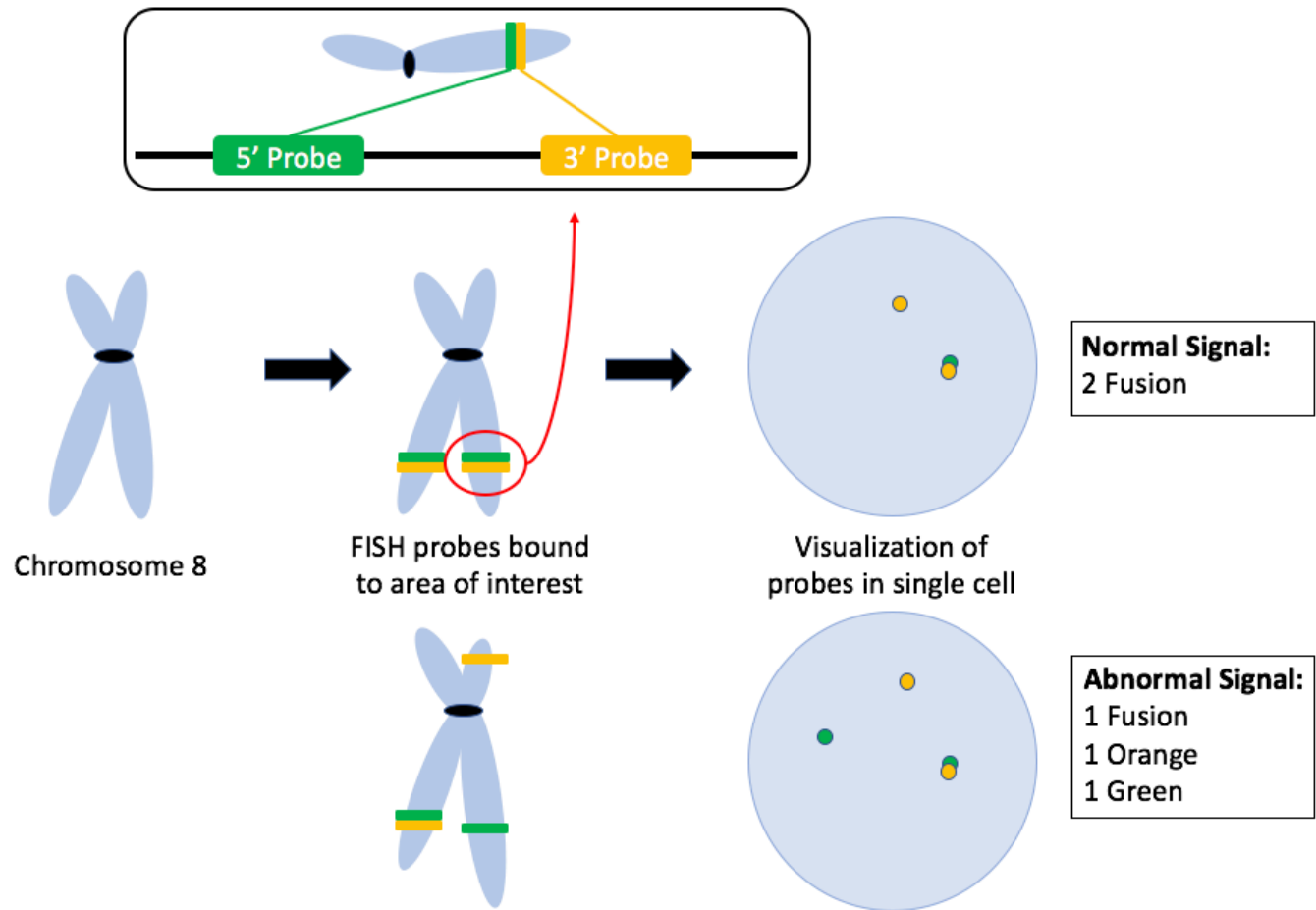


# FISH

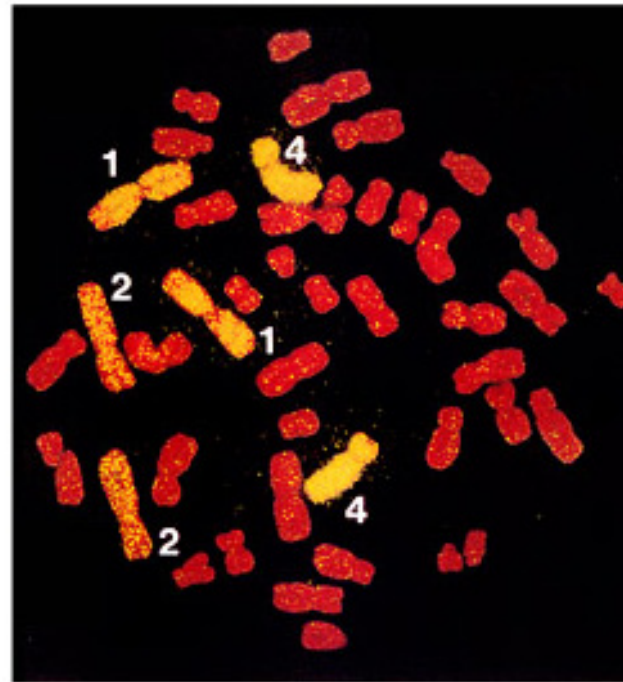




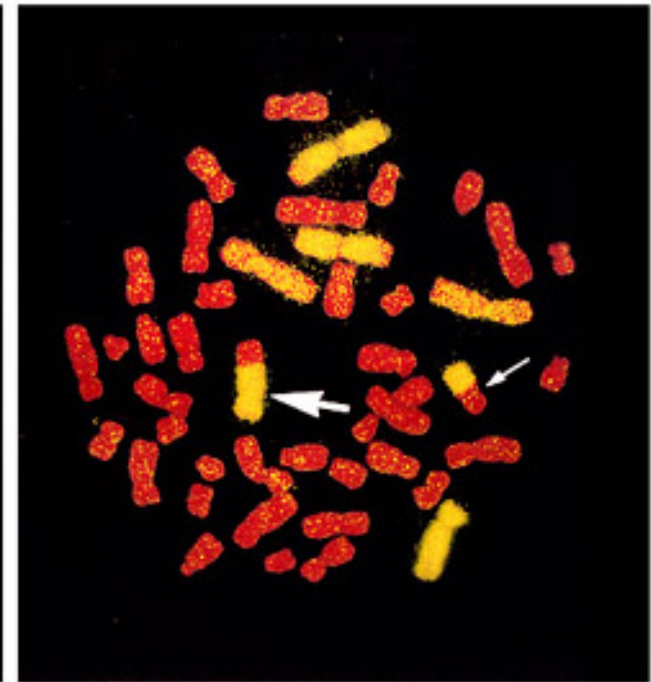
# FISH



# FISH



normal



abnormal (translocation)



# TÓM TẮT

- Phản ứng lai xảy ra giữa đoạn dò và phân tử acid nucleic đích.
- Sự đa dạng về bản chất phân tử đích và phương pháp phát hiện tạo nên nhiều KT lai khác nhau.
- Ứng dụng:
  - Xác định các biến đổi di truyền
  - Nghiên cứu sự biểu hiện gen.