

## Chương 10: PHÂN TÍCH CÁC BIỂU HIỆN CẢ GEN CỦA CHẾ ĐỘ NGUYÊN CẢ GEN

### GIỚI THIỆU

Lai Northern blot là một kỹ thuật trong đó các kích thước khác nhau của các phân tử RNA được tách ra trong một gel agarose, gắn vào màng nylon hoặc nitrocellulose, và sau đó lai với một DNA đã được đánh dấu hoặc một đầu RNA. Không giống như kỹ thuật Southern blot có liên quan đến sự lai giữa DNA-DNA, con lai Northern blot thực sự là giữa RNA-DNA hoặc lai giữa RNA-RNA. Về kỹ thuật, Northern blot không phải là một tên gọi; chúng không phải là do một vị trí giải. Thực tế, kỹ thuật này đã được phát triển dựa trên các phương pháp Southern blot, và do đó tên gọi là phương pháp Northern blot.

Kỹ thuật Northern blot là một trong những công cụ cơ bản nhất và mạnh mẽ nhất sử dụng trong phân tích các biểu hiện gen. Đây là một phương pháp rất nhạy, đáng tin cậy và sử dụng rất dễ dàng trong một các điều kiện khác nhau của RNA. Phân tích RNA là một phương pháp mạnh mẽ theo dõi hoạt động của một gen trong sinh học tế bào và mô. Mặc dù thực tế là các phương pháp khác nhau về RNase và con lai dot/slot blot có thể sử dụng cho phân tích RNA và ngược lại, phương pháp northern blot có một số lợi thế. Như đã chứng minh trước đây, các biểu hiện của gen thường phức tạp. Nhiều phân tử RNA có thể biểu hiện một gen nhỏ và hàng ngàn RNA được tạo ra từ một tế bào, mô hoặc sinh vật. Northern blot phân tích cũng có thể cung cấp thông tin về các loài, kích thước và mức độ biểu hiện của các RNA, có thể không thể hiện bằng các kỹ thuật thay thế như các dot/slot blot và thí nghiệm về RNA. Ngoài ra, bằng cách màng tế bào chứa một bản ghi của các loài khác nhau RNA có thể được tái sử dụng để phân tích các bản sao RNA nhiều từ một số gen trong cùng một mẫu RNA. Do đó, giá trị và các ứng dụng của công nghệ northern blot là rất lớn.

Chương này cung cấp chi tiết các giao thức chuẩn northern blot và cho PCR nhỏ gọn và phân tích dot blot biểu hiện mRNA.

**NGUYỄN T C VÀ L U Ý CHUNG**

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

Các nguyên tắc chính và các bước lai northern blot được minh họa trong hình 10.1. Các RNA khác nhau trước tiên sẽ được làm bất hoạt tính bằng formaldehyde và sau đó tách theo kích thước phân tử của nó theo tiêu chuẩn rãnh agarose gel. Mat gel agarose như là một phân tử lỏng, các phân tử vận chuyển trong rãnh rãnh là một ống lồng cho sự di chuyển của các RNA mang điện tích âm trong rãnh rãnh. Các RNA sau đó sẽ di chuyển và tách ra hoặc chuyển vào một màng nylon hoặc màng nitrocellulose. Nói chung, các vị trí khác nhau của RNA trong gel agarose sẽ ghi lại trên màng. Sau khi các phân tử RNA liên kết ngang trên màng, riêng biệt hoặc các chuỗi liên tiếp của RNA có thể lai với một đầu dò DNA hoặc RNA quan tâm, tiếp theo là tìm ra một phương pháp thích hợp để phát hiện.

Một khái niệm quan trọng liên quan đến các nguyên tắc của mRNA phiên mã từ gen hoặc DNA của nó là quy tắc bổ sung. Điều này có nghĩa là trình tự của một mRNA bổ sung cho các mạch DNA mà từ đó nó đã được sao chép, ngoại trừ base T sẽ thay thế bằng U. Điều này chính là base ghép nối hoặc bổ sung s-t nên những sự liên kết DNA hoặc đầu dò RNA lai với chuỗi liên tiếp của mRNA bằng liên kết hydro. Điều này vì các đầu dò, một đầu dò RNA hoặc riboprobe sao chép trong phòng thí nghiệm đã được chứng minh là nhạy cảm hơn hoặc nóng hơn một đầu dò DNA. Ngoài ra, quá trình lai RNA-RNA sẽ nhanh hơn so với lai RNA-DNA. Vì vậy, quá trình lai và rà soát sẽ thể hiện theo các điều kiện nghiêm ngặt cao, do đó làm giảm khả năng phát triển của một lỗi liên quan không thể hiểu.

Bởi vì các RNA khi so với DNA thì chúng là các phân tử rất linh hoạt cho nên sẽ bị mất mát do sự phân hủy của RNases, quá trình này nên được thể hiện nhằm duy trì tính khiết và toàn vẹn của các RNA. Điều này rất quan trọng cho lai northern blot. Hoạt động RNase là không đáng kể hoặc không. Hai nguyên nhân chính làm cho RNase mất tính sạch là tay của người dùng và môi trường và nấm mốc có mặt trên các bề mặt trong không khí. Để tránh bị nhiễm RNase, nên đeo găng tay và thường xuyên thay đổi khi xử lý các RNA. plasticware dùng một lần nên được khử trùng. Các dụng cụ không phải là thủy tinh và plasticware cần được khử trùng bằng pyrocarbonate diethyl 0,1% (DEPC) trong dd.H<sub>2</sub>O và được khử trùng khi sử dụng. DEPC là một chất ức chế RNase mạnh.

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

Thy tinh có thể chịu được 250°C suốt đêm. Hệ thống gel cần ngâm với SDS 0,2% qua đêm và rửa sạch bằng chất tẩy rửa tiệt trùng theo sau với nước đã xử lý DEPC. Thời gian rửa RNA, nếu có thể, nên thực hiện để tách ra sản phẩm cho in di DNA hay protein. Hóa chất cần sử dụng phải tinh khiết và RNase-tinh sạch. Hệ thống gel, dung dịch ngâm rửa, phải rửa sạch lại để loại bỏ và rửa sạch để thực hiện với nước đã xử lý DEPC hoặc xử lý bằng một vài giọt DEPC.

Trong kỹ thuật lai Southern blot, một Northern blot tiêu chuẩn bao gồm những bước: (1) chuyển các RNA cần phân tích, (2) in di trên agarose gel của các phân tử RNA, (3) thêm các RNA vào một màng rây; (4) lai các RNA với một DNA có nhãn hoặc dò RNA, và (5) phát hiện các tín hiệu lai. ) in di trên agarose gel là một công cụ phân biệt các RNA khác nhau. Agarose cần chỉ sử dụng trong bình và là một loại polymer với các thành phần bao gồm các D-galactose và L-galactose. Khi agarose đông bằng cách đun sôi và sau đó đông lạnh, nó hình thành một hệ thống có tác dụng như một màng lọc phân tử với hiệu suất khác nhau của việc tách RNA cần tách ra trong quá trình in di.

Một sự yếu tố chung cần lưu ý khi thực hiện in di RNA trên agarose gel: một agarose siêu tinh khiết là RNase tinh khiết rất cần thiết để thực hiện kỹ thuật phân tích RNA và nồng độ agarose sẽ ảnh hưởng đến sự phân tách RNA. Thông thường, nồng độ phân tử RNA có kích thước lớn sẽ ảnh hưởng đến agarose cho nên nó sẽ có sự ngưng tụ các băng hình sắc nét.

Trong quá trình in di, RNA di chuyển qua hệ thống gel với một tốc độ khác nhau vì trọng lượng phân tử của chúng. RNA nhỏ di chuyển nhanh hơn so với các phân tử RNA lớn hơn.

## **CÔNG THỨC TỔNG HỢP RNA VÀ THÀNH LẬP CÁC mRNA**

Chi tiết mô tả trong Chương 3.

### **IN DI RNA SẢN PHẨM AGAROSE GEL**

1. Làm sạch khay chạy gel và lắp ráp cách ngâm chúng trong dung dịch 0,2% SDS qua đêm và rửa sạch bằng chất tẩy rửa. Hoàn tất quá trình tẩy rửa bằng nước máy và rửa lại bằng nước cất 3-5 lần.

2. Chuyển hỗn hợp formaldehyde agarose gel trong một chai sạch hoặc trong một cốc nhỏ sau:

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

Lưu ý: nồng độ agarose thông thường là 1% (w/v), nhưng nó có thể điều chỉnh để phù hợp với các kích thước của các RNA cần tách ra. DEPC nên pha với dd H<sub>2</sub>O. Vì agarose là chi m m t l ã ng nh ã nên th ã tích c ã nó có th ã c b qua trong tính toán t ãng th ã tích.

3. Đặt chai (v ãi n p r ãi) ho c c c trong lò vi sóng và làm nóng h ãn h p agarose trong 1 phút. Sau ó l c nh l ã r ã b t agarose b ã dính vào thành bình th ãy tính.

làm tan agarose hoàn toàn, ti ãn hành ãn sôi nh ã t l ãn 3 phút, tùy thu c vào th ã tích c ã h ãn h p agarose. L c nh h ãn h p, m ãn p ã và cho h ãn h p ãngu ãi t 50 ãn 60°C.

4. Trong khi h ãn h p gel ã c làm mát, lau s ãch khay gel, t ãi hai ãu dùng b ãng keo ho c m b t kín l ãi và ch ãn l ãc úng v trí.

5. Thêm các thành ph ãn sau vào h ãn h p gel ãngu ãi:

6. Nh ã nhàng chuy ãn h ãn h p gel vào trong khay ch ãa gel. Gel s ãc ãng sau khi nh ãi t ã phòng kho ãng 30 phút.

*Chú ý: Formaldehyde là ch ãt c ã h ãi; c DEPC và EtBr ãu là ch ãt gây ung th ã. Nh ãng hóa ch ãt c ãn ãc x lý c ãn th ãn. Ph ãi mang g ãng tay khi làm vi c v ãi các hóa ch ãt này. Gel có ch ãa EtBr ph ãi c t p trung trong m t thùng ch ãa c bi t ãc ch ãnh x lý ch ãt th ãi c ã h ãi. Formaldehyde nh ãm ã làm bi ãn tính c ãu trúc ph ãc ã các RNA. EtBr ãc s ã d ãng ãnhu m các ph ãn t RNA, c xen k trong các vùng c ãa c ãu trúc th ãc p c ã ãnh ãng RNA và phát hu ãnh quang màu da cam khi ãc chi ãu sáng v ãi tia UV. M t cách khác là d ãa vào các v t gel sau khi ãi ãn ãi hoàn t t. Các m ãu gel có th ã c ãnhu m v ãi EtBr trong vòng 10 ãn 30 phút sau ó r ãa trong ãc c t t 3 ãn 5 phút. Ngoài ra, có th ã b ãsung tr c ãi p m t l ãng th ã tích h p EtBr vào các m ãu RNA.*

7. Trong khi ã gel c ãng, chu ãn b các m ãu RNA trong ãng vô trùng nh ã sau:

T ãng s RNA (10 ãn 35 µg/lane)

ho c poly (A) + RNA (0,2-2 µg/lane), 6 µl

10X MOPS buffer, 3,5 µl

Ultrapure formaldehyde (37%, 12.3 M), 6.2 µl

Ultrapure formamide (50% v/v), 17.5 µl

Thêm DEPC ã x lý dd.H<sub>2</sub>O cho th ã tích 35 µl

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

8. Đun nóng ống nghiệm 55°C trong 15 phút và làm lạnh nhanh trên đá lạnh để làm bất hoạt tính các RNA. Nghiệt khô xuống đáy.

9. Thêm 3,5 µl dung dịch mẫu 5X DEPC cho các mẫu RNA. Tiến hành load mẫu.

10. Đặt và kéo theo chiều dọc trong gel và loại bỏ các băng dán hồ dán khỏi khay gel. Đặt khay gel trong máy điện di và thêm một thể tích mẫu MOPS 1X cho đến khi bề mặt gel ngập 1,5 đến 2 mm.

*Lưu ý: Các dải phim kéo ra khỏi gel để theo chiều dọc bởi vì bất kỳ vết nứt nào xảy ra bên trong các giếng của gel sẽ gây ra sự rò rỉ của mẫu khi load mẫu. Phía trên cùng của gel nên đặt giếng phim để phía trên trong buồng vì phân tử RNA mang điện tích âm sẽ di chuyển về phía cathode. Nếu bất kỳ giếng nào có bọt khí, chúng cần được tách ra khỏi giếng bằng cách sử dụng một mỏ pipette lên xuống nhẹ nhàng. Các bọt khí có thể gây nhiễu kết quả trong quá trình load mẫu và điện di các mẫu này. Nếu dung dịch mẫu TBE không bao giờ có thể pha 0.4X. Nếu không, các gel có thể tan chảy trong quá trình điện di. Tránh khi chạm gel thì nên chạm nhẹ vào điện không chạm trong 10 phút là tùy chọn nhẹ nhàng.*

11. Chuyển load các mẫu, đặt mẫu vào giếng thích hợp trong gel ngập nước.

*Ghi chú: (1) Mẫu pipette không cần sử dụng cho tất cả các giếng vì mẫu này có thể làm nhiễu nếu rò rỉ của các mẫu sẽ gây ra nhiễu. Nếu mẫu tiếp xúc các mẫu RNA cần vị trí theo chiều dọc mẫu là tất cả, nên bôi trơn ngón tay của bàn tay kia và tất cả chuyển vào. (2) Các dung dịch phim có nồng độ cùng ít nhất là 1X, nếu không, các mẫu có thể bị rửa trôi khỏi giếng.*

12. Sau khi tất cả các mẫu được load, tính chiều dài của gel giữa hai điện cực và thiết lập điện áp cung cấp từ 5 đến 15 V/cm. Cho phép điện di tiến hành trong 2 giờ hoặc cho đến khi khoảng cách đầu tiên của thuốc nhuộm màu xanh còn cách 1 cm từ cuối gel. Nếu cần thì tiến hành điện di thì ngừng điện áp nên xác nhận bằng thực nghiệm.

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

13. Dùng điện di và kỹ thuật nhuộm để xác định các băng RNA trong gel dưới tia UV. Chuẩn bị gel và máy ảnh Polaroid.

*Chú ý: Mang kính an toàn và đeo tay bảo vệ khi làm việc dưới tia UV.*

*Ghi chú: Mục đích của việc chuẩn bị là để ghi lại các phân tử RNA khác nhau tại các vị trí khác nhau sau khi điện di, nó rất hữu dụng khi muốn tái hiện lại các phát hiện. Hình ảnh được chụp với kính hiển vi quang học bên cạnh gel. Một tí p-xút được bôi tại các vị trí có các băng rRNA để tăng cường độ nét và làm cho nó có màu đen. Để dễ dàng tách RNA thành công trên gel, các vị trí mRNA bị nhòe và các vị trí rRNA sẽ nét ban đầu sẽ hiển thị trên máy ảnh. Hai băng rRNA sẽ nét là 28S và 18S cho RNA tổng hợp và 25S và 18S cho RNA thực vật.*

Vật liệu cần thiết

Máy ly tâm

ống nghiệm ly tâm (0,5 hoặc 1,5 ml)

Pipette hoặc pipetman (0-200 $\mu$ l, 0-1000 $\mu$ l)

ống pipette vô trùng (0-200 $\mu$ l, 0-1000 $\mu$ l)

Khay gel

lịch gel

Thiết bị điện di

Nguồn điện DC

Kích thước của thiết bị điện di RNA và nhũ, tùy thuộc vào mẫu

Agarose tính số đếm băng gel.

Toàn bộ RNA mẫu

DNA chuyên biệt hoặc mẫu RNA

Màng nylon

Màng lọc 3MM

Khung gel

UV máy chụp hình tia UV

Hybridization oven or shaker

Nước avinhiệt độ cao khi cần

Diethylpyrocarbonate (DEPC)

Formaldehyde (37%)

**Trao i tr c tuy n t i: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

Formamide

N c DEPC

0,1% DEPC trong dd.H<sub>2</sub>O, c t nhi t phòng qua êm v i m t thanh khu y vô hi u hóa b t k RNases t i m n ng. Autoclave lo i b các DEPC.

Dung d ch m 10X MOPS

0.2M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS)

80 mM sodium acetate

10 mM EDTA (pH 8,0)

Hòa vào gi ng sau m i l n thêm vào DEPC- dd H<sub>2</sub>O.

i u ch nh pH n 7.0 v i NaOH 2N

L i l c ti t trùng và b o qu n nhi t phòng.

Ethidium Bromide (EtBr)

10 mg / ml trong DEPC - dd.H<sub>2</sub>O, gi trong m t chai en ho c n u 4°C.

Chú ý: EtBr là c c k c h i và c n c x lý c n th n.

5X Loading buffer

50% Glycerol

2 mM EDTA

0,25% Bromphenol xanh

0,25% Xylen cyanol

Hòa tan t t trong n c DEPC qua x lý, l i l c ti t trùng, và l u tr t i 4°C.

## **KH N NG TH M C A MÀNG RNA TRÊN NYLON THEO PH NG PHÁP MAO D N**

Các b c ti n hành chung c trình bày trong hình 10.2 và hình 10.3. Ph ng pháp c ng t ng t nh i v i chuy n n p DNA, c mô t chi ti t trong Ch ng 7.

## **CHU N B CÁC NG V HO C KHÔNG NG V C A CÁC DNA/ U DÒ RNA**

Ph n A. CHU N B CÁC U DÒ DNA

Ph ng pháp chi ti t c mô t trong Ch ng 7.

Ph n B. CHU N B U DÒ RNA PHIÊN MÃ TRONG NG NGHI M

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

Một số vectơ plasmid đã được phát triển cho subcloning cDNA. Các vectơ có các vị trí polycloning downstream từ các promoter mạnh của bacteriophage, SP6, T7 hoặc T3 trong vector. Các cDNA quan tâm có thể được nhân bản vô tính các vị trí polycloning promoter giữa SP6 và T7 hoặc T3, tạo thành một plasmid tái tổ hợp. Các cDNA chèn vào có thể được sao chép lại và nghiên cứu trong các mRNA hoặc RNA từ plasmid DNA với các promoter SP6, T7 hoặc T3. Trong suốt quá trình phiên mã trong nghiên cứu, một trong những rNTPs là phóng xạ có gắn nhãn và có thể được kết hợp vào các RNA. Đây là những RNA có nhãn. Các mẫu dò RNA có nhãn thường có những hoạt động chuyên biệt và "nóng" hơn so với mẫu dò ssDNA. So sánh với DNA ghi nhãn, hiệu quả của các mẫu dò RNA thường là rất cao bởi vì mẫu dò này có thể được sao chép nhiều lần. Các mẫu dò RNA có thể dễ dàng chỉ tiêu thụ một mẫu DNA bằng cách sử dụng RNase S hoặc *DNase I*. Lợi thế lớn nhất của mẫu dò RNA so với mẫu dò DNA là mẫu dò RNA có thể tạo ra các tín hiệu mạnh hơn trong một loạt các phân tích khác nhau.

1. Chuẩn bị khuôn DNA phiên mã trong nghiên cứu. Plasmid được tách ra bằng một loại enzyme cắt giới hạn thích hợp để tạo nên các chuỗi "run-off".

Để làm cho các chuỗi RNA từ khuôn DNA chèn vào, tái tổ hợp plasmid DNA sẽ được phân giải bởi một enzyme cắt hạn chế thích hợp tại vị trí rctg n vị để kích thích của quá trình chèn.

a. Trên á l nh, thí t l p m t ph n ng tách plasmid:

DNA của plasmid tái tổ hợp ( $\square$ g/ $\square$ l), 5  $\square$ g

Dung dịch của enzyme cắt giới hạn thích hợp 10X, 2,5  $\mu$

Enzyme cắt giới hạn thích hợp, 3  $\square$ / $\square$ g DNA

Thêm dd.H<sub>2</sub>O cho thể tích 25  $\mu$ l

b. Nhiệt thích hợp từ 2 đến 3 giờ.

c. Trích DNA với một thể tích TE-phenol bão hòa / chloroform và trộn vào bằng vortexing. Ly tâm tốc độ 11.000 xg trong 5 phút nhiệt phòng.

d. Chuyển chuyển phân bên trên, dung dịch này pha vào một tube sạch và thêm một thể tích chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Trộn và ly tâm như mô tả trong bước trước.



**Trao i tr c tuy n t i: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

e. Chuy n phân bên trên, dung d ch n c pha vào m t tube s ch. Thêm 0,1 th tích mu i NaCl 2M và hai th tích 100 ethanol 100% l nh. K t t a DNA -20°C trong 30 phút.

f. Ly tâm 12.000 xg trong 5 phút, hút ph n n i bên trên và r a các k t t a trong m t th i gian ng n b ng 1 ml ethanol 70%. khô viên DNA trong 10 phút trong chân không và hòa tan các o n plasmid trong 15µl dd.H<sub>2</sub>O

g. L y 2µl c a các m u o n ng DNA b c sóng A260nm và A280nm. Tr m u -20°C cho n khi s d ng.

2. Làm b ng u 3' nhô ra s d ng s ho t ng c a các exonuclease t u 3' n u 5' c a các Klenow DNA polymerase. L u ý: M c dù ây là tùy ch n, chúng tôi ngh r ng u 3' nhô ra s c chuy n i thành u th ng b i vì m t s chu i RNA s b sung cho DNA vector. th ng. Vì v y, các enzyme nh Kpn I, Sac I, Pst I, bgl I, Sac II, Pvu I, Sfi và Sph I s không c s d ng tách DNA plasmid cho phiên mã trong ng nghi m.

3. Th c hi n t ng h p RNA thông qua phiên mã trong ng nghi m.

a. Thi t l p m t ph n ng nh sau:

5X dung d ch m cho phiên mã, 8µl

0.1M DTT, 4µl

ch t c ch rRNasin ribonuclease, 40 n v

o n DNA khuôn (0,2-1,0 g /µl), 2µl

Thêm dd.H<sub>2</sub>O n cho th tích 15,2µl

b. Thêm Klenow DNA polymerase (5 u/µg DNA) cho ph n ng và 22°C trong 15 n 20 phút

c. ph n ng, thêm các thành ph n sau:

H n h p ATP, GTP, CTP, ho c UTP (2,5 mM each), 8 µl

120 mM UTP ho c CTP, 4,8 µl

[α-<sup>32</sup>P] UTP ho c [α-<sup>32</sup>P] CTP

50 µl Ci 10µl Ci/ml), 10 µl

SP6, T7, ho c T3 RNA polymerase (15-20 u/µl), 2 µl

d. các ph n ng 37 n 40°C trong 1 h.

**Trao i tr c tuy n t i: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

e. Lo i b m u DNA s d ng DNase I, s d ng 1 u/ $\mu$ g DNA m u. trong 15 phút 37°C.

f. Trích xu t RNA v i m t th tích TE -phenol bão hòa/chloroform. Tr n u b ng vortexing và ly tâm trong 11.000xg trong 5 phút nhi t phòng.

g. C n th n chuy n giai o n, u d ch n c vào m t ng t i và thêm m t l ng chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Tr n u do vortexing và máy ly tâm 11.000 xg trong 5 phút.

h. C n th n giai o n chuy n giao, dung d ch n c pha vào m t tube s ch, thêm 0,5 th tích c a 7,5 ammonium acetate hòa tan và 2,5 kh i l ng ethanol 100% l nh. T a RNA -80°C trong 30 phút.

i. Ly tâm 12.000xg trong 10 phút. C n th n lo i b nh ng ph n n i bên trên và r a nhanh RNA v i 1 ml ethanol 70% và làm khô k t t a trong chân không trong 15 phút.

j. Hòa tan u dò RNA trong 20-50  $\mu$ l dung d ch m TE và tr -20°C cho n khi s d ng.

4. Tính toán t l hình thành và ho t ng c th c a các u dò RNA.

a. c tính cpm c s d ng trong ph n ng phiên mã. Ví d : n u 50 $\mu$ l Ci c a NTP c s d ng, cpm b ng  $50 \times 2.2 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ Ci =  $110 \times 10^6$  cpm trong 40  $\mu$ l ph n ng ho c  $2.8 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ l

b. Th c hi n m t TCA kh o nghi m b ng cách s d ng pha loãng 1:10 trong dd.H<sub>2</sub>O nh mô tr tr c ây.

c. Tính toán t l ph n tr m c a s hình thành: % hình thành = TCA k t t a cpm / t ng cpm x 100

d. Tính toán các ho t ng c th c a u dò. Ví d n u 1 $\mu$ l c a ch t pha loãng 1/10 c s d ng cho TCA k t t a, 10 x cpm k t t a. Trong 40 ph n ng, 40 x cpm/  $\mu$ l là t ng th các k t h p cpm. N u 50  $\mu$ Ci c a UTP c ghi nh n 400 $\mu$ Ci/mol c s d ng, sau ó  $50/400 = 0,125$  nmol c a UTP c thêm vào h n h p ph n ng. N u có 100% hình thành và UTP i di n cho 25% c a các nucleotide trong các u dò RNA,  $4 \times 0.125 = 0,5$  nmol các nucleotide c k t h p, và  $0.5 \times 330$  ng/nmol = 165 ng c a RNA c t ng h p. Sau ó, t ng s ng u dò RNA = % hình thành x 165 ng. Ví d , n u pha loãng 1:10 m u RNA có nh n có 2,2

**Trao i tr c tuy n t i: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

$x 10^5$  cpm, t ng c a các cpm c k t h p là  $10 \times 2,2 \times 10^5$  cpm  $\times 40\mu\text{l}$  (t ng s ph n ng) =  $88 \times 10^6$  cpm. % K t h p =  $88 \times 10^6$  cpm /  $110 \times 10^6$  cpm ( $50/\mu\text{Ci}$ ) = 80% t ng s RNA t ng h p =  $165 \text{ ng} \times 0.80 = 132 \text{ ng RNA}$ . Các ho t ng c th c a u dò =  $88 \times 10^6$  cpm /  $0.132\mu\text{g} = 6.7 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g RNA}$

*L u ý: M t cách khác là t ng h p ARN mà không s d ng m t ng v . Các RNA t ng h p có th c g n nh n b ng cách s d ng ph ng pháp ti p c n không phóng x nh mô t trong Ch ng 7.*

Thu c th c n thi t

RNase-free DNase I

2 M mu i NaCl

7,5 M mu i Amonium acetate

Ethanol (100%, 70%)

TE-bão hòa phenol / chloroform

Chloroform: isoamyl alcohol 24:1 (v / v)

m TE

Transcription 5X Buffer

200 mM Tris-HCl, pH 7.5

30 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Spermidine

50 mM NaCl

*NTPs Stock Solutions*

10 mM ATP trong dd.H<sub>2</sub>O, pH 7,0

10 mM GTP trong dd.H<sub>2</sub>O, pH 7,0

10 mM UTP trong dd.H<sub>2</sub>O, pH 7,0

10 mM CTP trong dd.H<sub>2</sub>O, pH 7,0

*Radioactive NTP Solution*

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP or [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP (400 Ci/nmol)

## **LAI VÀ PHÁT HI N TÍN HI U**

Các ph ng pháp thông th ng chung, c ng t ng t nh i v i lai DNA và phát hi n, chúng c mô t chi ti t trong Ch ng 7.

## **PHÂN TÍCH BI U HI N mRNA B NG M T PCR NH L NG**

**Trao i tr c tuy n t i: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

Nh ng b t l i c a northern blot hybridization ho c of *in situ* hybridization c a mRNA là s khó kh n trong vi c có c m t k t qu mong mu n khi phân tích bi u hi n c a nonconstitutively, gen chuyên bi t c a t bào ho c mô v i tính a đ ng th p c a các mRNA ho c khi s l ng h n ch c a các mRNA có s n do s phân rã c a chúng. ó là các h n ch , tuy nhiên, có th kh c ph c b ng cách s đ ng PCR nh l ng. Cùng m t s l ng RNA t ng s ho c mRNA t các m u khác nhau s phiên mã ng c l i thành các cDNA trong cùng i u ki n. M t cDNA c bi t c quan tâm trong t ng s các cDNA trong m i m u sau ó s c khu ch i b ng PCR, s đ ng các o n m i chuyên bi t. M t hi u qu c a quá trình khu ch i cDNA t m i m u sau khi c phân tích b ng dot blotting ho c Southern blotting s s đ ng các trình t m c tiêu gi a m i và u dò. Trong tr ng h p này, s l ng khác nhau c a mRNA th hi n b i m t gen c th trong các i u ki n khác nhau s t o ra s l ng khác nhau c a cDNA. Nh ng m c bi u hi n khác nhau c a gen có th c phát hi n d dàng b ng cách so sánh các tín hi u lai c a các m u khác nhau. Trong khi ó, m t mRNA i u khi n nh actin mRNA s phiên mã ng c và khu ch i b ng PCR, s đ ng m i chuyên bi t, đ i các i u ki n t ng t theo dõi quá trình phiên mã ng c và khu ch i b ng PCR.

1. T ng h p các u s i cDNA t t ng s RNA b cô l p ho c mRNA b ng cách s đ ng ph ng pháp sao mã ng c và dùng Oligo (dT) làm m i. Quá trình này c mô t chi ti t trong Ch ng 3.

2. Thi t k m i khu ch i các cDNA PCR c bi t. Thi t k m i oligonucleic acid đ a trên trình t axit amin trong hai khu v c khác nhau c a m t cDNA c th . Ví d , hai m i oligonucleotide có th c thi t k nh sau i v i hai khu v c trên chu i amino acid, NDPNG và DPCEW.

M i xuôi = 5' AAC(T)GAT(C)CCIAA(C)TGGI 3' b t ngu n t NDPNG

M i ng c = 3'GGTGAGCGTCCCTAG 5' b t ngu n t DPCEW

L u ý: I là vi t t t cho v trí th ba c a codon, có th c b t k TCAG. Các m i có th t o ra m t s n ph m c a 554 c p base.

khu ch i c a actin cDNA, m i có th c thi t k nh sau:

M i xuôi = 5'ATGGATGACGATATCGCTG 3'

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

M i n g c = 5'ATGAGGTAGTCTGTCAGGT 3'

L u ý: Các m i có th t o ra m t s n ph m c a 568 c p base.

3. Th c hi n khu ch i PCR.

a. Trong m t tube ly tâm 0,5 ml c t trên á, thêm các ch t sau ây theo th t c li t kê i v i m t m u khu ch i:

10X dung d ch m cho khu ch i, 10  $\mu$ l

H n h p c a b n dNTPs (1,25 mM m i lo i), 17  $\mu$ l

M i xuôi (100-110 pmol) trong dd.H<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l

M i n g c (100-110 pmol) trong dd.H<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l

cDNA t ng h p = 6  $\mu$ l (0.1-1  $\mu$ g)

Thêm dd.H<sub>2</sub>O cho th tích 100  $\mu$ l

i v i cDNA không ki m soát:

10X dung d ch m cho khu ch i, 10  $\mu$ l

H n h p c a b n dNTPs (1,25 mM l  $\mu$ m i), 17

M i xuôi (100-110 pmol) trong dd.H<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l

M i n g c (100-110 pmol) trong dd.H<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l

Thêm dd.H<sub>2</sub>O cho th tích 100  $\mu$ l

b. Thêm chính xác 2,5 n v Taq DNA polymerase có tinh s ch cao (5 n v / $\mu$ l) cho m i m u và tr n u

c. Ph m t l p đ u kho ng 30  $\mu$ l ng n ch n s b c h i c a m u.

d. Th c hi n khu ch i PCR 35 n 40 chu k trong chu k PCR l p trình nh sau:

L u ý: Các i u ki n khu ch i ph i chính xác nh nhau cho m i m u - actin cDNA c ng nh không có cDNA.

e. 10 chu k sau khi b t u, c n th n thêm d u và lo i b 15  $\mu$ l h n h p ph n ng c a m i m u và t ki m soát m i 5 chu k cho n khi k t thúc. t tube nhi t 4°C cho n khi s đ ng.

L u ý: Khi l y m u c n ph i th c hi n trong 2 phút cho t t c các m u. Có sáu l n l y m u cho m i m u trong 40 chu k . D u nên càng ít càng t t, tránh quá nhi u.

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

4. Sử dụng 15µl cDNA từ mẫu và mẫu khi cần thể hiện các quá trình lai dot blot sử dụng các oligonucleotides thích hợp như  $^{32}\text{P}$ - đánh dấu hoặc các chuỗi marker (ví dụ, oligonucleotides) giữa hai mẫu sử dụng như mẫu.

a. Biến tính DNA ở 95°C trong 10-15 phút và làm lạnh ngay lập tức trên đá. Chuyển tiếp hỗn hợp và thêm mẫu thích 20X SSC cho mẫu. Một cách khác là phương pháp biến tính kiềm: thêm 0,2 thể tích của 2M NaOH vào mẫu, nhốt phòng trong vòng 15 phút và thêm mẫu thích của dung dịch trung hòa có chứa 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) và 1,5 M NaCl. nhốt phòng trong vòng 15 phút.

b. Cắt mẫu mẫu nylon hoặc màng lọc nitrocellulose và các bộ lọc phía trên của máy hút chân không. Bộ máy hút chân không mẫu chút có chứa mẫu lọc hút thích hợp giữa các màng lọc vào máy.

*Lưu ý: Nếu chân không quá yếu, sẽ khuếch tán của các mẫu tải thành là mẫu khó khăn. Tuy nhiên, các chân không có thể không quá mạnh, nếu chân không quá mạnh, hãy quay lại là gì mẫu quá trình thử. Sử dụng mẫu lọc chân không thích hợp, mẫu lọc của mẫu giữa mẫu nhìn thấy trên màng.*

c. Nhấn di mẫu (khoảng 2µl/loading mà không có chân không hoặc khoảng 5µl/loading để chân không) vào màng lọc có là prewetted với 10X SSC và không khí khô.

d. Sau khi spotting hoàn thành, khô bộ lọc trong chân không và đặt nó vào mẫu để giữa 3MM với DNA đã biến tính phía trên. Đặt 5 đến 10 phút.

e. Chuyển các màng lọc, có DNA phía trên, từ mẫu mẫu giữa 3MM với dung dịch trung hòa trong khoảng 2 đến 5 phút.

f. Khô màng lọc nhốt phòng trong vòng 20 phút.

g. Gói bộ lọc với SaranWrap và đặt DNA xuống mẫu transilluminator (bức xạ sóng ngắn là 312 nm) trong 4-6 phút cho liên kết UV ngang.

h. Sử dụng các bộ lọc trong lò ở 80°C trong 2 giờ để chân không. Tiến hành quá trình lai.

5. Thể hiện quá trình lai như mô tả trong Chương 7.

**Trao đổi trực tuyến tại: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

6. Các ngân hàng tín hiệu của các dot spots và microarray. Vì các cDNA hiện tại, không có tín hiệu nhìn thấy. Vì cDNA actin, các ngân hàng tín hiệu sử dụng vi khuẩn khuếch đại, nhưng không có sự khác biệt nên nhìn nhận về vị trí của nó trong mô hình phát triển, hoặc các mô hình nghiên cứu và không nghiên cứu. Ngược lại, nếu các biểu hiện của một gen cụ thể là không có thể chứng minh về các phương pháp nghiên cứu tế bào mô-c thể hoặc các hóa chất, mô hình tín hiệu rõ ràng của cDNA khuếch đại có thể nhìn thấy. Các tín hiệu cho mRNA xuất hiện liên tục theo sự khuếch đại (Hình 10.4).

7. Nếu cần thiết xác định kích thước của sản phẩm PCR, các cDNAs có thể phân tích bằng 1,0-1,4% agarose gel điện di và lai Southern blot sử dụng các chuỗi đích tiêu chuẩn là mẫu đơn bội (hình 10.5).

Thuật trình thí nghiệm

First-Strand 5X buffer

250 mM Tris-HCl, pH 8,3 (42°C)

50 mM MgCl<sub>2</sub>

250 mM KCl

2,5 mM Spermidine

50 mM DTT

5 mM mỗi dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Hình 10,4 Lai dot blot sử dụng để hiển thị các sản phẩm PCR semiquantitative.

Hình 10,5 Lai Southern blot lai sử dụng để hiển thị các sản phẩm PCR semiquantitative.

## **HƯỚNG DẪN XỬ LÝ SỐC**

1. Sau điện di, sử dụng phân tách của các loại RNA cụ thể như với EtBr là gần phía dưới trong mỗi số ống lane thay vì một vài dải từ trên xuống dưới các lanes. Điều này là do sự phân rã của các RNA bởi RNase trong RNA cột, RNA lưu trữ hoặc điện di. Chỉ cần rửa RNA cụ thể mà không có loại RNase.

2. Hai băng rRNA không sắc nét, nhưng thay vào đó là khuếch tán. Điều này áp dụng cho điện di là quá trình và gel cụ thể quá lâu. Có một số quy tắc nhất định (băng sắc nét) thì gel nên chú ý điều này áp dụng thích hợp.

**Trao i tr c tuy n t i: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

3. Sau khi chuy n ti p hoàn thành, thu c nhu m RNA v n còn trong gel agarose. RNA chuy n ti p không hi u qu ho c không hoàn toàn. C g ng thi t l p vi c chuy n ti p m t cách c n th n và cho RNA th m trong m t th i gian dài h n.

4. Các màng l c cho th y m t s d u v t c a các b t khí. Rõ ràng, v n này là do b t khí t o ra gi a nh ng mi ng gel và màng. C n th n làm theo h ng d n khi l p ráp các thi t b th m.

5. Không có b t k tín hi u c phát hi n. ây là tình hu ng t i t nh t trong lai northern blot. Nh ng RNA có th không có c hi u qu th m dò ho c các u dò dsDNA có th không c bi n tính tr c khi lai. Khi vi c này x y ra, không có gì ng c nhiên khi th y tín hi u lai là con s 0. Hãy nh r ng các u dò ssDNA và nh ng RNA bi n tính là r t quan tr ng cho quá trình lai.

6. Tín hi u lai c ghi nh n khá y u vào các phim ho c các b l c. Các ho t ng c a nh ng u dò DNA có th th p ho c hi u qu lai là không cao. kh c ph c i u này, nên ti n hành quá trình lai trong m t th i gian dài h n ho c t ng th i gian ph i sáng lên phim x-quang ho c r a phim trên b l c lâu h n.

7. Phát hi n các tín hi u không là các b ng s c nét, úng h n, là nh ng v t bôi dài xu t hi n trong t ng lane. V n này r t có th là do liên k t không c hi u. C g ng th c hi n lai và r a trong i u ki n nghiêm ng t cao.

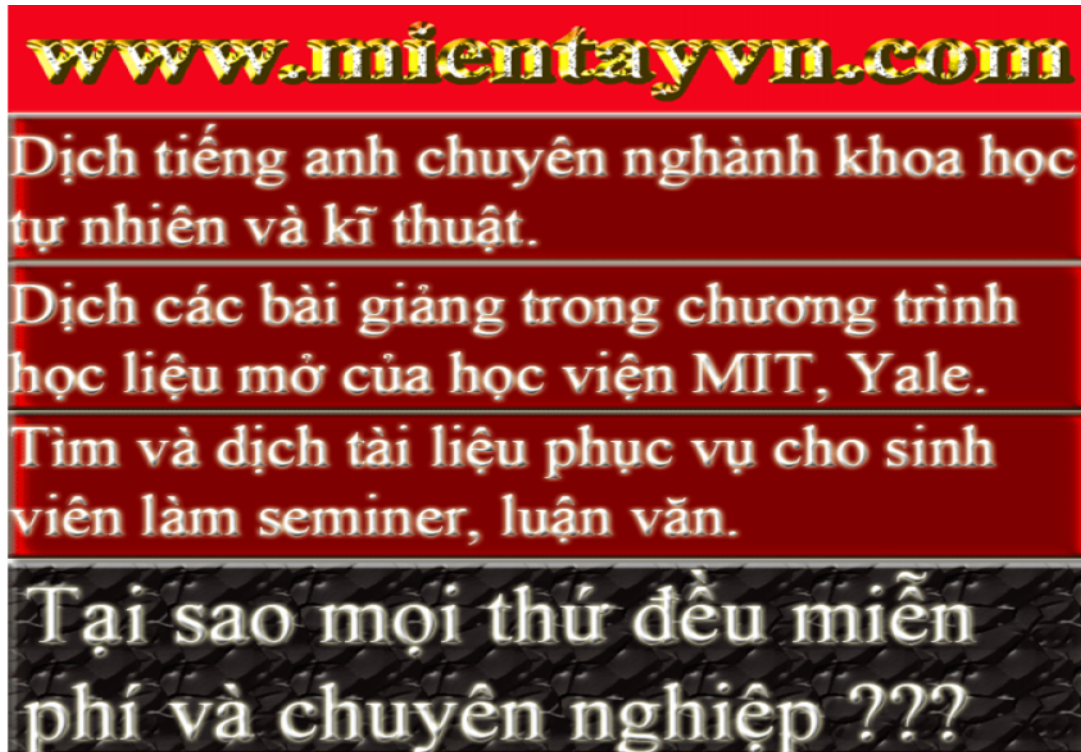
8. N n en xu t hi n trên phim x-quang nh bi u hi n c a s phát hi n các chemiluminescent. Thông th ng nhi u nhân t có th liên quan n v n này. Màng l c có th ã khô trong quá trình lai t o ho c trong quá trình r a. Các tín hi u không c n thi t có th ã không b lo i b tr c khi ti p xúc. Th i gian ph i sáng có th là quá dài. Các gi i pháp cho v n này là m b o cho các b l c c gi m t và s d ng thu c th phát hi n các tín hi u d th a, chúng ph i c lo i b hoàn toàn b ng cách lau. Th gi m th i gian ti p xúc v i phim x-ray.

9. M t n n màu xanh tím xu t hi n trên các b l c nh c th hi n b i phát hi n màu. L ng thu c th có th quá nhi u ho c màu lan ra quá dài. Hãy th s d ng m t s l ng thích h p c a thu c th phát hi n và chú ý t i s di chuy n c a màu s c. Ngay khi b ng l n tr nên h u hình, ng ng ngay l p t c b ng cách r a gi y l c b ng n c c t nhi u l n.



**Trao i tr c tuy n t i: [http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**

10. Nh ng b ng b t ng xu t hi n trên phim x-quang ho c màng l c. V n này r t có th là do liên k t gi a u dò và các loài DNA không c hi u. gi i quy t ho c ng n ch n các v n nh v y, ta có th t ng th i gian ch n màng và nâng cao các i u ki n nghiêm ng t trong quá trình lai và quá trình r a m u.



**www.mientayvn.com**

Dịch tiếng anh chuyên ngành khoa học tự nhiên và kĩ thuật.

Dịch các bài giảng trong chương trình học liệu mở của học viện MIT, Yale.

Tìm và dịch tài liệu phục vụ cho sinh viên làm seminar, luận văn.

Tại sao mọi thứ đều miễn phí và chuyên nghiệp ???

**Trao i tr c tuy n t i:**  
**[http://www.mientayvn.com/chat\\_box\\_sinh.html](http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html)**