

HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

NGUYỄN QUỐC TRUNG | NGUYỄN ĐỨC BÁCH  
TRỊNH THỊ THU THỦY | TÔNG VĂN HẢI | PHẠM THỊ DUNG  
Chủ biên: NGUYỄN QUỐC TRUNG

BÀI GIẢNG  
THỰC HÀNH  
SINH HỌC PHÂN TỬ 1

NHÀ XUẤT BẢN HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP - 2020



## MỤC LỤC

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| MỤC LỤC .....                                                                                        | 1  |
| BÀI 1. LẮP RÁP MÔ HÌNH CẤU TRÚC PHÂN TỬ DNA VÀ CÁC LOẠI<br>LIÊN KẾT HÓA HỌC .....                    | 3  |
| 1.1. MỤC TIÊU .....                                                                                  | 3  |
| 1.2. NGUYÊN LÝ .....                                                                                 | 3  |
| 1.2.1. Lịch sử ra đời mô hình phân tử DNA .....                                                      | 3  |
| 1.3. NỘI DUNG THỰC HÀNH .....                                                                        | 5  |
| 1.3.1. Sinh viên quan sát mô hình cấu trúc xoắn kép DNA .....                                        | 5  |
| 1.3.2. Nhóm sinh viên tháo rời mô hình và lắp ráp lại mô hình xoắn kép DNA .....                     | 6  |
| 1.3.3. Thảo luận kết quả thực hành .....                                                             | 6  |
| CÂU HỎI ÔN TẬP .....                                                                                 | 7  |
| BÀI 2. TÁCH CHIẾT VÀ QUAN SÁT TRỰC QUAN DNA PHƯƠNG PHÁP<br>ĐƠN GIẢN TÁCH CHIẾT DNA TỪ THỰC VẬT ..... | 8  |
| 2.1. MỤC TIÊU .....                                                                                  | 8  |
| 2.2. NGUYÊN LÝ .....                                                                                 | 8  |
| 2.3. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ .....                                                            | 8  |
| 2.3.1. Vật liệu và hóa chất .....                                                                    | 8  |
| 2.3.2. Thiết bị .....                                                                                | 8  |
| 2.4. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM .....                                                                      | 9  |
| 2.4.1. Chuẩn bị .....                                                                                | 9  |
| 2.4.2. Tiến hành .....                                                                               | 9  |
| 2.5. NHỮNG ĐIỂM CẦN LƯU Ý .....                                                                      | 9  |
| CÂU HỎI ÔN TẬP .....                                                                                 | 11 |
| BÀI 3. TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ HÓA HỌC CỦA AXIT NUCLEIC .....                                            | 12 |
| 3.1. MỤC TIÊU .....                                                                                  | 12 |
| 3.2. NGUYÊN LÝ .....                                                                                 | 12 |
| 3.3. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ .....                                                            | 13 |
| 3.3.1. Vật liệu .....                                                                                | 13 |
| 3.3.2. Hóa chất .....                                                                                | 13 |
| 3.3.3. Thiết bị và dụng cụ .....                                                                     | 13 |
| 3.4. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM .....                                                                      | 14 |

|        |                                                                          |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.1. | Xác định độ tinh sạch của mẫu DNA .....                                  | 14 |
| 3.4.2. | Đánh giá tính chất biến tính của DNA .....                               | 15 |
| 3.4.3. | Kỹ thuật định lượng DNA .....                                            | 15 |
| 3.5.   | NHỮNG ĐIỂM CẦN LƯU Ý .....                                               | 15 |
|        | CÂU HỎI ÔN TẬP .....                                                     | 16 |
| BÀI 4. | NGHIÊN CỨU MỐI TƯƠNG TÁC CÁC ĐẠI PHÂN TỬ SINH HỌC<br>DNA VÀ PROTEIN..... | 17 |
| 4.1.   | MỤC TIÊU.....                                                            | 17 |
| 4.2.   | NGUYÊN LÝ .....                                                          | 17 |
| 4.3.   | TIẾN HÀNH .....                                                          | 18 |
| BÀI 5. | DNA POLYMERASE VÀ QUÁ TRÌNH TÁI BẢN DNA .....                            | 19 |
| 5.1.   | MỤC TIÊU .....                                                           | 19 |
| 5.2.   | NGUYÊN LÝ .....                                                          | 19 |
| 5.3.   | VẬT LIỆU, HÓA CHẤT .....                                                 | 20 |
| 5.3.1. | Dụng cụ .....                                                            | 20 |
| 5.3.2. | Hóa chất.....                                                            | 21 |
| 5.4.   | TIẾN HÀNH .....                                                          | 21 |
| 5.5.   | CHÚ Ý.....                                                               | 21 |
|        | CÂU HỎI ÔN TẬP .....                                                     | 22 |
|        | TÀI LIỆU THAM KHẢO .....                                                 | 23 |

# **BÀI 1. LẮP RÁP MÔ HÌNH CẤU TRÚC PHÂN TỬ DNA VÀ CÁC LOẠI LIÊN KẾT HÓA HỌC**

## **1.1. MỤC TIÊU**

- Sinh viên nắm vững được cấu tạo hoá học chuỗi xoắn kép đại phân tử DNA.
- Sinh viên hiểu quy luật và lắp ráp được mô hình phân tử DNA.

## **1.2. NGUYÊN LÝ**

### **1.2.1. Lịch sử ra đời mô hình phân tử DNA**

- Năm 1928, Girffith nhà vi sinh vật học người Anh, đã nghiên cứu thí nghiệm biến nạp trên phế cầu khuẩn gây bệnh viêm phổi.

- Năm 1944, Avery và cộng sự bằng phương pháp tinh sạch DNA, tìm ra được tác nhân gây biến nạp là DNA.

- Năm 1952, Hersey và Chase, sử dụng phương pháp đánh dấu đồng vị phóng xạ đã chứng minh được DNA chính là tác nhân gây biến nạp.

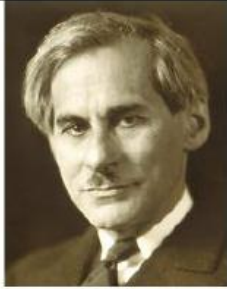
- Năm 1953, James Watson (1928 - nay), Francis Crick (1916 - 2004), Maurice Wilkins (1916 - 2004) và Rosalind Franklin (1920 - 1958) công bố cấu trúc chuỗi hoá học xoắn kép DNA.

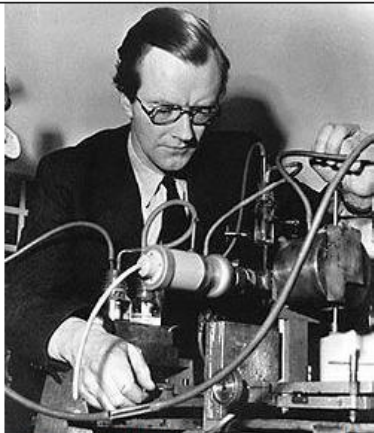
- Quy tắc Chargaff:

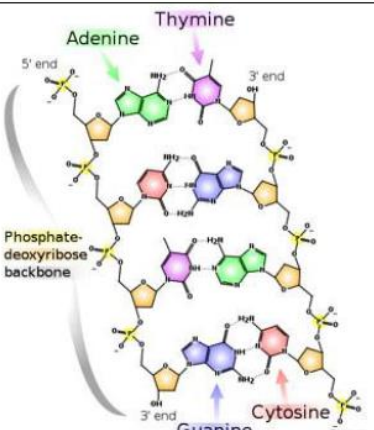
- Tổng số nucleotid purine bằng tổng số nucleotid pyrimidine;
- A liên kết với T bằng 2 liên kết hydro; G liên kết với C bằng 3 liên kết hydro;
- Tỷ lệ  $(A+T)/(G+C)$  đặc trưng cho từng loài.

- DNA có hai dạng xoắn là xoắn phải và xoắn trái.

- Về cấu hình không gian, DNA có ba dạng: dạng A, dạng B, dạng Z. Các dạng khác nhau ở chiều xoắn, mức độ xoắn và mức độ tinh thể hóa.

|                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <br>Phoebus Aaron Theodor Levene<br><small>Courtesy of the Rockefeller Archives Center.<br/>Noncommercial, educational use only.</small> |  |
| Johannes Friedrich Miescher<br>(1844 –1895) – Thụy Sĩ                             | Phoebus Levene (1869-<br>1940) – Nga                                                                                                                                                                                      | Erwin Chargaff (11/8/1905<br>– 20/6/2002) – Australia                               |

|                                                                                    |                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |
| Rosalind Franklin ở Paris                                                          | Maurice Wilkins sử dụng thiết bị<br>nhiều xạ tia X vào khoảng năm 1954              |

|                                                                                     |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |
| James Watson và Francis Crick cùng với<br>mô hình DNA năm 1953                      | Cấu tạo DNA                                                                          |

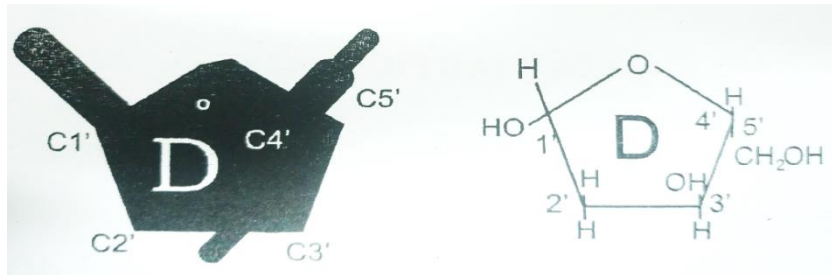
**Hình 1.1. Các nhà khoa học đóng góp cho sự phát hiện cấu trúc chuỗi xoắn kép DNA của Watson và Crick, 1953**

### 1.3. NỘI DUNG THỰC HÀNH

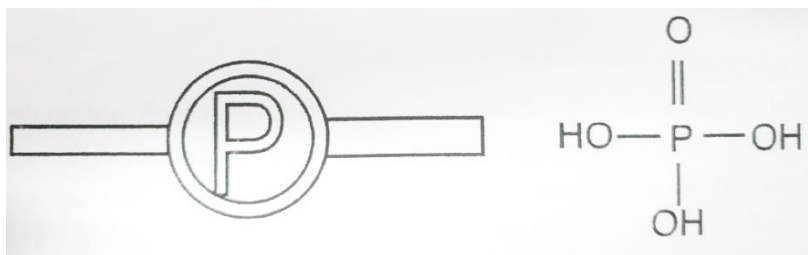
#### 1.3.1. Sinh viên quan sát mô hình cấu trúc xoắn kép DNA

Nhận dạng các thành phần cấu tạo của phân tử DNA:

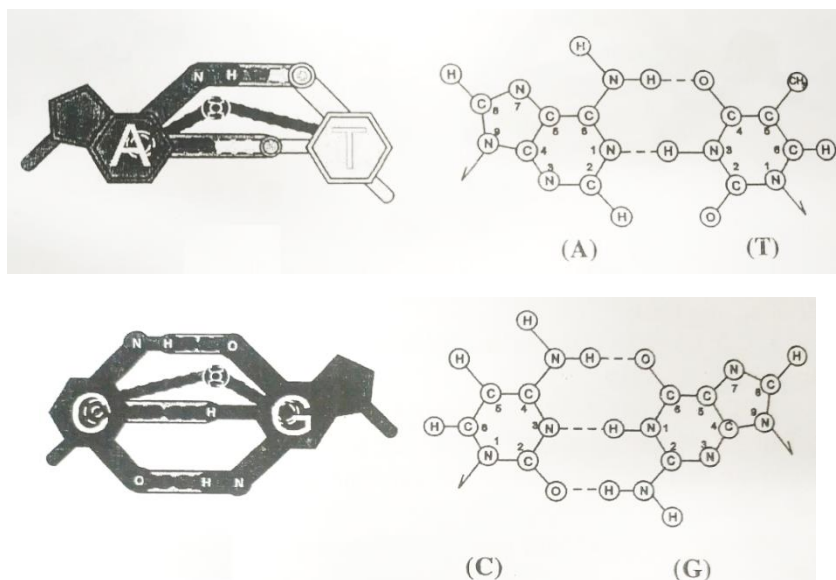
- Cấu tạo nucleotide gồm 3 thành phần chính: (i) đường 5 cacbon, (ii) một nhóm phosphate, (iii) một trong 4 loại bazo nito;
- 4 loại bazo nito chia thành hai nhóm, purine (A, G) và pyrimidine (T, C).



Hình 1.2. Đường Deoxiribose



Hình 1.3. Nhóm Photphat



Hình 1.4. 4 loại bazo nito và liên kết hydro

Nhận dạng các loại liên kết:

- Các nucleotide trên một mạch liên kết với nhau bằng liên kết phosphodiester, hình thành cấu trúc backbone;

- Các nucleotide trên hai sợi đối song liên kết với nhau bằng liên kết hydro theo nguyên tắc bổ sung, một purine liên kết với một pyrimidine.

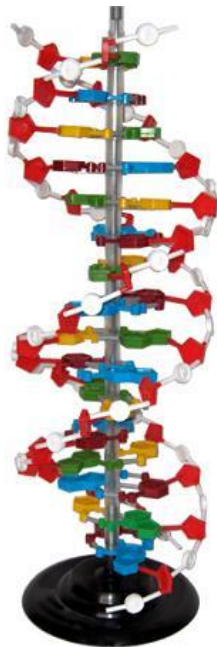
Sử dụng trục và chân đế cùng với các khớp nhựa tạo trục tưởng tượng của mạch xoắn kép.

### 1.3.2. Nhóm sinh viên tháo rời mô hình và lắp ráp lại mô hình xoắn kép DNA

- Gắn các khớp nối trục vào chân đế.
- Ghép các cặp bazơ nitơ theo nguyên tắc bổ sung (chú ý chọn các ống nhựa - liên kết hydro nối có chiều dài phù hợp).
- Lắp các cặp bazơ nitơ lên trụ tròn (10 cặp), lưu ý chiều của 2 mạch ngược nhau.
- Gắn các phân tử đường Deoxiribose vào các bazơ nitơ tương ứng.
- Ghép các phân tử axit Photphoric vào vị trí tương ứng trên phân tử đường.
- Ghép các liên kết phosphodiester tạo mạch xoắn kép.

### 1.3.3. Thảo luận kết quả thực hành

**Yêu cầu:** sinh viên lắp ráp thành công mô hình chuỗi xoắn kép DNA và trả lời câu hỏi cuối bài (giáo viên hướng dẫn thực hành đặt câu hỏi).



Hình 1.5. Mô hình lắp ráp hoàn chỉnh

## CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Sinh viên chỉ ra các thành phần cấu tạo DNA và các liên kết trong mô hình vừa lắp xong?
2. Chỉ ra đặc điểm cấu tạo của mạch đơn trong quy ước chiều 5'-3'?
3. Chỉ ra rãnh lớn (major groove) và rãnh nhỏ (minor groove) trong mô hình cấu trúc xoắn kép?

## **BÀI 2. TÁCH CHIẾT VÀ QUAN SÁT TRỰC QUAN DNA PHƯƠNG PHÁP ĐƠN GIẢN TÁCH CHIẾT DNA TỪ THỰC VẬT**

### **2.1. MỤC TIÊU**

- Sinh viên hiểu được cấu trúc tế bào, vị trí của DNA nằm chủ yếu trong nhân tế bào.
- Sinh viên nắm được nguyên lý của phương pháp tách chiết DNA từ tế bào thực vật.
- Sinh viên thực hành và quan sát trực quan DNA kết tủa và hiểu được tính chất của axit nucleic trong các bước tiến hành thí nghiệm.

### **2.2. NGUYÊN LÝ**

#### **Tách chiết DNA gồm 3 bước cơ bản**

##### *- Lấy mẫu:*

Lấy đúng mẫu, tốt nhất là các mô non, không bản hay bị nhiễm bệnh. Không nên lấy mẫu là các cơ quan dự trữ nhiều protein, glucit hoặc lipid vì khi chiết xuất phải tốn công loại bỏ các tạp chất này.

Mẫu lấy xong cần phải hạn chế ngay hoạt động của các enzym DNase bằng cách làm lạnh bỏ ngay vào đá lạnh.

1. Phá vỡ màng tế bào và màng nhân: tùy đặc điểm cấu tạo màng/thành tế bào có các phương pháp phá vỡ khác nhau (nghiền, dùng enzyme, nhiệt độ cao...). Trong bài tế bào thịt quả chuối rất yếu nên chỉ cần dầm nát là đạt yêu cầu.

2. Hoà tan DNA và loại bỏ các tạp chất: thành phần trong mẫu DNA khi chiết xuất thường chứa cả protein, RNA, carbohydrate và lipid, do vậy cần phải loại bỏ các tạp chất này ra khỏi dung dịch DNA.

3. Kết tủa DNA: mục đích của kết tủa là nhằm thu được DNA ở dạng cô đặc và bảo vệ chúng không bị phân hủy bởi các enzym DNase và khi cần thì lại hòa tan chúng theo nồng độ tùy ý. Để kết tủa DNA chúng ta có thể dùng 2 hóa chất đó là: Ethanol và Isopropanol.

### **2.3. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ**

#### **2.3.1. Vật liệu và hóa chất**

- 1 quả chuối chín (có thể thay thế bằng cà chua chín, hành tây, dâu tây, bơ...);
- Đệm chiết: 40 mL (1.5 g salt + 10 ml detergent + 90 ml distilled water);
- Ethanol 96% để lạnh: 40 mL.

#### **2.3.2. Thiết bị**

- Lọ thủy tinh: 02;

- Thìa nhựa: 01;
- Ống nghiệm thủy tinh: 05;
- Giấy lọc: 01;
- Bút viết kính: 01.

## 2.4. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

### 2.4.1. Chuẩn bị

- Pha dung dịch đệm chiết 100 mL (1.5 g salt + 10 ml detergent + 90 ml nước cất);
- Cài đặt bể ổn nhiệt ở 50 - 60°C;
- Để Ethanol 96% trong đá hoặc tủ lạnh.

### 2.4.2. Tiến hành

- Lấy 1 thìa thịt quả chuối vào lọ thủy tinh, nghiền thật kỹ bằng thìa;
- Thêm 40mL đệm chiết và đảo đều bằng thìa;
- ủ trong bể ổn nhiệt/tủ định ôn 50 - 60°C trong 10 phút. 5 phút lắc nhẹ;
- Trong lúc chờ đợi, sinh viên chuẩn bị giấy/vải lọc và lọ thủy tinh mới;
- Lấy hỗn hợp khỏi bể ổn nhiệt;
- Cần thận dùng giấy/khăn lọc hỗn hợp, thu dịch vào lọ thủy tinh. Bước này để loại bỏ các xác tế bào và các cặn thừa sau khi đã phá màng;
- Chia đều vào mỗi ống nghiệm thủy tinh 5mL dịch chiết;
- Giữ ống nghiệm nghiêng góc 45° đổ nhẹ nhàng Ethanol 96% lạnh chảy từ từ theo thành ống nghiệm xuống bề mặt dung dịch;
- Cắm ống nghiệm thẳng đứng vào giá, quan sát trong 1 - 5 phút;
- Quan sát vẩn DNA kết tủa trắng đục nổi lên từ lớp hỗn hợp phía dưới lên lớp dung dịch ethanol phía trên.

## 2.5. NHỮNG ĐIỂM CẦN LƯU Ý

- Kiểm tra mực nước trước khi bật bể ổn nhiệt;
- Tắt các thiết bị sau khi sử dụng;
- Đệm chiết chứa chất tẩy rửa giúp hòa tan lớp màng tế bào cấu tạo từ lớp lipid kép;
- Dung dịch muối làm cho các phân tử DNA kết dính vào nhau và dễ kết tủa.

### *KỸ THUẬT SỬ DỤNG MICROPIPET*

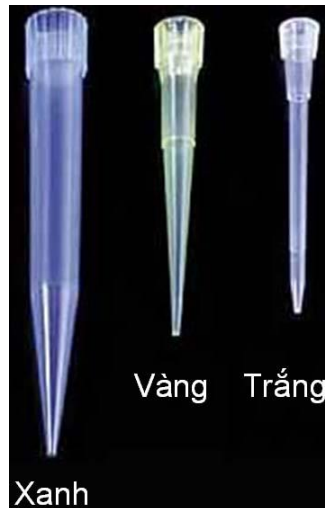
Micropipet được phân loại theo ngưỡng thể tích dung dịch hút được: ngưỡng thể tích của pipet thường được ghi trên thân hoặc nút bấm. Phần đầu pipet không tiếp xúc

trực tiếp với dung dịch mà thông qua các đầu tip (típ) sử dụng một lần. Mỗi loại micropipet sử dụng một loại đầu tip khác nhau. Khi sử dụng **phải lắp đúng đầu tip với loại pipet phù hợp**.

- |                            |                     |
|----------------------------|---------------------|
| • Pipet 1000-5000 $\mu$ l  | dùng đầu tip TRẮNG  |
| • Pipet 100 - 1000 $\mu$ l | dùng đầu tip XANH*  |
| • Pipet 10-100 $\mu$ l     | dùng đầu tip VÀNG*  |
| • Pipet 2-20 $\mu$ l       | dùng đầu tip VÀNG   |
| • Pipet 0,5-10 $\mu$ l     | dùng đầu tip TRẮNG* |
| • Pipet 0,1 - 2,5 $\mu$ l  | dùng đầu tip TRẮNG  |

Nút bấm trên pipet có 2 nấc bấm:

Nấc 1: bấm nhẹ, dùng khi hút và bơm dung dịch bằng với thể tích điều chỉnh;



Nấc 2: bấm nặng, dùng để bơm dung dịch còn sót trong đầu tip sau khi bấm nấc 1.



Thao tác dùng micropipet hút dung dịch:

1. Lắp đầu tip vào pipet: lắp đầu tip phải đảm bảo thật khít với đầu pipet, tránh chạm đầu tip vào tay và các thứ khác.

2. Chỉnh thể tích hút: vặn và quan sát chỉ số trên bộ phận chỉnh thể tích.

- Lưu ý: chỉ sử dụng pipet để hút một thể tích chất lỏng tương ứng với thể tích ghi trên nhãn. KHÔNG được điều chỉnh thể tích vượt quá ngưỡng cho phép.

3. Hút vào: bấm hết nấc 1 trên nút bấm trước khi nhúng đầu tip vào dung dịch, khi nhúng đầu tip vào dung dịch thả nút bấm ra từ từ cho đến hết nấc bấm.

Lưu ý: Pipet là dụng cụ có các chi tiết bằng nhựa, cao su và lò xo thép nên trong bất kỳ trường hợp nào cũng KHÔNG được ngửa phần đầu hút của pipet lên trên để tránh các chất lỏng chảy ngược vào trong piston của pipet.

4. Bơm ra: đặt đầu tip chạm vào thành ống nghiệm đựng dung dịch, bấm nút bấm bơm dung dịch ra từ từ, nếu hết nấc bấm 1 mà dung dịch chưa ra hết thì bấm mạnh nấc 2 và nhấc pipet lên.

5. Loại bỏ đầu tip: bấm nút loại đầu tip bỏ đầu tip vào cốc đựng rác.

## CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vai trò của đệm chiết trong tách chiết DNA.
2. Tác dụng của ethanol/isopropanol trong tách chiết DNA.
3. Giải thích khó khăn của việc phá màng tế bào thực vật? Thuận lợi của việc sử dụng thịt quả chuối để tách chiết DNA?

## BÀI 3. TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ HÓA HỌC CỦA AXIT NUCLEIC

### 3.1. MỤC TIÊU

- Sinh viên hiểu được các tính chất vật lý và hóa học của axit nucleic bao gồm tính chất tích điện âm, biến tính và hồi tính, hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm.
- Sinh viên biết cách phân biệt giữa protein và axit nucleic dựa vào sự khác biệt về tính chất vật lý và hóa học như phổ hấp thụ ánh sáng cực đại ở bước sóng 280nm, sự có mặt của các liên kết - SH tự do.
- Hiểu được nguyên lý hoạt động và biết cách sử dụng máy đo quang phổ (dải UV) và cách phân tích số liệu bao gồm: độ hấp thụ (Abs/OD), sự dịch chuyển phổ hấp thụ giữa DNA sợi đơn và sợi đôi.

### 3.2. NGUYÊN LÝ

Axit nucleic gồm 2 loại DNA và RNA. Phân tử DNA xoắn kép gồm 2 mạch polynucleotide từ các đơn phân nucleotide. Cấu trúc của phân tử DNA được Watson và Crick công bố năm 1953. Phân tử RNA mạch đơn cấu tạo từ các ribonucleotide. Axit nucleic tích điện âm (do nhóm phosphat ở đầu 5'). Phân tử DNA có khả năng biến tính ở nhiệt độ cao, nồng độ urea. Biến tính là hiện tượng 2 mạch của phân tử DNA tách rời nhau. Sự biến tính DNA phụ thuộc vào chiều dài và thành phần base nitơ trong phân tử DNA.

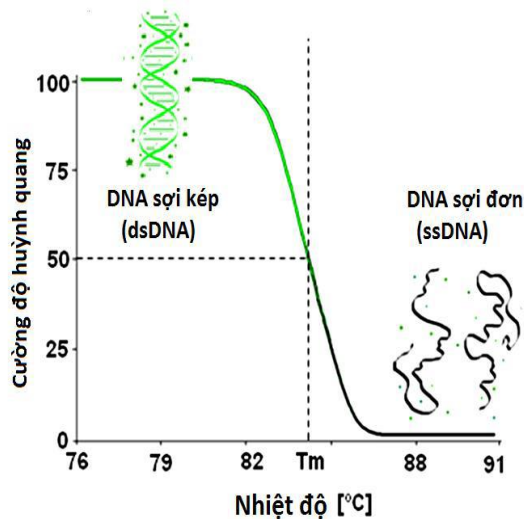
Axit nucleic có khả năng hấp thụ ánh sáng cực đại ở bước sóng 260nm trong khi đó phân tử protein hấp thụ cực đại ở bước sóng 280nm. Dựa vào đặc điểm này người ta có thể phân biệt, định tính, định lượng và xác định độ sạch của một mẫu axit nucleic.

Với cùng một lượng axit nucleic trong cùng một đơn vị thể tích (dung dịch), độ hấp thụ ánh sáng sẽ khác nhau ở các mẫu DNA mạch kép (dsDNA), DNA sợi đơn (ssDNA) và RNA sợi đơn (ssRNA). Phân tử dsDNA sẽ có độ hấp thụ ánh sáng thấp hơn so với phân tử DNA sợi đơn hoặc RNA. Nguyên nhân là do hiện tượng che khuất ánh sáng xảy ra trong cùng 1 điều kiện thí nghiệm. Chính vì vậy, khi định lượng DNA với cùng một đơn vị hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm ( $A_{260}$ ), hàm lượng dsDNA, ssDNA và ssRNA sẽ khác nhau (xem công thức chuyển đổi dưới đây). Chính vì vậy, khi phân tử dsDNA bị biến tính tách thành sợi đơn sẽ có sự biến đổi về giá trị độ hấp thụ ánh sáng.

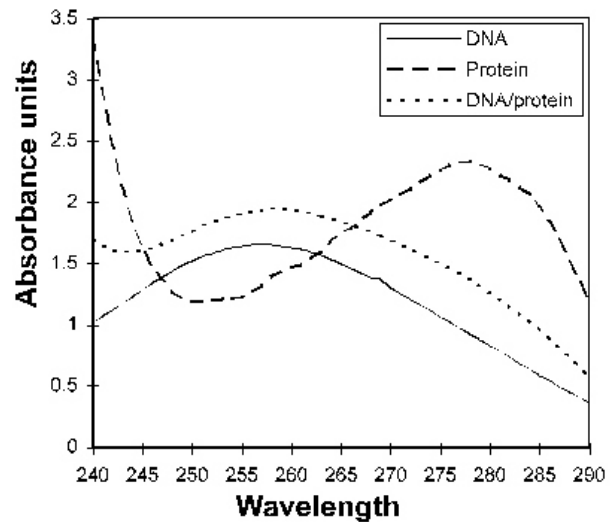
- $A_{260} \text{ dsDNA} = 50 \mu\text{g/ml}$ .
- $A_{260} \text{ ssDNA} = 37 \mu\text{g/ml}$ .
- $A_{260} \text{ ssRNA} = 40 \mu\text{g/ml}$ .

Tùy thuộc vào chiều dài và trình tự, khi bị đun nóng, hai mạch của phân tử DNA sẽ tách nhau ra. Hiện tượng này gọi là biến tính DNA. Nhiệt độ mà ở đó  $\frac{1}{2}$  lượng DNA

mạch kép (dsDNA) bị tách thành mạch đơn (ssDNA) được gọi là nhiệt độ nóng chảy,  $T_m$  (Hình 3.1). Khi nhiệt độ giảm xuống từ từ, hai mạch đơn của phân tử DNA sẽ bắt cặp bổ sung (lai) với nhau hình thành phân tử DNA sợi kép. Trong điều kiện có mặt chất biến tính (urea) hoặc sau khi đun sôi và nhiệt độ giảm đột ngột (đặt vào nước đá) khi đó trong hỗn hợp mẫu DNA sẽ có nhiều phân tử DNA sợi đơn. Việc thay đổi này sẽ được quan sát bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 260nm.



Hình 3.1. Nhiệt độ nóng chảy của phân tử DNA



Hình 3.2. Phổ hấp thụ của DNA, RNA và protein

### 3.3. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

#### 3.3.1. Vật liệu

- DNA Lambda gốc có nồng độ 1 µg/µl: 01 (mẫu A);
- Mẫu DNA tổng số tách chiết từ lúa: 02 (mẫu B và C).

#### 3.3.2. Hóa chất

- Dung dịch TE (10mM Tris-HCl, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA);
- Nước khử Ion.

#### 3.3.3. Thiết bị và dụng cụ

- Máy đo quang phổ UV-VIS dải ánh sáng từ 110 -1200 nm: 01;
- Micro cuvette thủy tinh và thạch anh (Quartz): 02;
- Block nhiệt (thermo plate): 01;
- Pipette 1 mL: 02;
- Đầu tip 1 mL: 1x55 hộp;
- Ống eppendorf 1,5 mL: 5x5;

- Cốc đá: 01;
- Bút viết kính: 1x5;
- Giấy lau: 1x5 hộp.

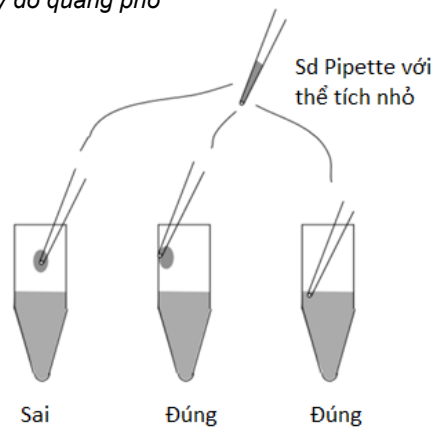
### 3.4. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

#### 3.4.1. Xác định độ tinh sạch của mẫu DNA

- Tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 260 và 280nm;
- Đo lặp lại mỗi mẫu 3 lần;
- Tính tỉ lệ độ hấp thụ A260/A280 và phân tích.



Hệ thống máy đo quang phổ



Cách đặt đầu tuýp khi nhả lượng dịch nhỏ

- Hút 90 $\mu$ l nước khử Ion và ống eppendorf 0,2ml, bổ sung 10 $\mu$ l dung dịch DNA lambda nồng độ 1  $\mu$ g/ $\mu$ l được dung dịch có nồng độ 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l.

- Hút 50  $\mu$ l dung dịch pha loãng cho vào ống eppendorf 0,2 ml, đậy nắp chặt và cho vào máy đun nóng đã đặt sẵn nhiệt độ 100°C trong 5 phút sau đó lấy ra cho ngay vào khay đá (mẫu 2).

- Tương tự, hút 50 µl dung dịch pha loãng cho vào ống eppendorf 0,2 ml, đậy nắp chặt và cho vào máy đun nóng đã đặt sẵn nhiệt độ 100°C trong 5 phút sau đó để nguội từ từ (mẫu 3).

- Pha loãng dung dịch protein BSA bằng dung dịch đệm Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Nồng độ cuối cùng 0,1mg/ml (tương đương 0,1µg/µl).

- Đặt nhiệt độ máy đun nóng 100°C, chuẩn bị khay đá.

- Bật máy đo UV-VIS, cài đặt chương trình (theo hướng dẫn của giáo viên).

### **3.4.2. Đánh giá tính chất biến tính của DNA**

- Hút 90µl dung dịch TE và ống eppendorf 0,2ml, bổ sung 10µl dung dịch DNA lambda nồng độ 1µg/ µl được dung dịch có nồng độ 0,2µg/µl (mẫu 1).

- Hút 50µl dung dịch pha loãng cho vào ống eppendorf 0,2ml, đậy nắp chặt và cho vào máy đun nóng đã đặt sẵn nhiệt độ 100°C trong 5 phút sau đó lấy ra cho ngay vào khay đá (mẫu 2).

- Tương tự, hút 50µl dung dịch pha loãng cho vào ống eppendorf 0,2ml, đậy nắp chặt và cho vào máy đun nóng đã đặt sẵn nhiệt độ 100°C trong 5 phút sau đó để nguội từ từ (mẫu 3)

- Hút 1µl các mẫu 1, 2 và 3 cho vào micro cuvette và đo độ hấp thụ ánh sáng trong dải UV ở các bước sóng 260 và 280 nm. Ghi lại số liệu thu được.

*Yêu cầu:*

So sánh số liệu đo từ các mẫu 1, 2 và 3. Giải thích kết quả.

### **3.4.3. Kỹ thuật định lượng DNA**

Hút 100µl dung dịch protein BSA có nồng độ 0,1µg/µl cho vào 1 ống eppendorf. Hút một lượng thể tích phù hợp cho vào microcuvette và đo ở dải bước sóng từ 180 đến 1000nm. Quan sát đỉnh hấp thụ và giá trị hấp thụ ở các bước sóng 230, 260 và 280nm tương ứng của polysaccharide, axit nucleic và protein.

*Yêu cầu:*

Xác định giá trị OD (optical density) của mẫu ở các bước sóng 230, 260 và 280nm và phát hiện đỉnh hấp thụ của protein.

So sánh giá trị OD ở các bước sóng thu được.

### **3.5. NHỮNG ĐIỂM CẦN LƯU Ý**

- Thao tác sử dụng với microcuvette đòi hỏi thao tác cẩn thận và chính xác. Khi lau microcuvette phải sử dụng giấy không bụi.

Máy đo quang phổ:

Là thiết bị thường được sử dụng để xác định hàm lượng một số chất như Protein, DNA, chlorophyl, tinh bột... trong dung dịch dựa vào mức độ hấp thụ cực đại ở các bước sóng ánh sáng khác nhau tương ứng với mỗi loại dung dịch. Dựa vào công thức hoặc đồ thị chuẩn có thể xác định được hàm lượng của các chất. Hiện nay, một số máy hiện đại có thể hiển thị ngay các thông số của dung dịch cần đo như hàm lượng protein, DNA, polysacharide...

## **CÂU HỎI ÔN TẬP**

1. Tính chất biến tính và hồi tính của DNA trong thực tế được ứng dụng trong trường hợp nào?
2. Giải thích tại sao phân tử DNA và protein lại hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm và 280nm?
3. Ngoài cách phân biệt protein và DNA dựa vào phổ hấp thụ ánh sáng và sự có mặt của nhóm thiol (-SH), còn có thể phân biệt bằng những cách nào?

## BÀI 4. NGHIÊN CỨU MỐI TƯƠNG TÁC CÁC ĐẠI PHÂN TỬ SINH HỌC DNA VÀ PROTEIN

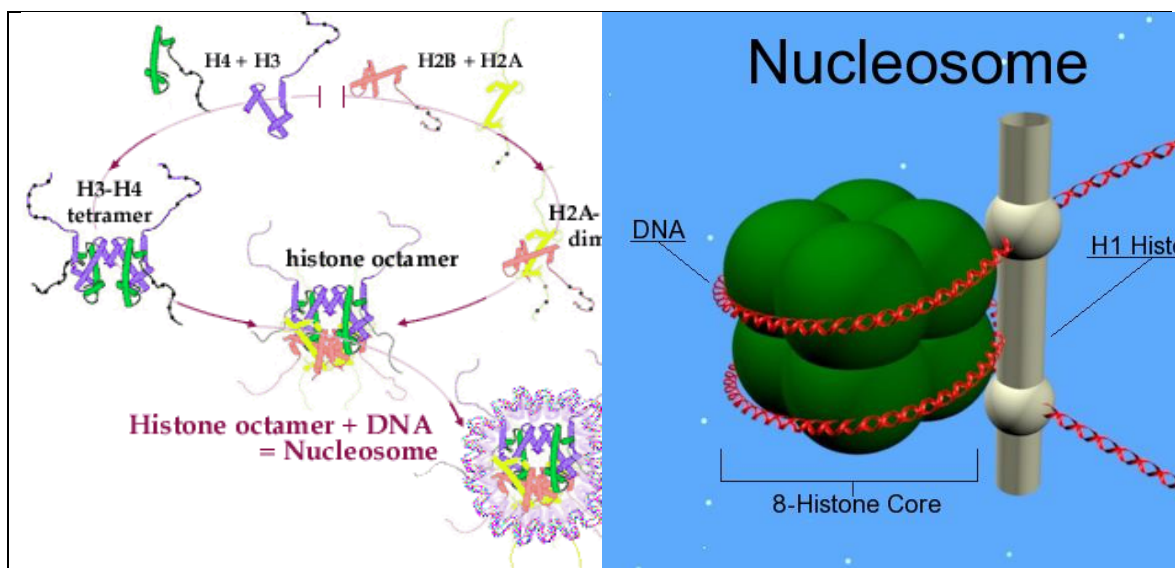
### 4.1. MỤC TIÊU

- Sinh viên được tìm hiểu mối tương tác và ý nghĩa giữa DNA và protein trong cơ thể sống.
- Sinh viên tiến hành được thí nghiệm chứng minh mối tương tác DNA và protein.

### 4.2. NGUYÊN LÝ

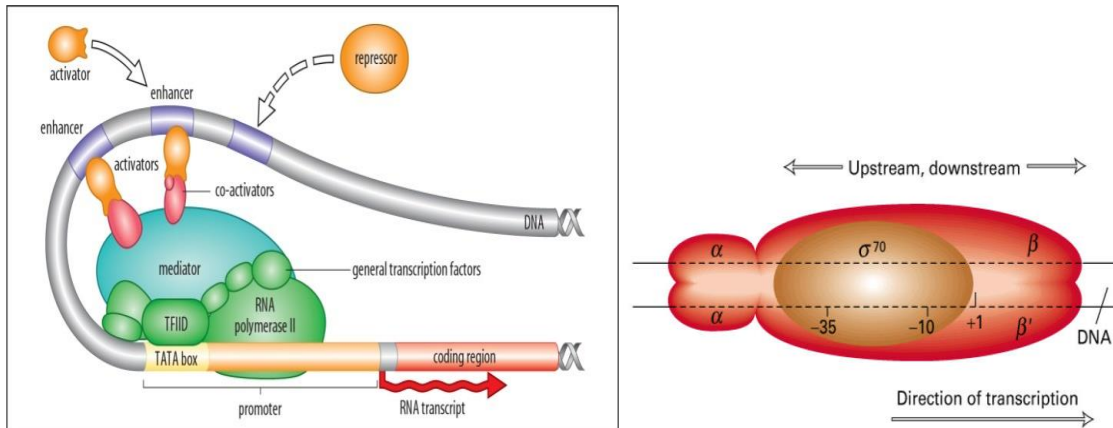
- Đại phân tử DNA được cấu tạo từ các đơn phân nucleotide. Ở sinh vật nhân chuẩn (Eukaryote), hầu hết lượng DNA tập trung ở trong nhân tế bào (chiếm tới 98 - 99%), được tổ chức chặt chẽ trong các cấu trúc của nhiễm sắc thể (NST). Đối với sinh vật nhân sơ, DNA tập trung dưới dạng vòng kép, dạng búi.

- Sợi kép DNA mang điện tích âm (do cấu trúc của nucleotide có nhóm 3-OH và đầu 5-phosphat), cuộn xoắn với 8 protein histon mang điện tích dương để đảm bảo trung hoà về điện cho các tế bào. Histone là protein cấu trúc chính của NST. H2A và H2B, H3 và H4 hình thành histone octamer. Phân tử DNA cuộn 1.7 lần (khoảng 146 bp) quanh Histone octamer để hình thành cấu trúc nucleosome.



Hình 4.1. DNA cuộn xoắn với protein histone hình thành cấu trúc nucleosome

- RNA polymerase phải bám vào vị trí vùng promoter, phiên mã sẽ được diễn ra.
- Đối với sinh vật nhân sơ (prokaryote) ở giai đoạn khởi động, yếu tố sigma gắn vào vị trí promoter: gắn một cách lỏng lẻo ở vị trí -35, sau đó, hộp Pribnov (TATA box) sẽ tháo xoắn dần tạo ra sợi đơn DNA làm khuôn để phiên mã.



**Hình 4.2. Sự tương tác của DNA và các yếu tố phiên mã trong quá trình phiên mã**

Như vậy: DNA và protein có mối tương tác với nhau trong các quá trình biểu hiện gen.

#### 4.3. TIẾN HÀNH

- Chuẩn bị 3 ống eppendorf chứa:

|                    |     |               |
|--------------------|-----|---------------|
|                    |     |               |
| Nước cất khử trùng | DNA | DNA + Protein |

- Tiến hành phản ứng chạy điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra khả năng di chuyển của DNA và phức hợp DNA và protein trong điện trường dòng điện một chiều.

- Kết quả:

**Yêu cầu:** sinh viên tiến hành thí nghiệm và giải thích kết quả thí nghiệm bằng cách nộp báo cáo thực hành.

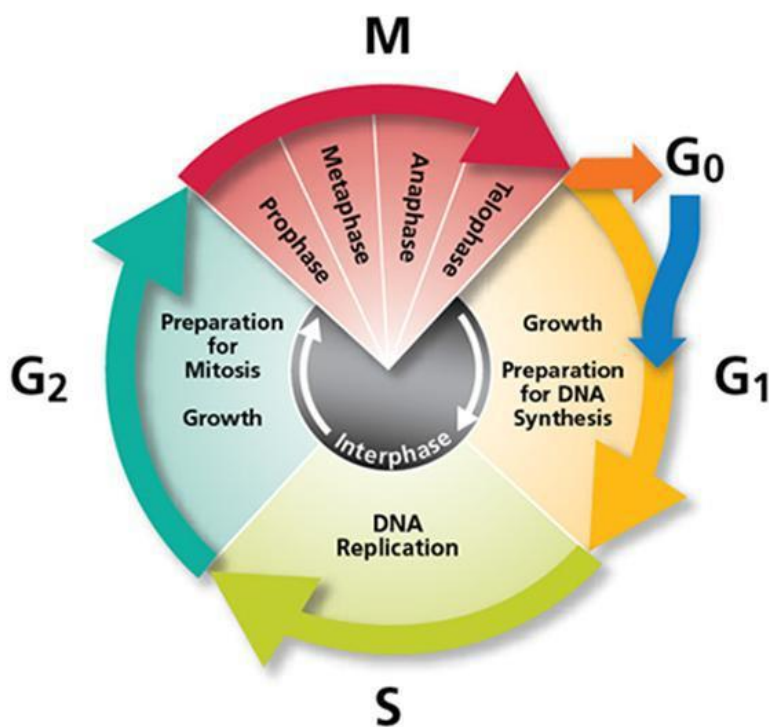
## BÀI 5. DNA POLYMERASE VÀ QUÁ TRÌNH TÁI BẢN DNA

### 5.1. MỤC TIÊU

- Sinh viên hiểu được vai trò của enzyme DNA polymerase trong quá trình nhân đôi tế bào thông qua việc ức chế hoạt động của enzyme này bởi chất ức chế đặc hiệu.
- Sinh viên biết cách nuôi cấy vi khuẩn, đếm số lượng tế bào bằng phương pháp đo quang phổ và xác định tế bào sống bằng cách đếm khuẩn lạc.

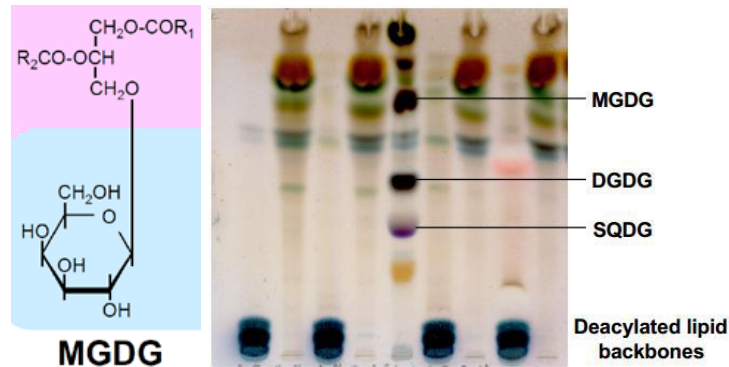
### 5.2. NGUYÊN LÝ

Để nhân đôi tế bào (nguyên phân) tế bào phải nhân đôi DNA trong pha S (Hình 5.1). Enzyme DNA polymerase thực hiện quá trình sao chép DNA. Nếu DNA không được sao chép tế bào sẽ không thể phân chia. Trong tự nhiên nhiều hợp chất có khả năng ức chế hoạt động của enzyme DNA polymerase vì thế chúng sẽ ức chế phân chia tế bào.



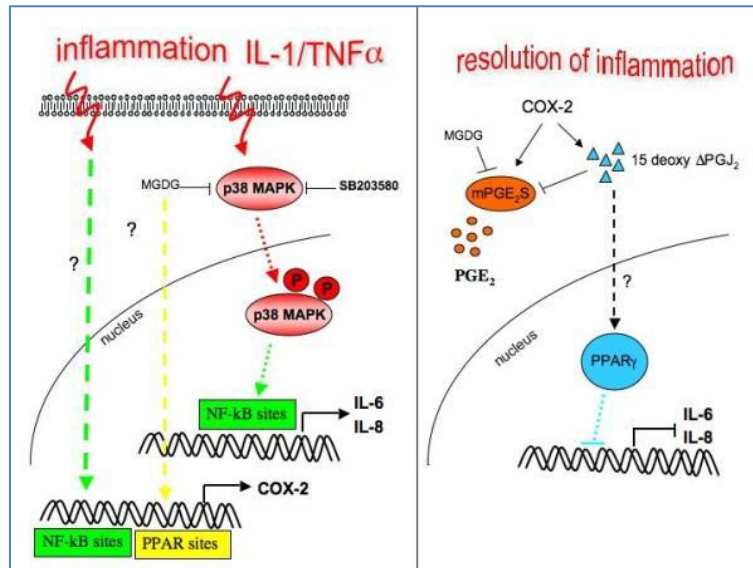
Hình 5.1. Chu kỳ tế bào

Một số hợp chất thuộc loại glycolipid ở thực vật bậc cao (hình 5.2) có tác dụng ức chế hoạt động của enzyme DNA polymerase như: monogalactosyl diacylglycerol (MGDG), digalactosyl diacylglycerol (DGDG) và sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG).



Hình 5.2. Các hợp chất có khả năng ức chế DNA polymerase ở lá cây spinach

Gần đây MGDG được sử dụng làm chất kháng viêm và ứng chế phát triển khối u ung thư dạ dày thông qua tác dụng ức chế hoạt động của enzyme DNA polymerase. Khi tế bào đang tiến hành nhân đôi, MGDG ức chế làm cho tế bào dừng phân chia ngay ở kỳ G1, dẫn đến kích hoạt cơ chế tự chết của tế bào (apoptosis) (Hình 5.3).



Hình 5.3. Cơ chế ức chế quá trình tái bản DNA bởi MGDG

Trong bài thực hành, sinh viên sẽ thực hiện thí nghiệm kiểm tra ảnh hưởng của MGDG lên hoạt động của enzyme DNA polymerase thông qua đánh giá sự nhân lên của tế bào vi khuẩn *E.coli* tăng lên theo thời gian nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng có bổ xung MGDG.

### 5.3. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT

#### 5.3.1. Dụng cụ

- Ống Falcol nuôi cấy vi khuẩn 50 mL sạch, khử trùng: 10 ống (2 ống/nhóm);

- Máy lắc ấm ở 37°C: 1 máy có nhiều vị trí đặt bình nuôi;
- Máy đo quang phổ: có 2 cuvet;
- Pipet 1 mL: 02;
- Đầu tip 1 mL (2 hộp);
- Bút viết kính, giấy lau.

### 5.3.2. Hóa chất

- Dung dịch vi khuẩn gốc;
- Môi trường nuôi cấy (Môi trường LB lỏng và đặc đã được pha sẵn);
- Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) (C45H74O10) [MM29186, Carbosynth];
- Nước cất.
- Trước buổi học 1 ngày, sinh viên tiến hành nuôi cấy vi khuẩn 1 ống có bổ sung 5µg/mL MGDG và 1 ống không bổ sung MGDG

### 5.4. TIẾN HÀNH

**Chia nhóm:** Sinh viên chia thành nhóm, mỗi nhóm 4 - 5 người

- Chuẩn bị ống nuôi cấy: mỗi nhóm 2 ống ghi rõ ký hiệu (tên sv đại diện, ngày giờ bắt đầu nuôi).
  - Đổ 5 mL môi trường nuôi vào ống Falcol.
  - Dùng pipet hút 0,25 ml dịch vi khuẩn cho vào mỗi ống.
- Bổ sung 5 µl MGDG nồng độ 5 µg/mL vào 1 bình (đánh dấu +, ống còn lại đánh dấu -).
- Nuôi cấy ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/ phút trong 24 giờ.
- Đánh giá sự phát triển (nhân lên) của vi khuẩn:
  - Dùng máy lắc, hút 100 µl dịch nuôi cấy vi khuẩn vào ống eppendorf.
  - Pha loãng với nước cất theo tỉ lệ: 1/10.
  - Đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng buồng đếm hoặc máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm và tính theo công thức  $OD_{600} = 1$  tương đương với  $10^8$  tế bào/mL.
- So sánh số lượng tế bào *E.coli* ở 2 ống để đánh giá hiệu quả ức chế enzyme DNA polymerase của chất MGDG.

### 5.5. CHÚ Ý

- Sinh viên hiểu rõ mục đích bài thực hành và nắm được cách tiến hành thí nghiệm.
- Sinh viên nuôi cấy được vi khuẩn và xác định được số lượng tế bào vi khuẩn trong dịch nuôi cấy.

## **CÂU HỎI ÔN TẬP**

1. Vai trò của enzyme DNA polymerase trong nguyên phân ở vi khuẩn?
2. Nêu tác dụng của chất ức chế monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) lên DNA polymerase và ứng dụng?

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carson S., Miller H. B. & D. Witherow S (2012). Molecular Biology Techniques: A Classroom Laboratory Manual. Third edition, Elsevier
2. Hồ Huỳnh Thùy Dương (2008). Sinh học phân tử. NXB giáo dục, Hà Nội.
3. Kimble M. & Schirmer A., (2015). General Genetics Laboratory Manual. Kendall Hunt Publishing; 2 edition.
4. Phan Hữu Tôn (2009). Giáo trình Sinh học phân tử đại cương. NXB nào?