

# Tách chiết nucleic acid

Nguyễn Hoàng Thiên Phúc  
Email [nhtphuc@hcmus.edu.vn](mailto:nhtphuc@hcmus.edu.vn)

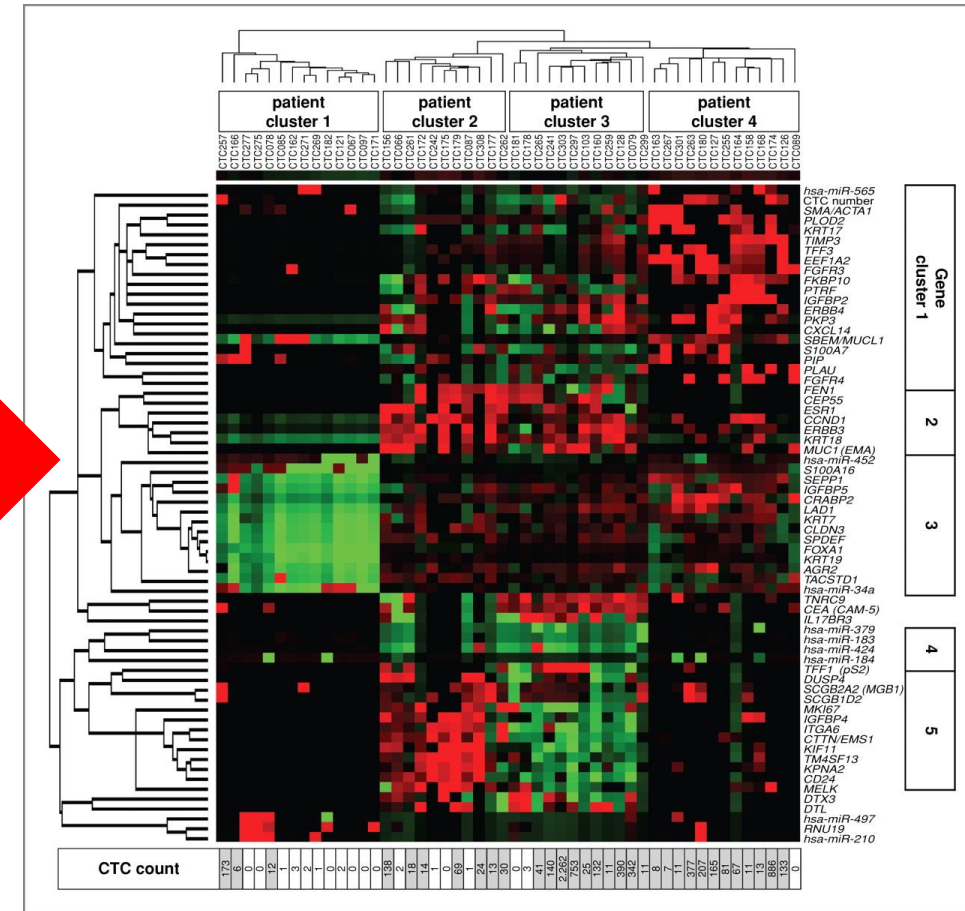
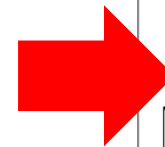
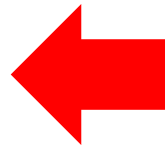
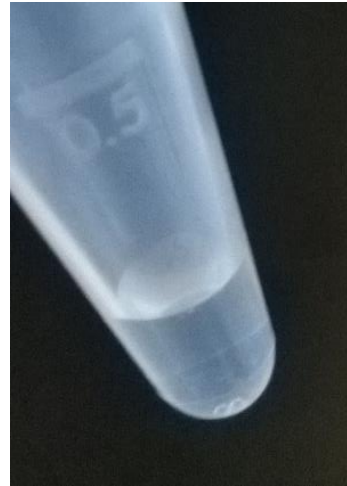
## Mục tiêu

- ☐ Hiểu được nguyên lý, ý nghĩa của quy trình tách chiết nucleic acid
- ☐ Nguyên vật liệu, thiết bị cần cho quy trình tách chiết
- ☐ Quy trình thực hiện tách chiết nucleic acid
- ☐ Đánh giá kết quả tách chiết nucleic acid
- ☐ Thực hiện được thao tác tách chiết nucleic acid

# Tại sao cần tách chiết nucleic acid ??



Thiết lập phản ứng PCR



Khảo sát sự biểu hiện gene

Phát hiện dấu vết của thực phẩm GMO  
sự hiện diện của các vi sinh vật trong thực phẩm

Vật liệu đầu vào (loại tế bào gì, đặc điểm mẫu tách chiết, điều kiện bảo quản)



Đầu ra

**phương pháp  
tách chiết  
nucleic acid?**

- ☐ Đối tượng DNA/ RNA? (bộ gen, plasmid, ...)
- ☐ Độ nguyên vẹn
- ☐ Độ sạch của mẫu
- ☐ Hàm lượng, nồng độ
- ☐ Sử dụng cho mục tiêu gì?
- ☐ Máy móc, hóa chất sẵn có

**1. Lý thuyết** – Nguyên lý tách chiết nucleic acid

**2. Thực hành** – Các lưu ý trong quy trình tách chiết nucleic acid

## 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

Vật liệu tách chiết ban đầu

Tế bào má – DNA bộ gene

Vi khuẩn *E. coli* – RNA tổng số

**Bằng cách nào?**

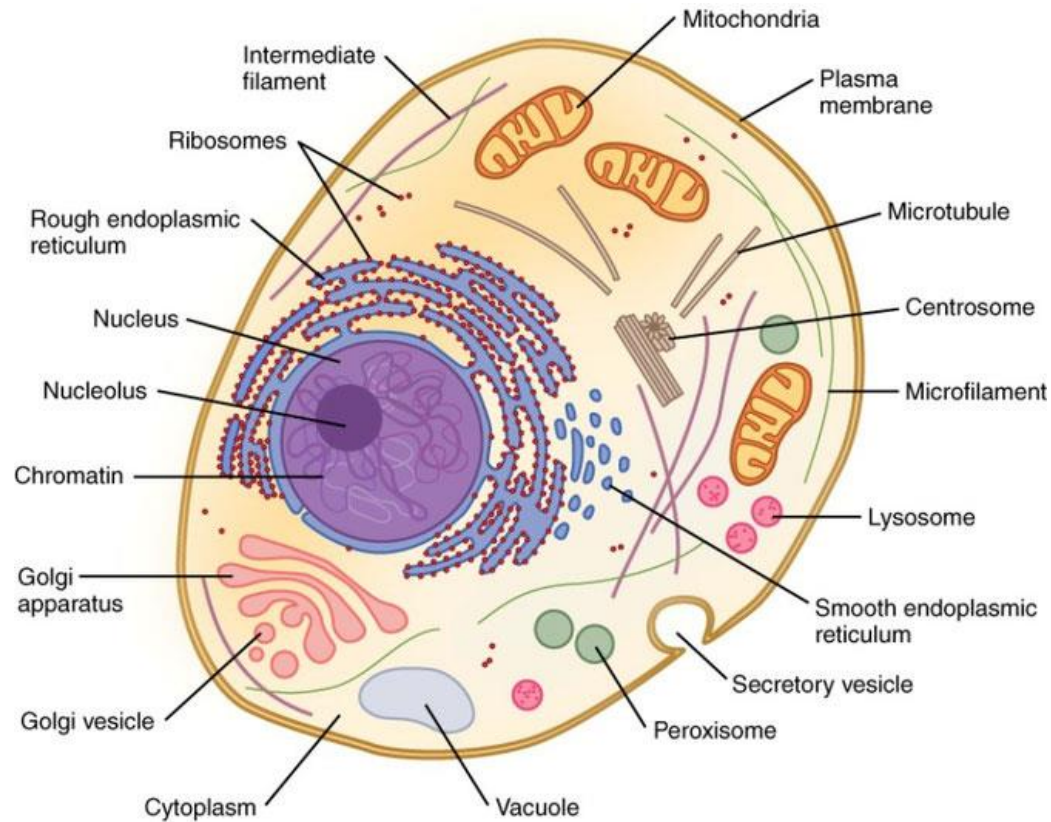


DNA bộ gene

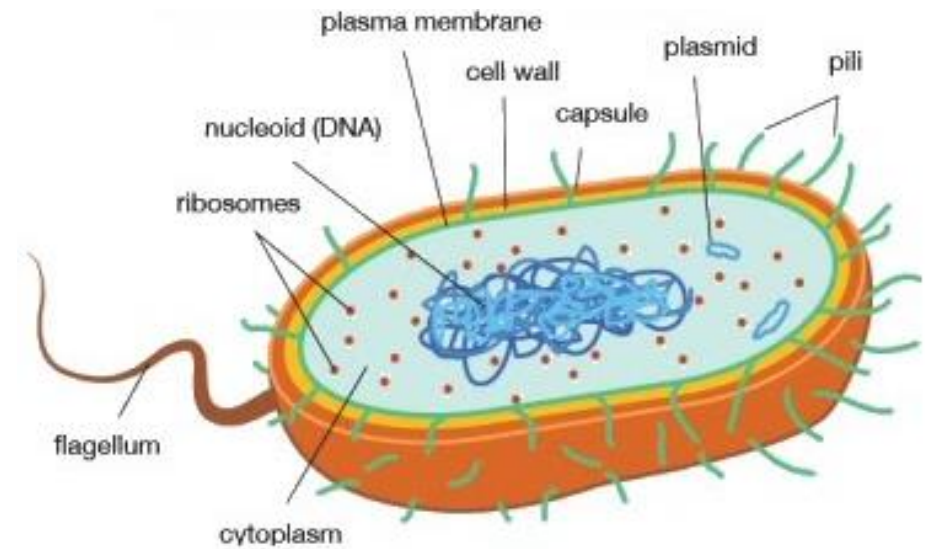
RNA tổng số

# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

Tách chiết nucleic acid – sử dụng các phương pháp nhằm có thể tách nucleic acid ra khỏi các thành phần khác của tế bào



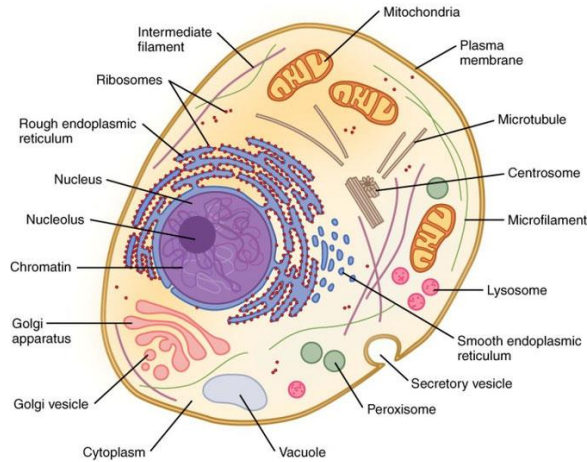
**Tế bào nhân thực**



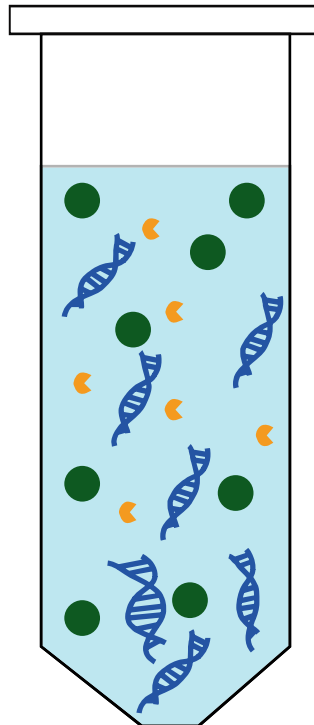
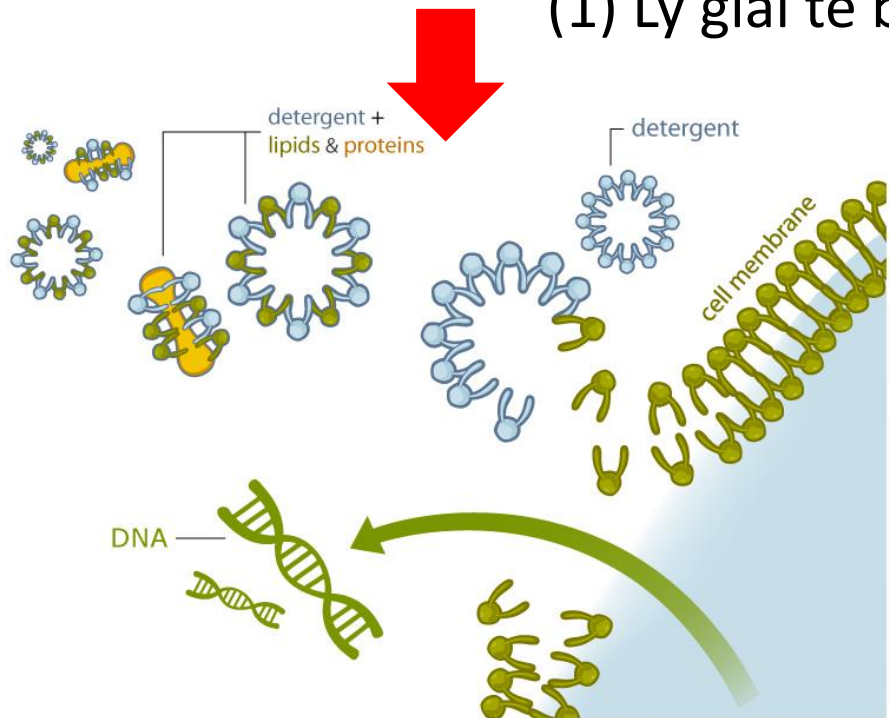
**Tế bào vi khuẩn**

**Làm thế nào?**

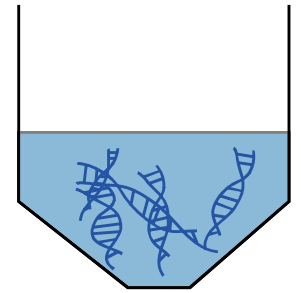
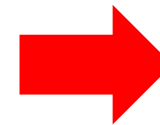
# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid



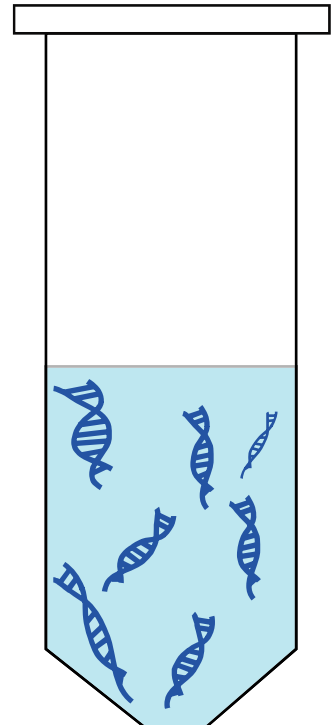
(1) Ly giải tế bào → Giải phóng nucleic acid



(2) Loại bỏ protein và các thành phần khác



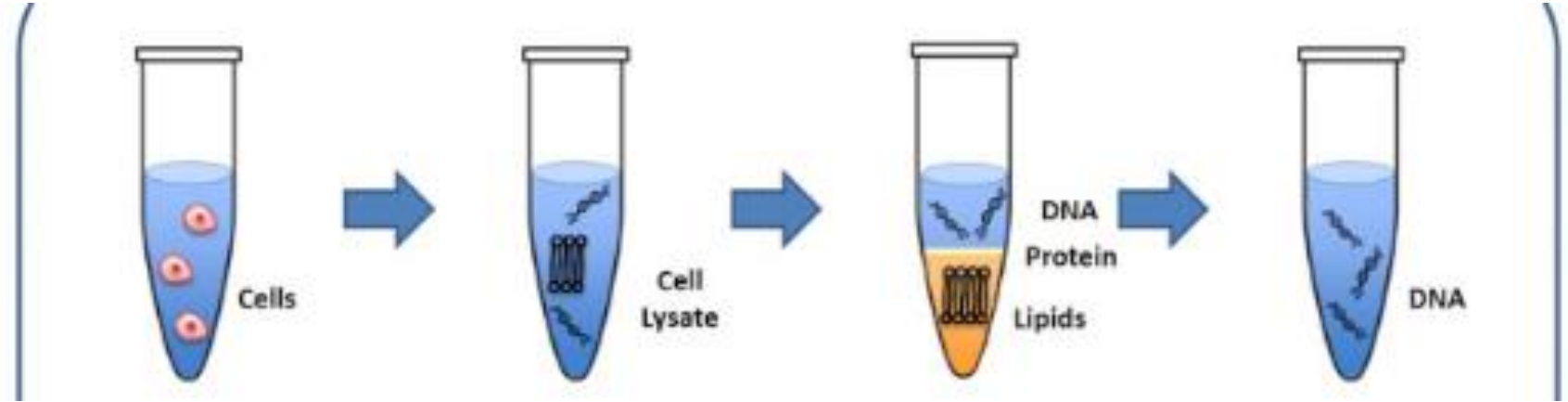
(3) Thu nhận nucleic acid



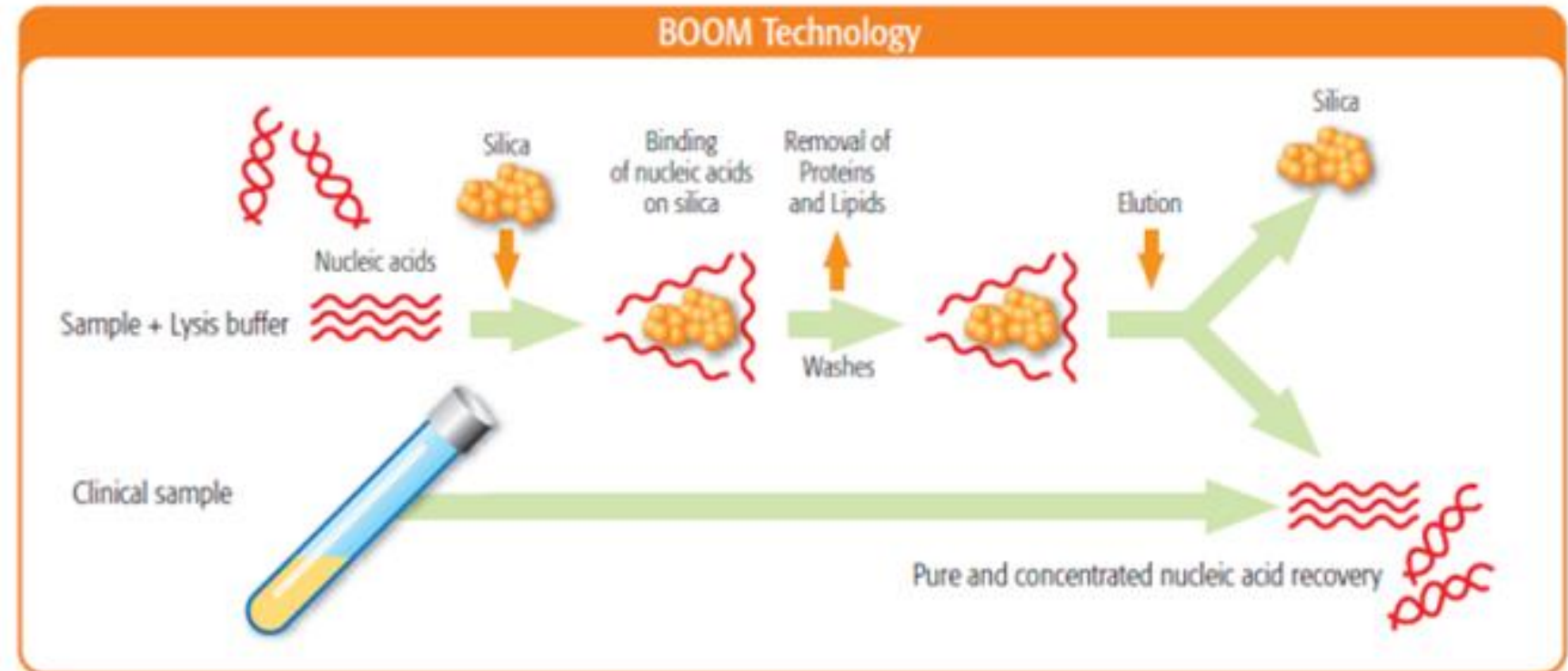


# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

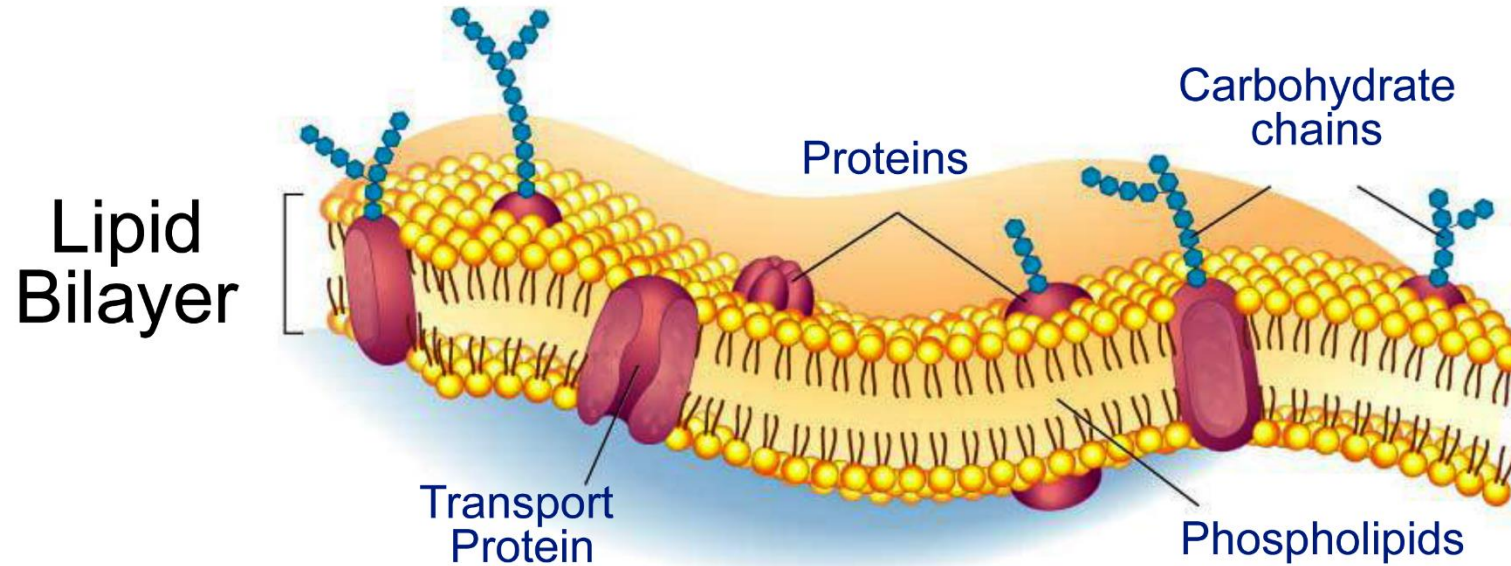
Phương pháp phenol - chloroform



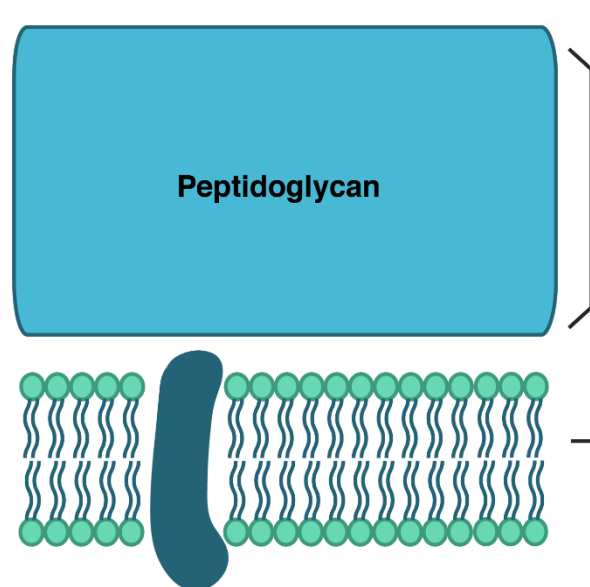
Phương pháp boom



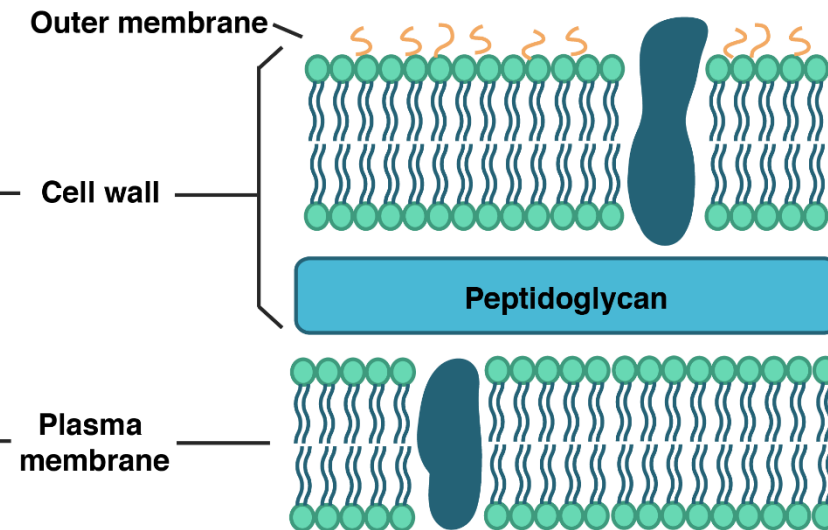
# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid



**Gram-positive bacteria**



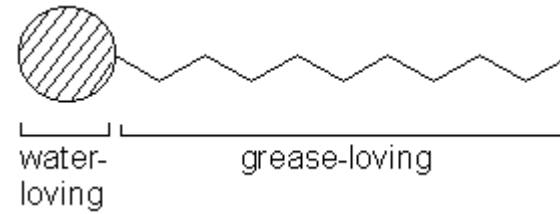
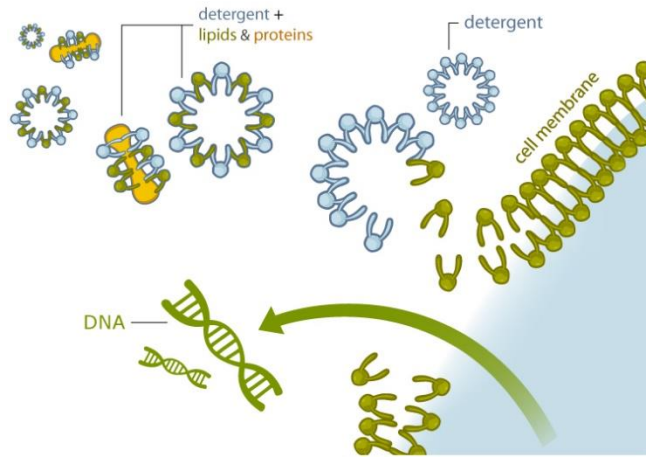
**Gram-negative bacteria**



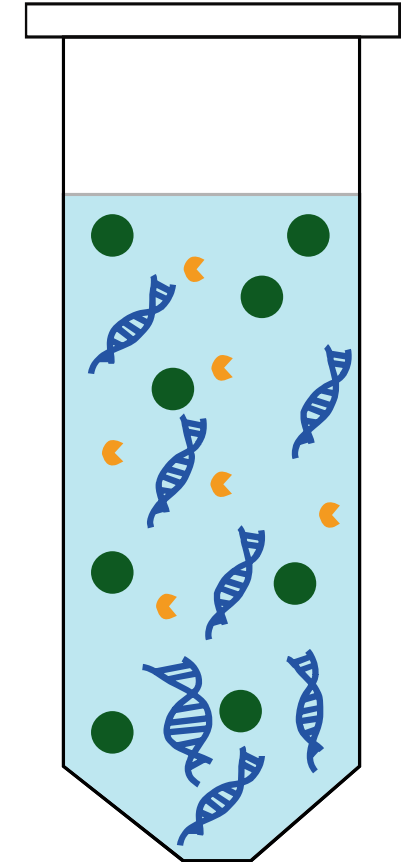
# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

## Lý giải tế bào

- Tác nhân hóa học – chất tẩy (detergent)

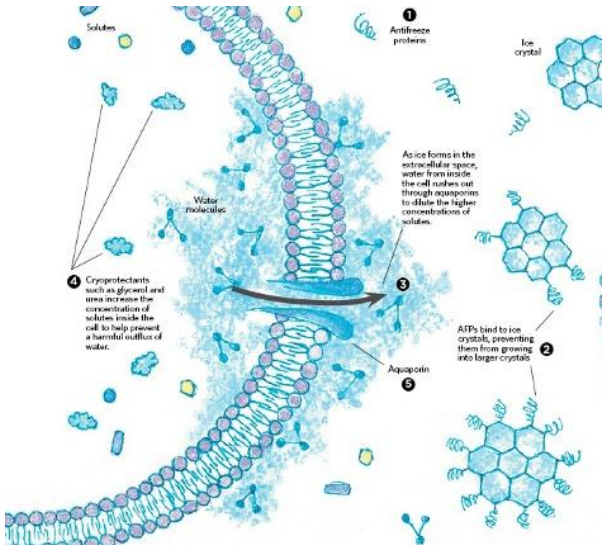


**Triton X100, SDS**



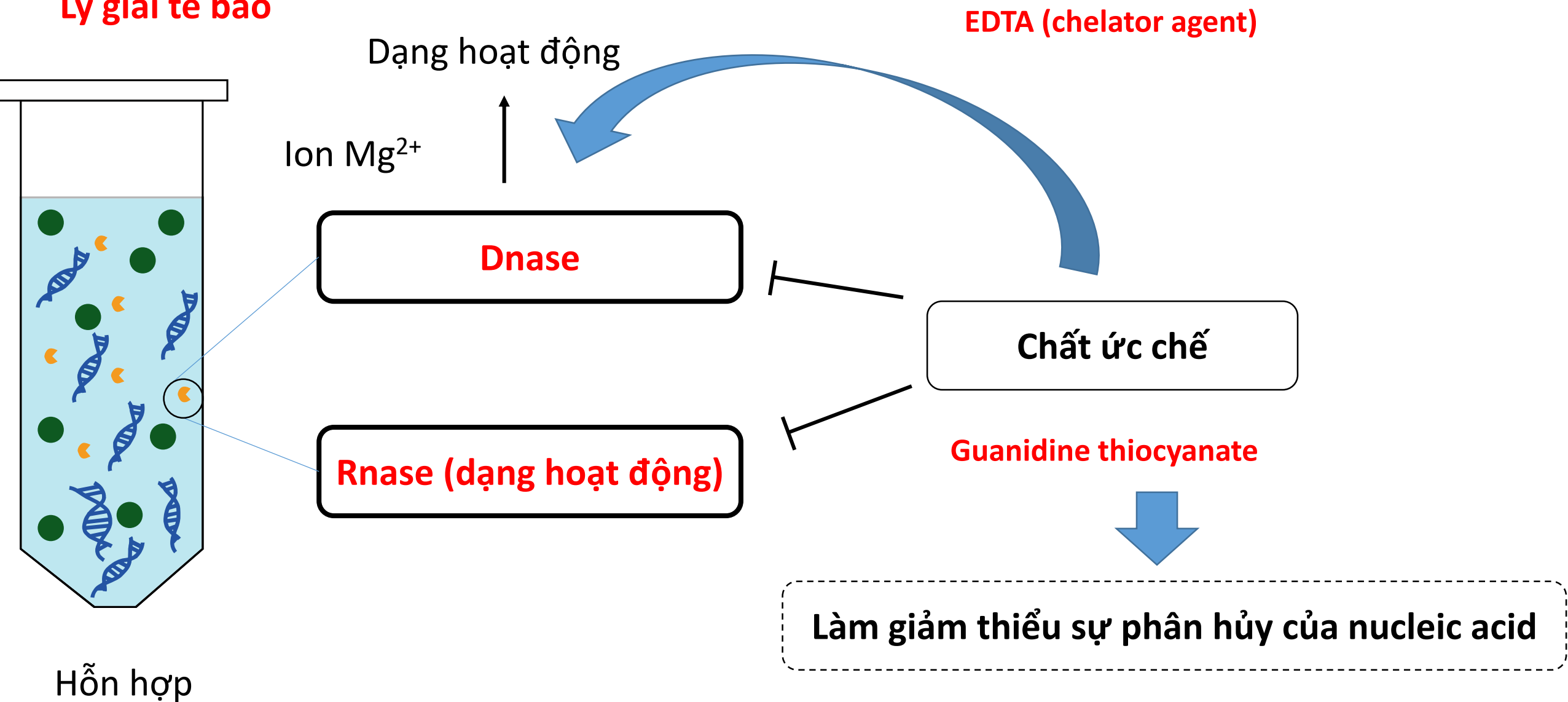
Hỗn hợp chứa nucleic acid và các thành phần khác của tế bào

- Tác nhân vật lý – sóng siêu âm (ultrasound), đông/ rã đông (freeze/ thaw cycle)



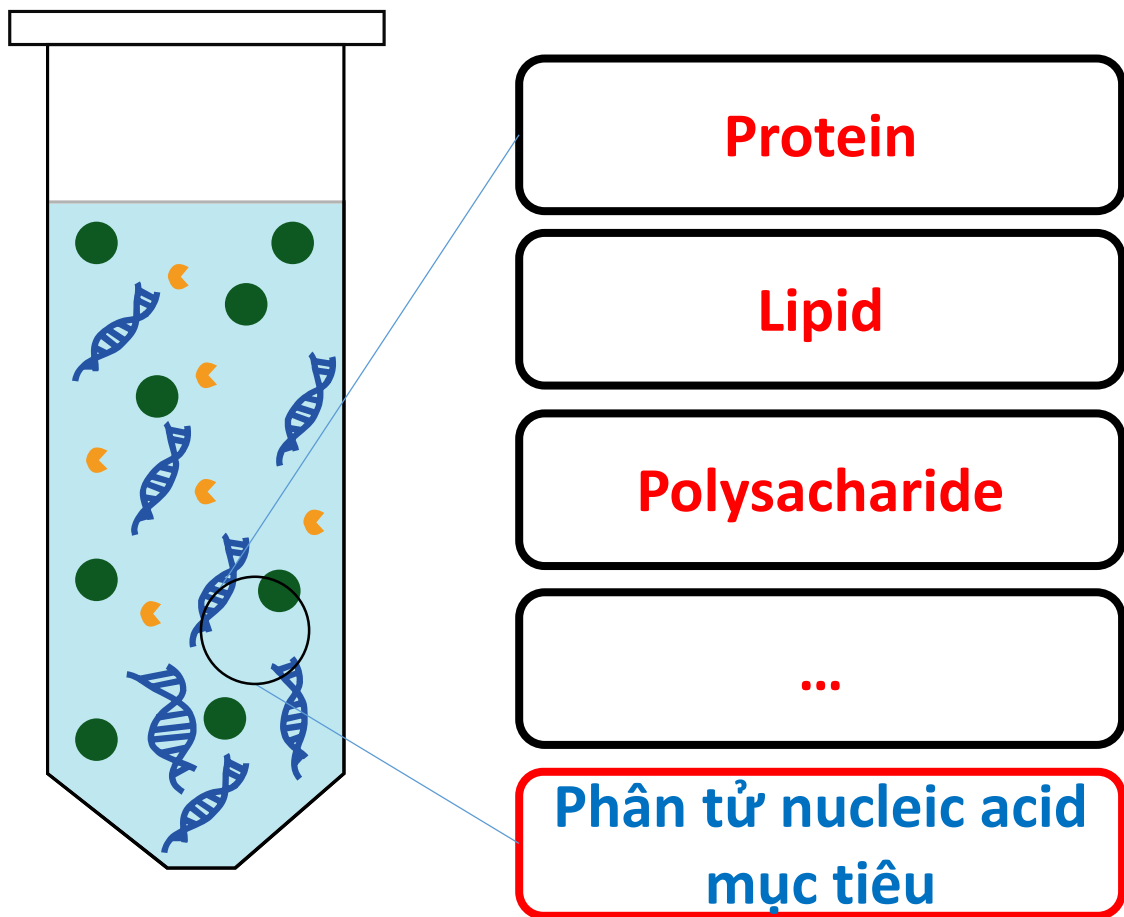
# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

## Ly giải tế bào



# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

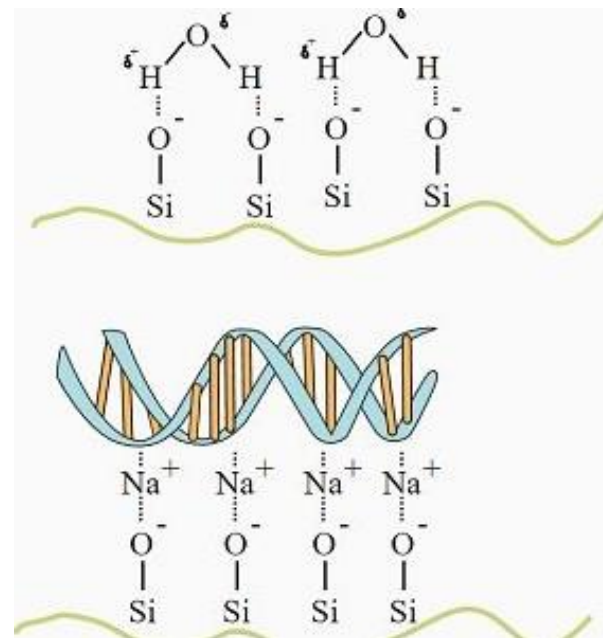
## Loại bỏ protein và các thành phần khác



Hỗn hợp

**Cách 1. Loại bỏ thành phần không cần thiết , giữ nucleic acid lại trong dung dịch**

**Cách 2. Bắt giữ** nucleic acid mục tiêu hay thành phần không mong muốn ra khỏi dung dịch

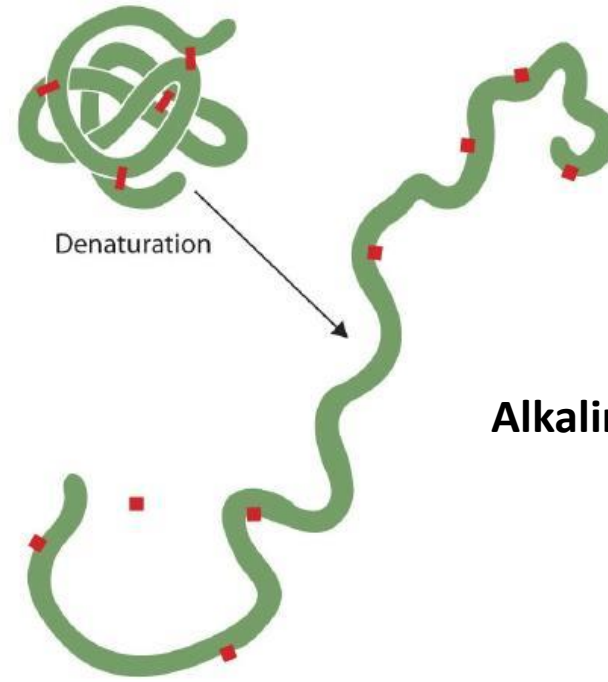
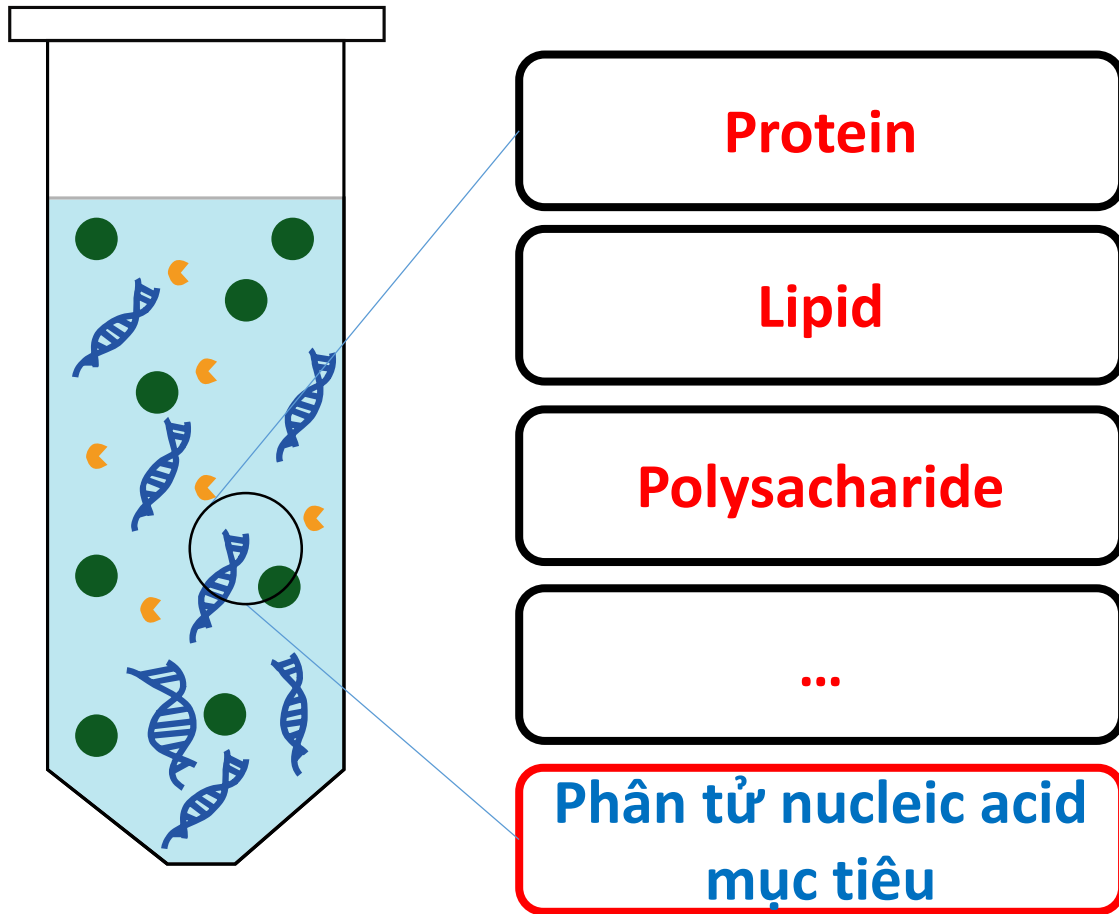




# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

## Loại bỏ protein và các thành phần khác

### Cách 1



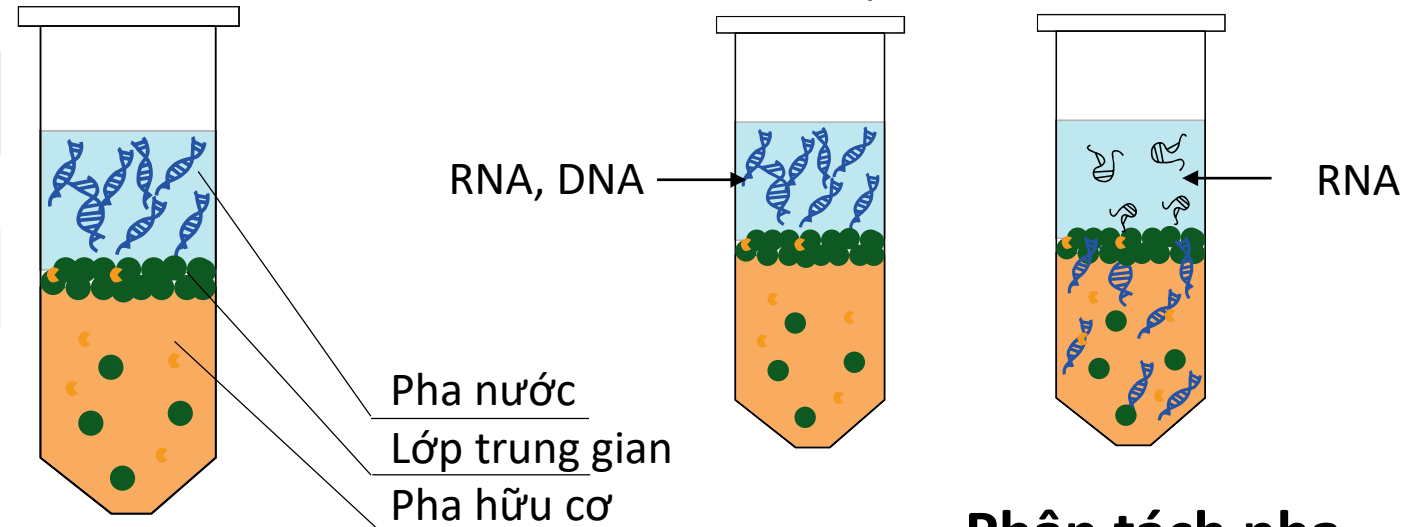
### Chất biến tính protein:

- Phenol: Chloroform
- Chloroform
- Guanidine thiocyanate
- Guanidine hydrochloride

Alkaline, acid, chất oxi hóa hoặc chất khử



**Loại bỏ bằng ly tâm**

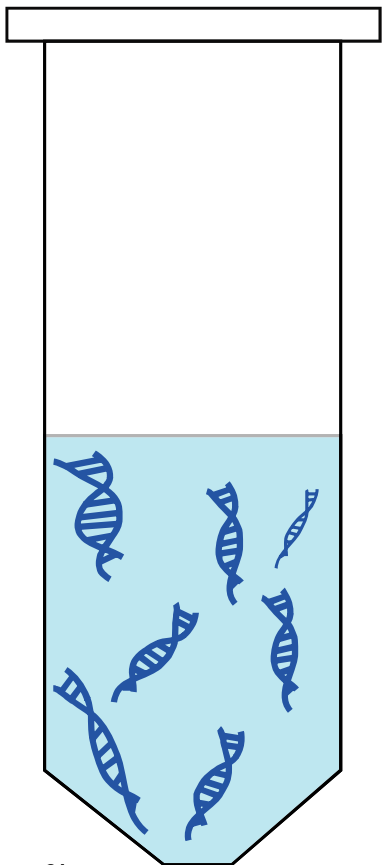


**Phân tách pha**

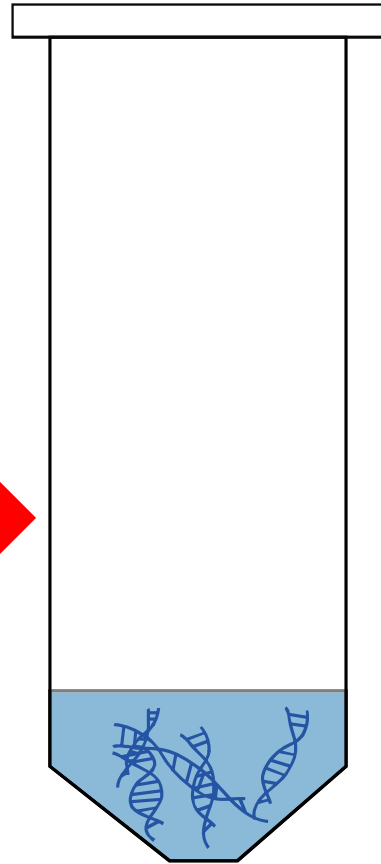
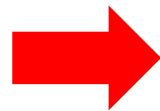
# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

## Cách 1

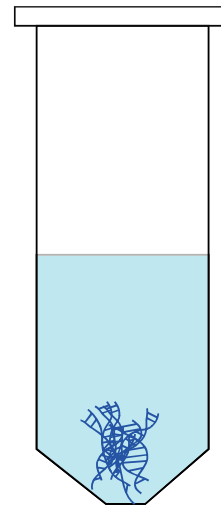
### Thu nhận nucleic acid



Mẫu nucleic acid



**Tinh sạch** nucleic acid  
**Cô đặc** nucleic acid  
**Thu nhận** nucleic acid



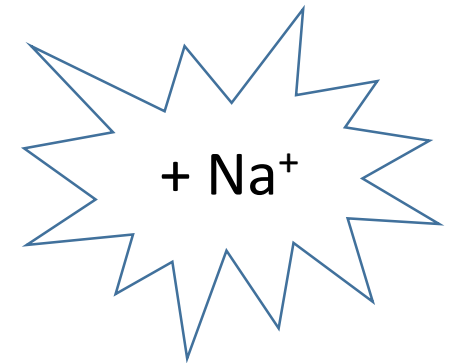
**Tủa**



**Hòa tan tủa**

Ethanol tuyệt đối (lạnh): mẫu (2:1)

Isopropanol : mẫu (1:1)

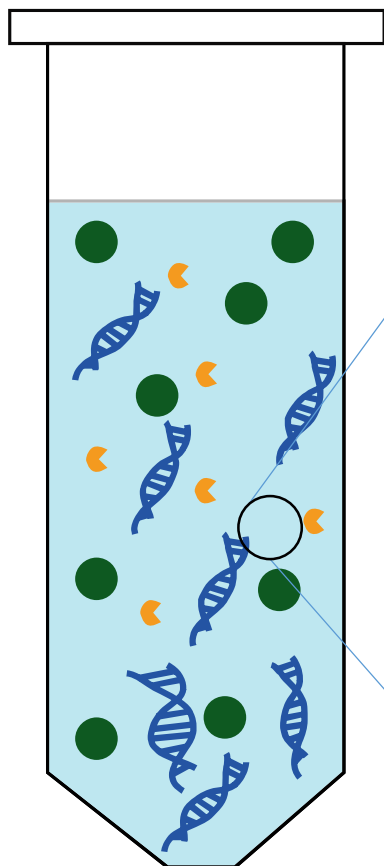


TE (Tris-HCl, **EDTA**) ức chế hoạt động Dnase

# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

## Loại bỏ protein và các thành phần khác

### Cách 2



Hỗn hợp

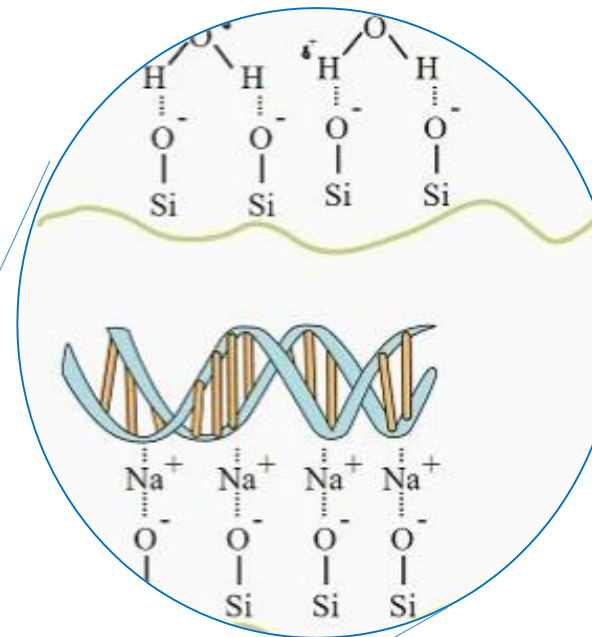
Protein

Lipid

Polysacharide

...

Nucleic acid  
mục tiêu



Tích điện âm

**Bắt giữ nucleic acid:**

-Silica

-Hạt từ

...

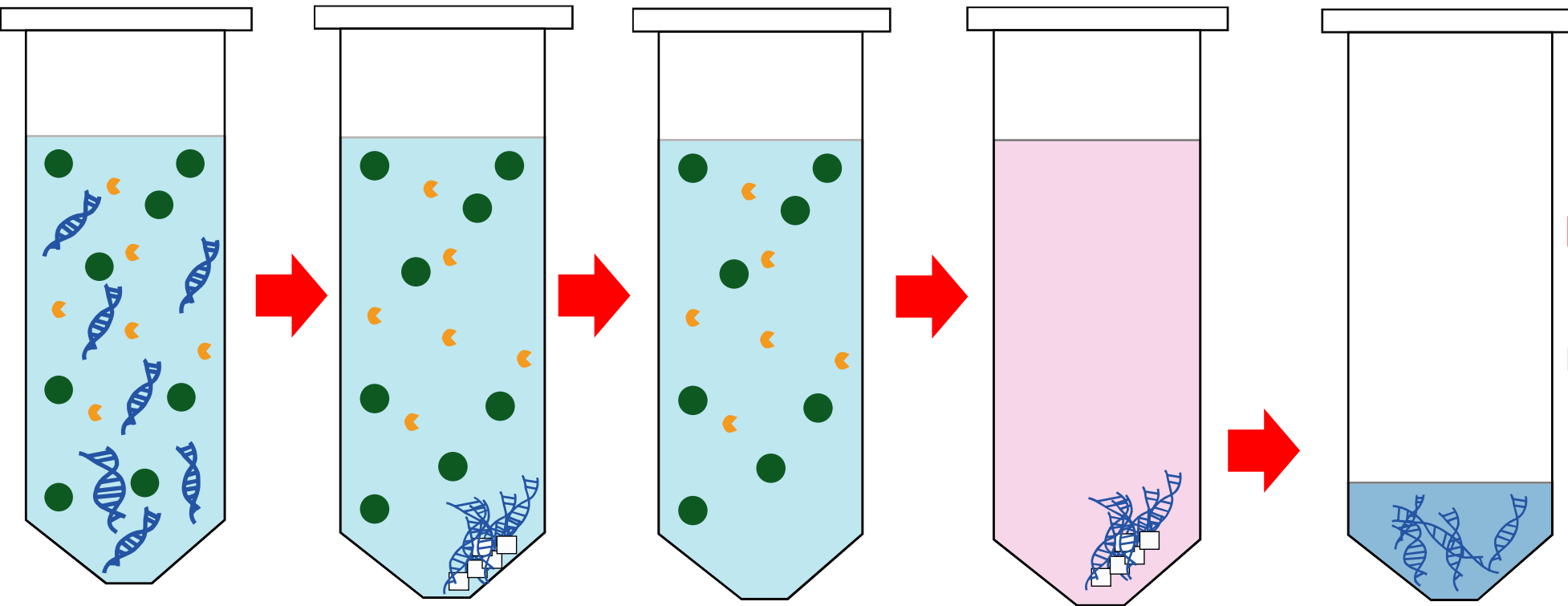
+ Na<sup>+</sup>



# 1. Nguyên lí tách chiết nucleic acid

## Loại bỏ protein và các thành phần khác

### Cách 2



Bắt giữ và tinh sạch nucleic acid

Dung giải nucleic acid trong nước xử lí  
DEPC

**DEPC biến tính Rnase**  
DEPC bị phân hủy ở  
nhiệt độ cao

### **Trong nội dung thực tập**

- **Tách chiết DNA và RNA thì dùng quy trình tách chiết tương ứng nào?**
- **Dự đoán sản phẩm thu nhận sau tách chiết?**

## 2. Thực hành – Các lưu ý trong quy trình tách chiết nucleic acid

Đặc điểm hóa chất sử dụng  
trong tách chiết nucleic acid

Lý thuyết – Vai trò của từng thành phần trong quy trình tách chiết

**Thực hành** – Giảm thiểu các sai sót trong quá trình thực hành

*Ví dụ*

- Dd ly giải (SDS,...) → chất tẩy → thao tác pipette không chính xác → tạo bọt



👉 **Lưu ý:**

- Before performing the isolation protocol, **carefully** read the **note** in protocol
- **Follow** the **compliance** when **pipetting**

2. Thực hành – Các lưu ý trong quy trình tách chiết nucleic acid

Hóa chất tách chiết	Thành phần	Vai trò	Đặc điểm	Lưu ý khi thao tác
Hóa chất tách chiết DNA				
Dung dịch ly giải				
Phenol:Chloroform				
Chloroform				
Ethanol tuyệt đối				
Ethanol 70%				
TE 1X				
Hóa chất tách chiết RNA				
Silica				
Dung dịch L6				
Dung dịch L2				
Ethanol 70%				
Aceton				
Nước xử lí DEPC				

## 2. Thực hành – Các lưu ý trong quy trình tách chiết nucleic acid

### Thao tác trong quy trình tách chiết

- **Điều kiện tách chiết nucleic acid?**
- Thao tác với các hóa chất dung dịch
- Thao tác khi hút các thể tích dịch nổi
- Đảm bảo dung dịch đồng nhất khi thao tác

## 2. Thực hành – Các lưu ý trong quy trình tách chiết nucleic acid

# Bài tập -Tiến hành sơ đồ hóa quy trình tách chiết nucleic acid sẽ thực hiện? (1 trang A4)

### Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick  
PROTOCOL

#### Isolation of Genomic DNA from Whole Blood

Sample Size	Lysis Solution		Protein Precipitation Solution	Isopropanol	DNA Rehydration Solution
	Cell	Nuclei			
300µl	900µl	300µl	100µl	300µl	100µl
1ml	3ml	1ml	330µl	1ml	150µl
3ml	9ml	3ml	1ml	3ml	250µl
10ml	30ml	10ml	3.3ml	10ml	800µl

As little as 20µl can be processed with this system. Please see Technical Manual #TM050, Section 3.C.

#### Red Blood Cell Lysis

- Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood. Mix by inversion.
- Incubate for 10 minutes at room temperature.
- Centrifuge:  
≤300µl sample 13,000–16,000 × g\*; 20 seconds  
1–10ml sample 2,000 × g; 10 minutes
- Discard supernatant. Vortex pellet.

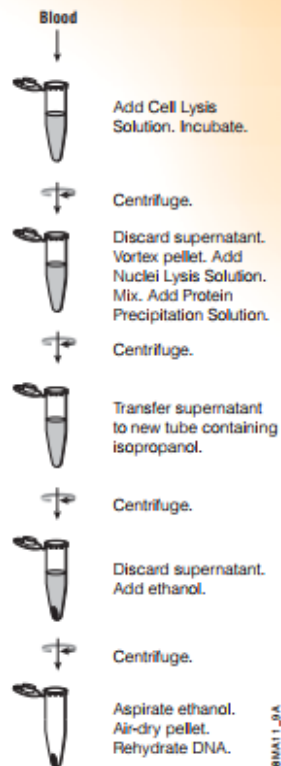
#### Nuclei Lysis and Protein Precipitation

- Using volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion.
- Add Protein Precipitation Solution; vortex for 20 seconds.
- Centrifuge:  
≤300µl sample 13,000–16,000 × g\*; 3 minutes  
1–10ml sample 2,000 × g; 10 minutes

#### DNA Precipitation and Rehydration

- Transfer supernatant to a new tube containing isopropanol (using volumes from table above). Mix.
- Centrifuge:  
≤300µl sample 13,000–16,000 × g\*; 1 minute  
1–10ml sample 2,000 × g; 1 minute
- Discard supernatant. Add 70% ethanol (same volume as isopropanol).
- Centrifuge as in Step 9.
- Aspirate the ethanol and air-dry the pellet (10–15 minutes).
- Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

\*Maximum speed on a microcentrifuge.



2818MAT1\_JA  
2/18/04

### Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick  
PROTOCOL

#### Isolation of Genomic DNA from Animal Tissue and Tissue Culture Cells

##### Prepare Tissues

**Tissue Culture Cells:** Centrifuge at 13,000–16,000 × g\* for 10 seconds. Wash the cell pellet with PBS, vortex and then add 600µl of Nuclei Lysis Solution and mix by pipetting.

**Animal Tissue:** Add 10–20mg of fresh or thawed tissue to 600µl of chilled Nuclei Lysis Solution and homogenize for 10 seconds. Alternatively, use 10–20mg of ground tissue. Incubate at 65°C for 15–30 minutes.

**Mouse Tail:** Add 600µl of chilled EDTA/Nuclei Lysis Solution to 0.5–1cm of fresh or thawed mouse tail. Add 17.5µl of 20mg/ml Proteinase K and incubate overnight at 55°C with gentle shaking.

##### Lysis and Protein Precipitation

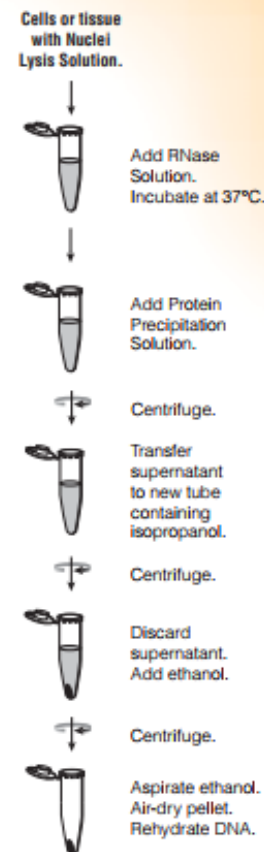
- Add 3µl of RNase Solution to the cell or animal tissue nuclei lysate and mix. Incubate for 15–30 minutes at 37°C. Cool to room temperature.
- Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex and chill on ice for 5 minutes.
- Centrifuge at 13,000–16,000 × g\* for 4 minutes.

##### DNA Precipitation and Rehydration

- Transfer supernatant to a fresh tube containing 600µl of room temperature isopropanol.
- Mix gently by inversion.
- Centrifuge at 13,000–16,000 × g\* for 1 minute.
- Remove supernatant and add 600µl of room temperature 70% ethanol. Mix.
- Centrifuge as in Step 6.
- Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 15 minutes.
- Rehydrate the DNA in 100µl of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

\*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: [www.promega.com](http://www.promega.com)



2823MAT1\_JA  
2/18/04

## **Thực hiện quy trình tách chiết nucleic acid**

**DNA bộ gene 50ul**

**RNA tổng số 80ul**

# Đánh giá

## Lý thuyết

Hiểu được vai trò của từng hóa chất sử dụng trong quy trình  
Sản phẩm thu nhận được khi thực hiện quy trình tách chiết

## Thực hành

Tách chiết được DNA bộ gen và RNA tổng số  
Thao tác đúng nguyên tắc