

MỘT SỐ KỸ THUẬT ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG NUCLEIC ACID

ĐIỆN DI VÀ ĐO MẬT ĐỘ QUANG

Nguyễn Thị Mỹ Nường
ntmnuong@hcmus.edu.vn

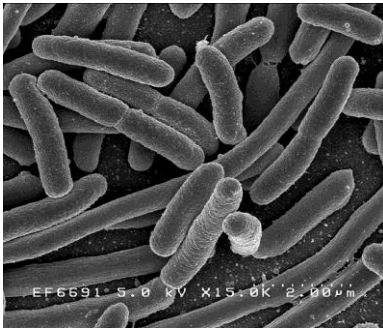
Tách chiết DNA từ tế bào má



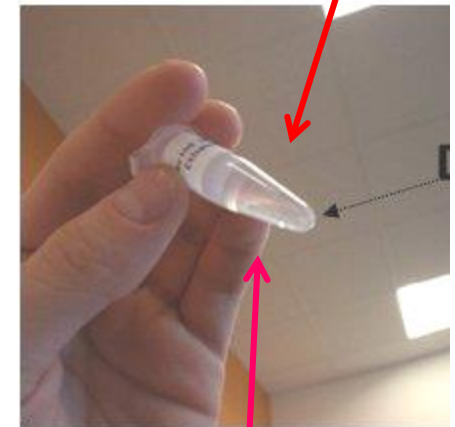
Phá màng

Loại Protein

Thu
DNA/RNA



Tách chiết RNA từ *E.coli*



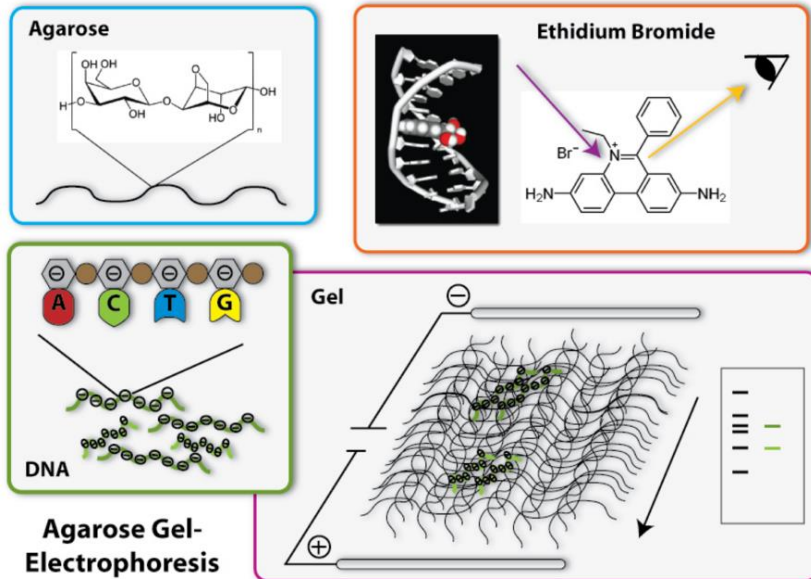
DNA ???

RNA ???

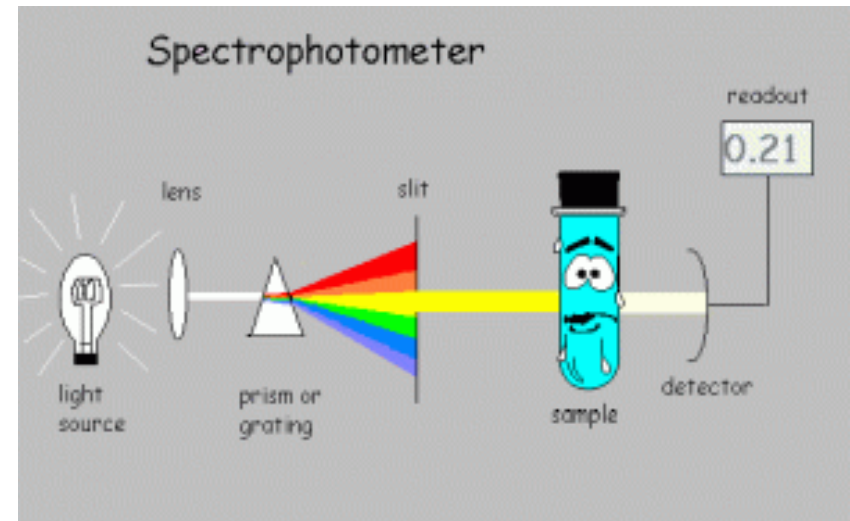


- ✓ Có tách chiết được DNA/RNA không?
- ✓ Chất lượng như thế nào?
- ✓ Lượng/nồng độ bao nhiêu?

Phương pháp định tính và định lượng nucleic acid



Điện di (electrophoresis)



**Đo mật độ quang
(spectrophotometry)**

Nội dung

- Nguyên tắc, mục tiêu
- Hóa chất, dụng cụ, thiết bị
- Cách thực hiện
- Phân tích kết quả

Đánh giá

- ✓ Bài tập
- ✓ Thao tác chuẩn bị mẫu, điện di, đo OD
- ✓ Kết quả tính toán các hóa chất sử dụng
- ✓ Kết quả chất lượng mẫu DNA và RNA

Yêu cầu

- Hiểu được nguyên tắc các phương pháp điện di, đo OD
- Hiểu được ý nghĩa các bước thực hiện trong qui trình
- Thực hành lại được qui trình điện di, đo OD
- Nắm rõ cách phân tích chất lượng 1 mẫu nucleic acid dựa trên kết quả điện di, đo OD

Điện di

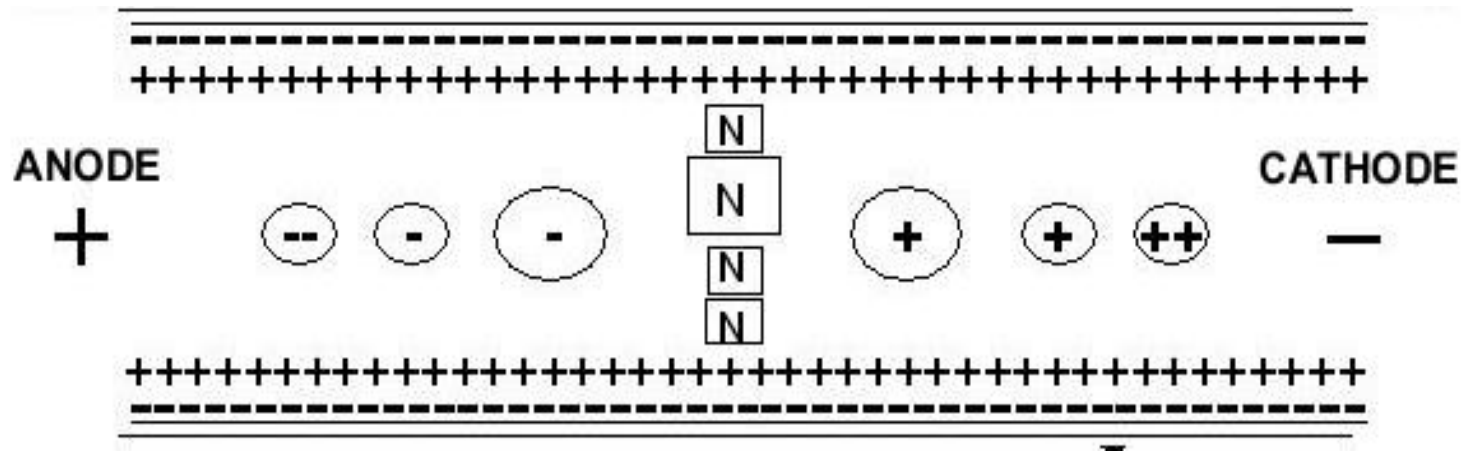
1. Nguyên tắc
2. Nguyên vật liệu, thiết bị
3. Các bước thực hiện
4. Phân tích kết quả

MỤC TIÊU

- ✓ Phân tách các đoạn DNA/RNA
- ✓ Xác định kích thước phân tử DNA/RNA
- ✓ Phân tích chất lượng nucleic acid (sự nguyên vẹn, nhiễm DNA/RNA)

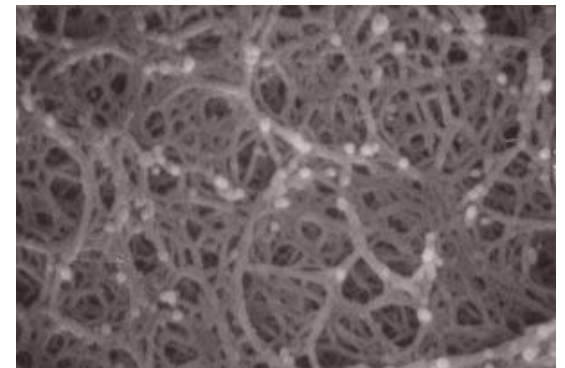
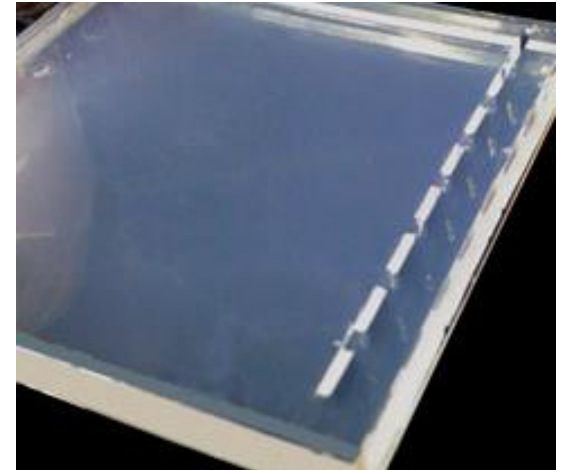
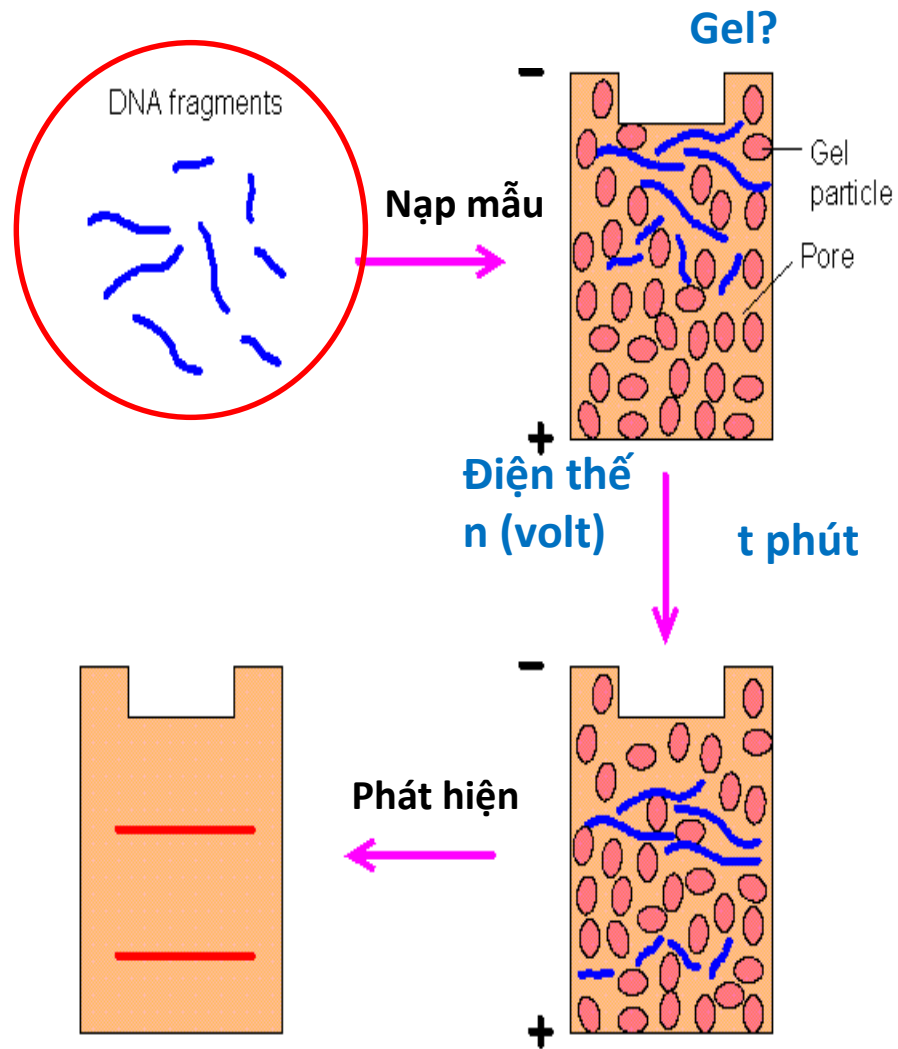
Nguyên tắc

ĐIỆN DI



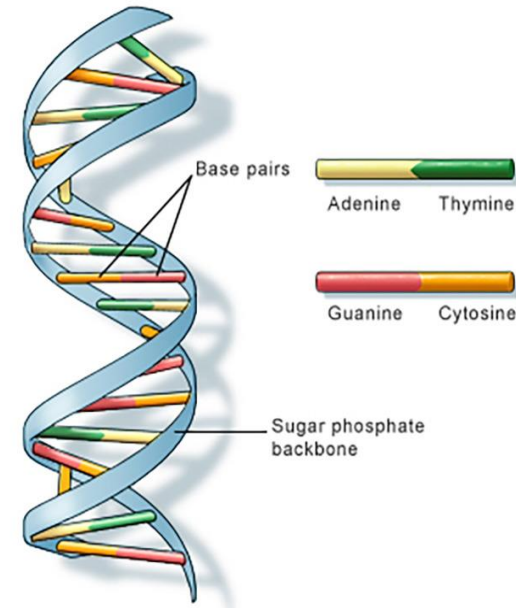
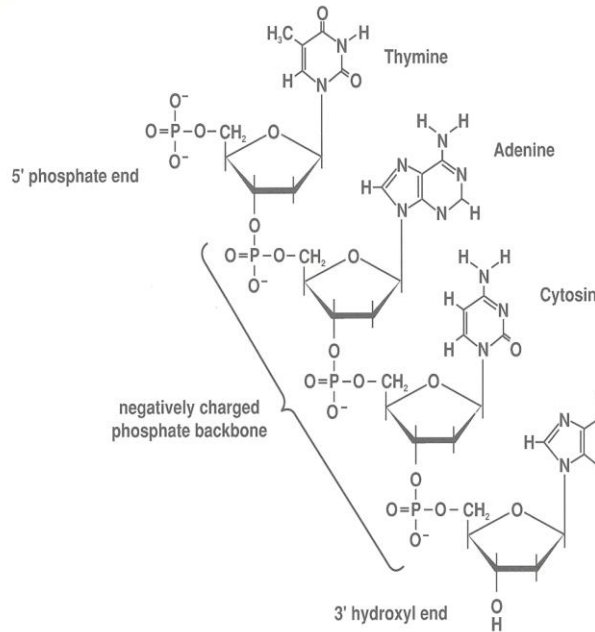
Trong một điện trường các phân tử trong pha di động sẽ di chuyển về điện cực trái dấu với vận tốc phụ thuộc vào **tỉ lệ giữa điện tích và trọng lượng**

Điện di nucleic acid



Điện di nucleic acid: các yếu tố cần quan tâm?

**Điện
tích ?**



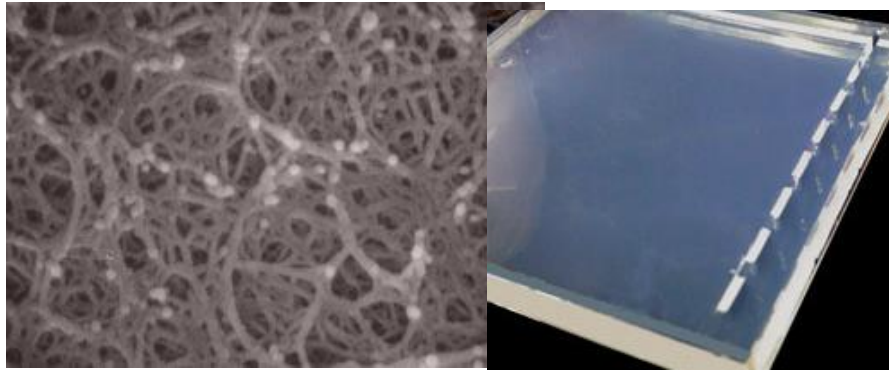
**Trọng
lượng?**

➡ **Kích thước phân tử**

1 kilo base pairs (kbp) = 1000 base pairs (bp)

➡ **Cấu hình phân tử**

Điện di nucleic acid: các yếu tố cần quan tâm?

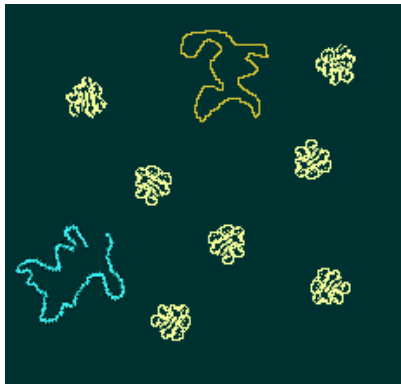


Gel agarose/polyacrylamide



Cấu hình ⇔ Giá thể

Nồng độ gel + chiều dài

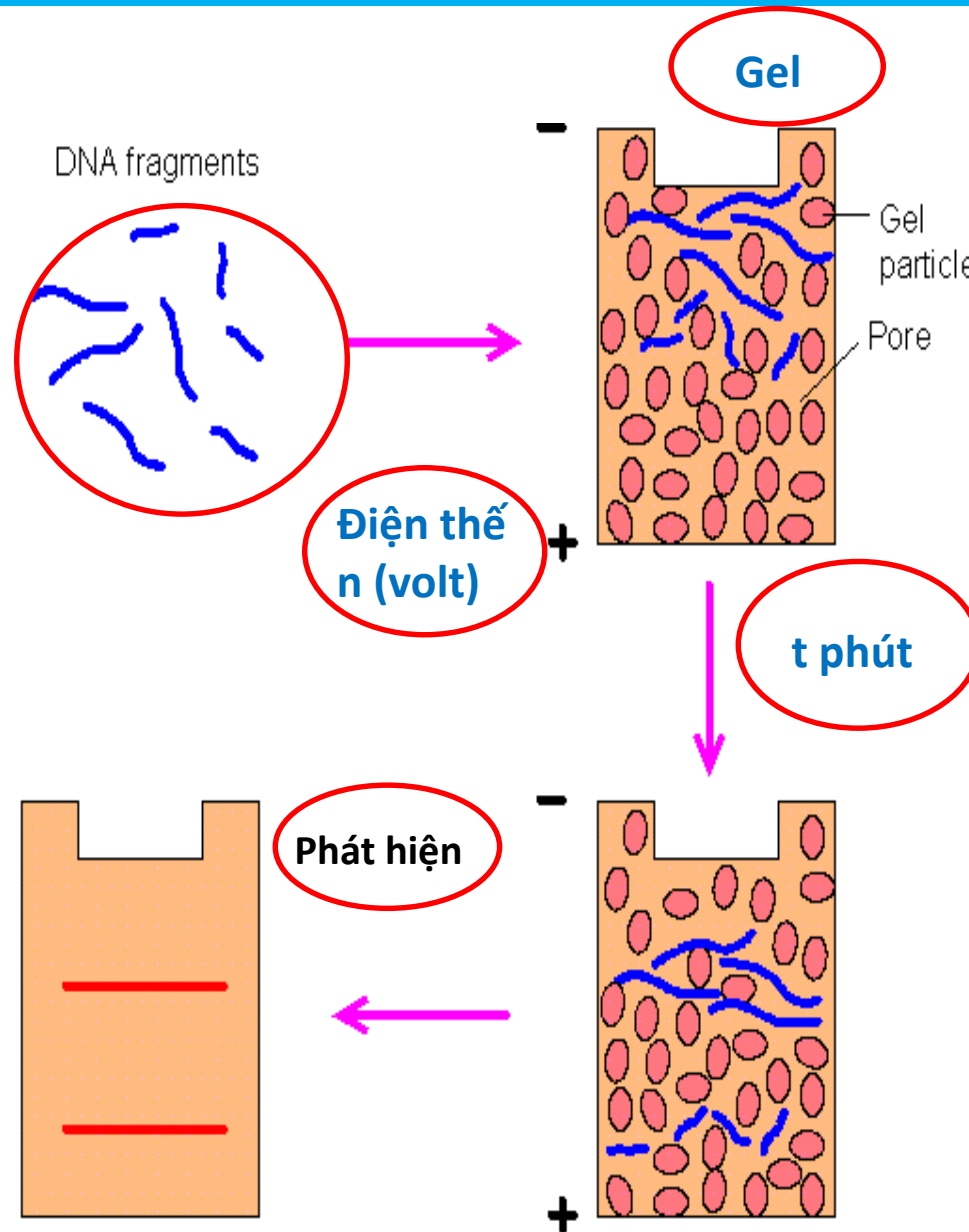


Các cấu hình DNA plasmid

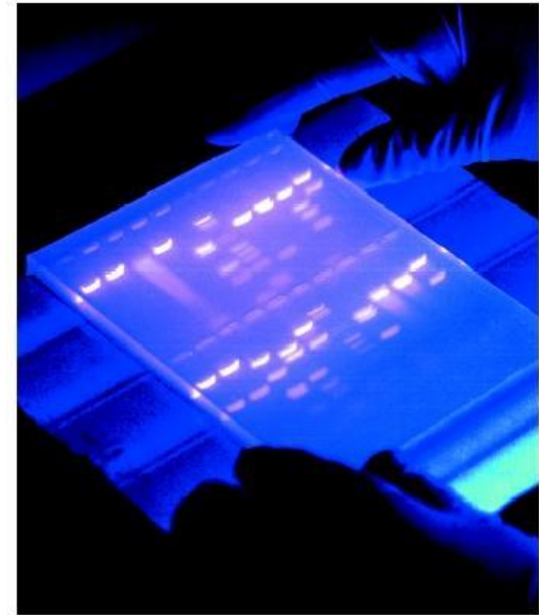
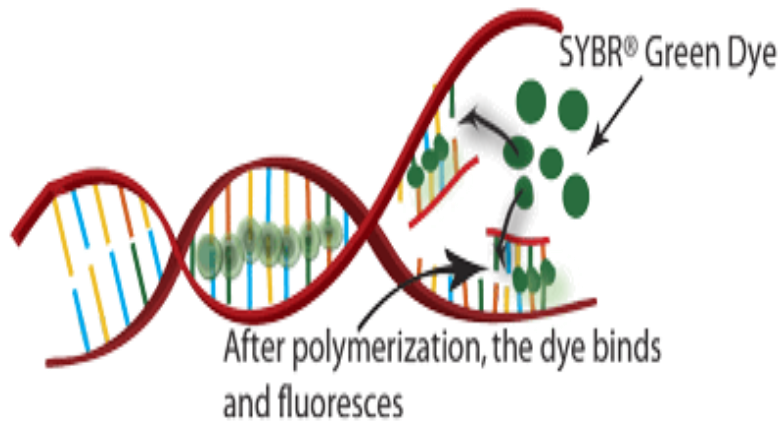
Table 5.1 Choice of Agarose Concentration for DNA Gels*¹⁰

Agarose Concentration (%)	Separation Range (size in bp)
0.3	5000–60,000
0.6	1000–20,000
0.8	800–10,000
1.0	400–8000
1.2	300–7000
1.5	200–4000
2.0	100–3000

Điện di nucleic acid: các yếu tố cần quan tâm?



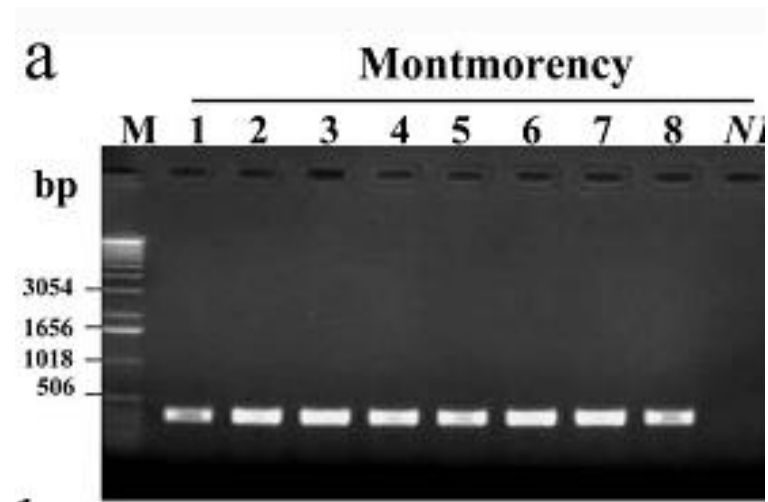
Phát hiện



PHÁT HIỆN DNA/RNA:

- Thường sử dụng Ethidium bromide/SYBR green
- Phát hiện được những vạch có nồng độ DNA/RNA từ 20 ng

⇒ RNA (mạch đơn) có được phát hiện bằng phương pháp này không?



Cấu trúc thứ cấp của RNA

rRNA

28S: 5,0 kb

18S: 1,9 kb

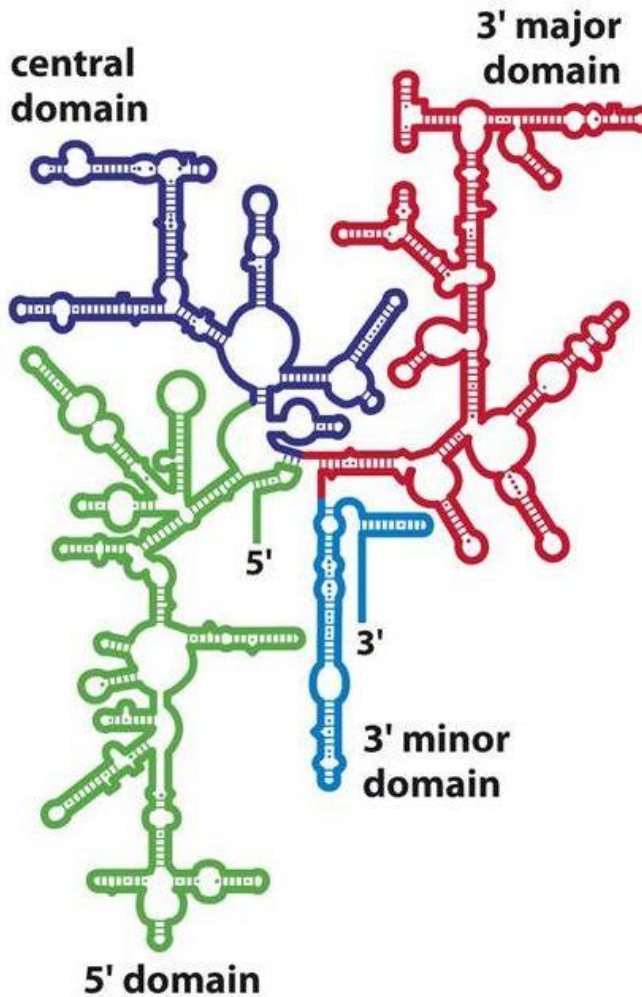


Figure 6.5 Introduction to Genetics (© Garland Science 2012)

Nguyên vật liệu – thiết bị

HÓA CHẤT

1. Agarose.
2. Dung dịch điện di **TAE** 1X (pha loãng từ TAE 50X).
3. **GelRed loading buffer 6X**
4. **Thang DNA**

THIẾT BỊ

1. Bộ dụng cụ đổ gel
2. Bộ thiết bị điện di
3. Bàn đèn UV

DỤNG CỤ

1. Micropipet 10 μ l và tip tương ứng.
2. Eppendorf 1,5 ml



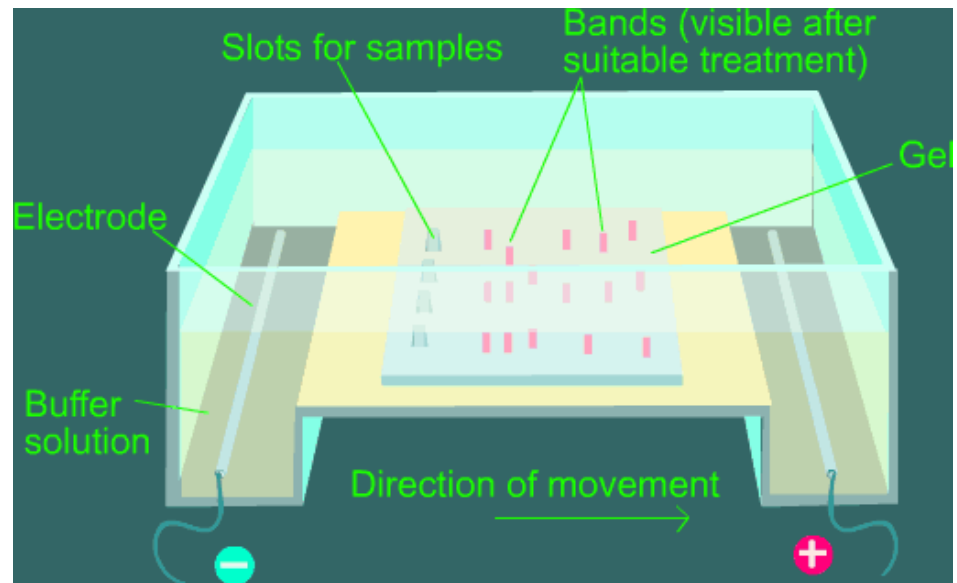
Nguyên vật liệu: TAE

THÀNH PHẦN DUNG DỊCH TAE:

- Tris
- EDTA
- acetic acid

Sử dụng cho:

- Pha dung dịch agarose
- Dung dịch điện di



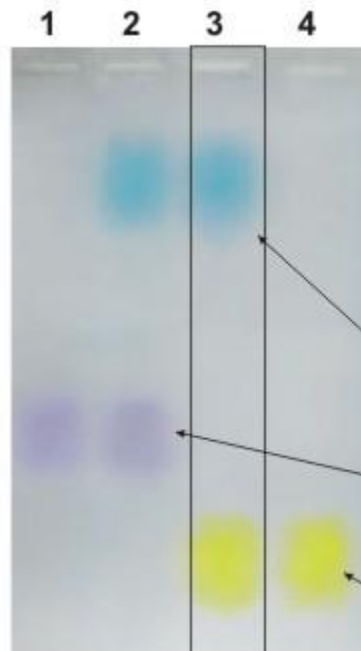
Nguyên vật liệu: dd nạp mẫu

THÀNH PHẦN DUNG DỊCH NẠP MẪU:

- Glycerol
- Bromophenol blue
- Xylene cyanol
- Orange G
- Chất nhuộm DNA



6x DNA Loading Dye



Line 1: DNA L.Dye Buffer Blue

Line 2: DNA L.Dye Buffer Double Blue

Line 3: DNA L.Dye Buffer Orange, Blue

Line 4: DNA L.Dye Buffer Orange

In 1% agarose gel 1x TBE

Xylene Cyanol FF migrates along
with ~3500 bp fragments,

Bromophenol Blue migrates along
with ~300 bp fragments and

Orange G migrates along with ~40 bp

Nguyên vật liệu: thang

(-)



Hỗn hợp gồm các
đoạn DNA có kích
thước: 100, 200, 300,
... 1000, 1500 bp

(+)

Thang 100 bp



1,500 bp
1,000 bp
900 bp
800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

Thang 100 bp

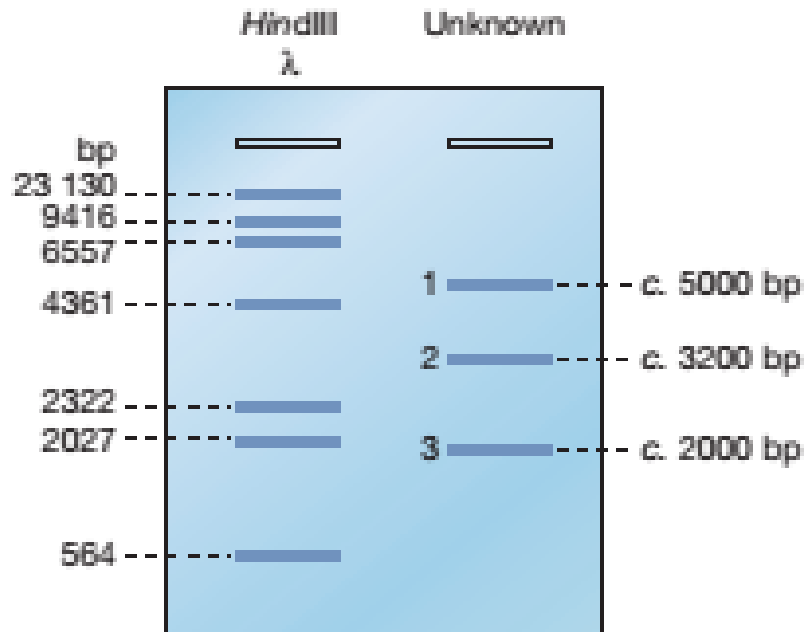


bp
23130*
9416
6557
4361*
2322
2027
564

1 % Agarose

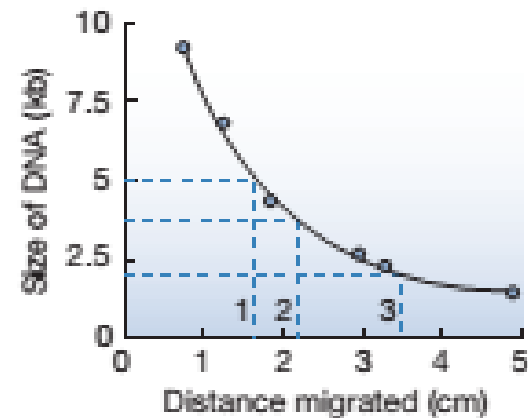
Thang λ HindIII

Nguyên vật liệu: thang



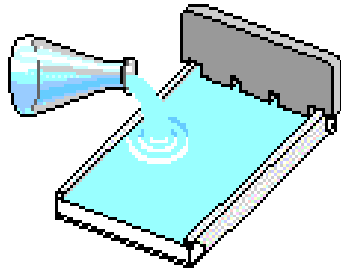
Xác định kích thước

(b) Accurate graphical estimation

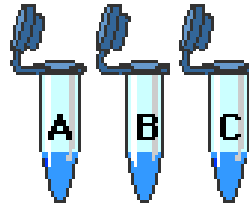


Quy trình chung

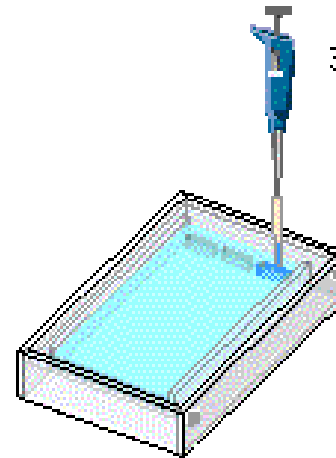
1. Make gel.



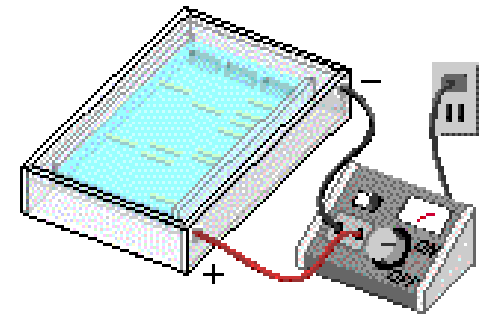
2. Obtain prepared DNA samples.



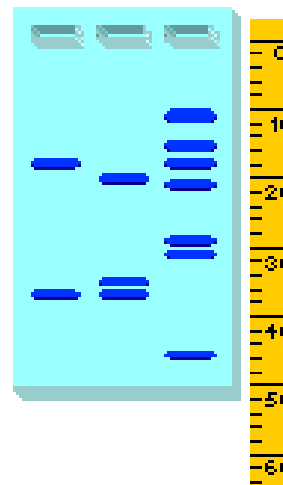
3. Load samples into gel.



4. Separate fragments by electrophoresis.



5. Stain DNA fragments and measure distances.



Chuẩn bị gel agarose

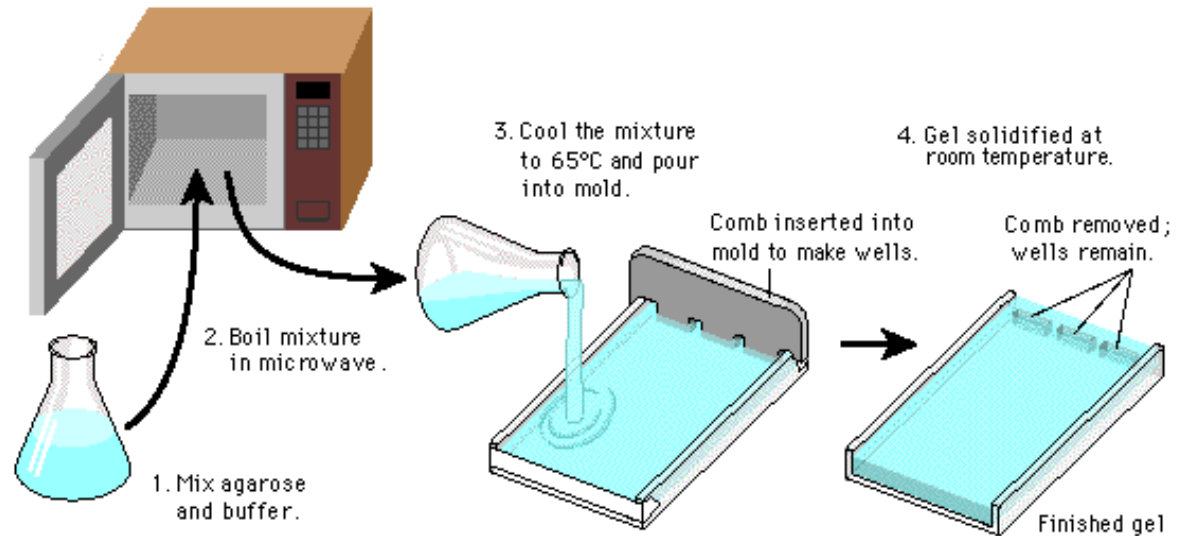
Chuẩn bị 1 bảng gel agarose
1 % (w/v):

- Số giếng cần sử dụng
- Chiều dài đường chạy
- Thể tích mẫu/giếng
- Khuôn gel

↓
Thể tích dung dịch agarose
cần??

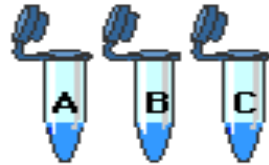


Tính lượng agarose cần cân ???

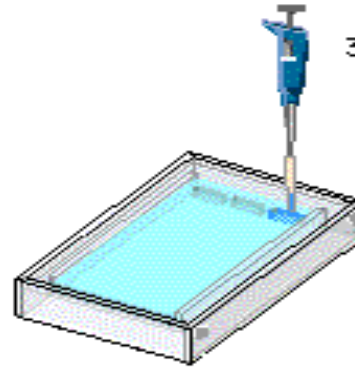


Chuẩn bị mẫu – Điện di – Phát hiện

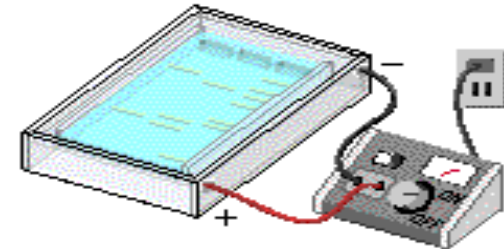
2. Obtain prepared DNA samples.



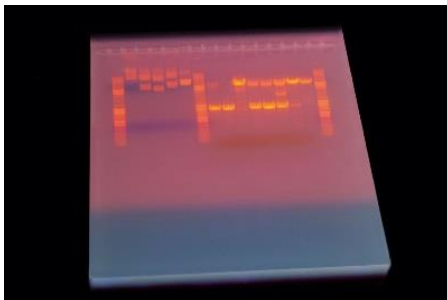
3. Load samples into gel.



4. Separate fragments by electrophoresis.



Tính thể tích dung dịch nạp mẫu 6X cần để trộn với 20 μ l DNA/RNA ???

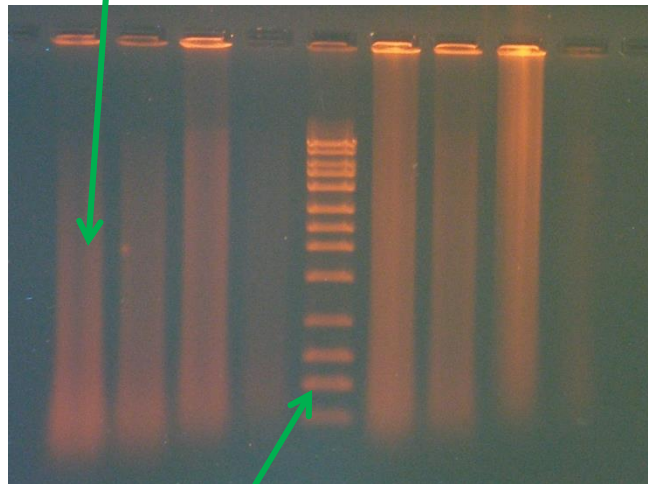


52-286-245

Kết quả điện di

Các dạng tín hiệu có thể thấy trên gel và ý nghĩa của từng dạng?

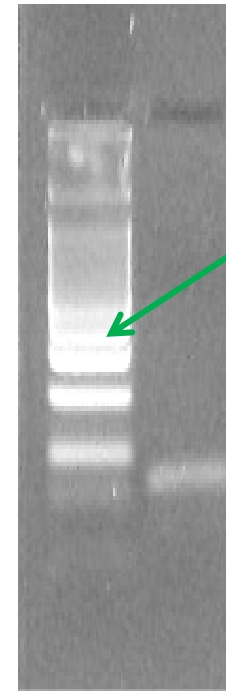
Vệt (Smear)



Vạch (band)



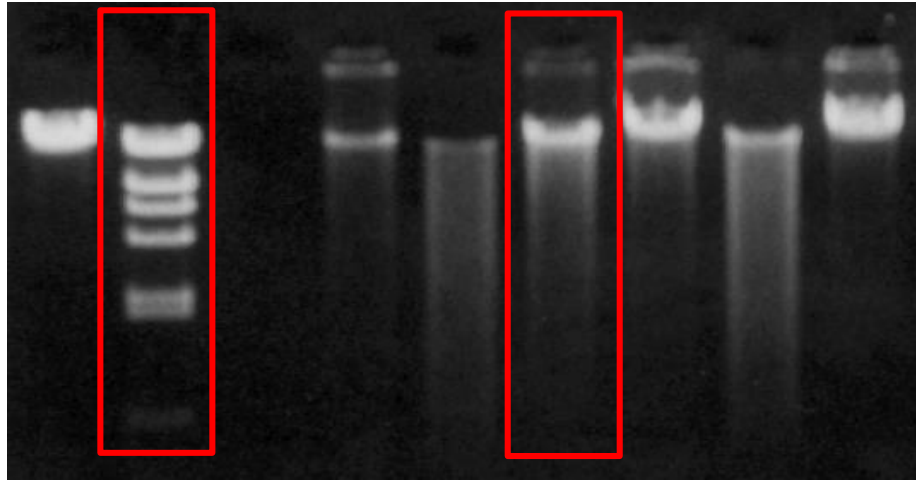
Điểm



Các vạch
DNA không
phân tách

Kết quả điện di

Cần chú ý quan sát gì không xem kết quả điện di?



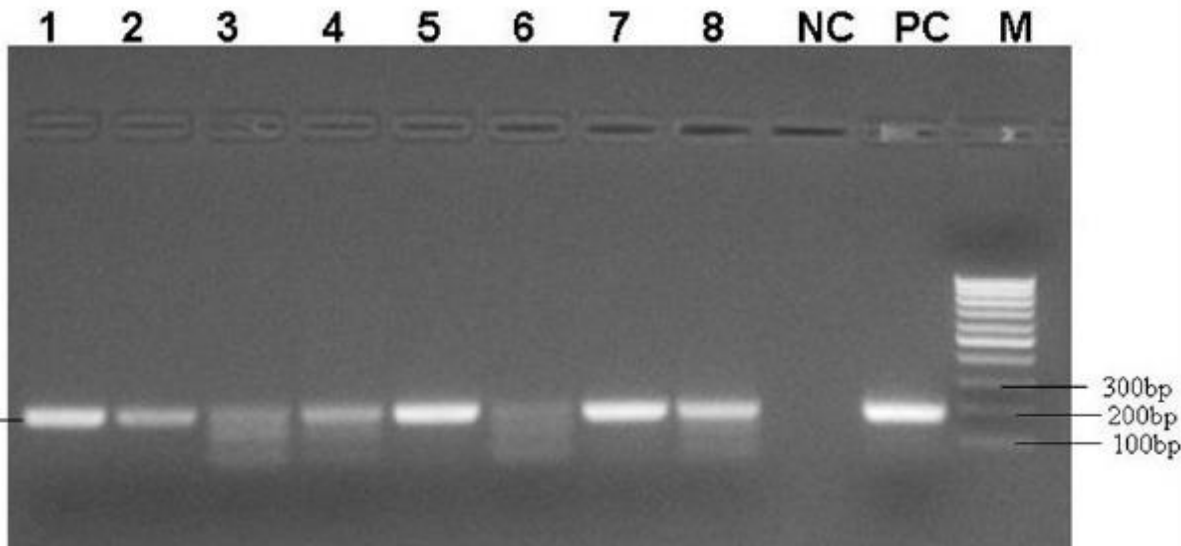
Cần biết:

- 1 - Thang điện di sử dụng là gì, bao nhiêu vạch, kích thước như thế nào?
- 2 - Sản phẩm mục tiêu: Kích thước? Đặc điểm là gì? => dự đoán kết quả

Quan sát:

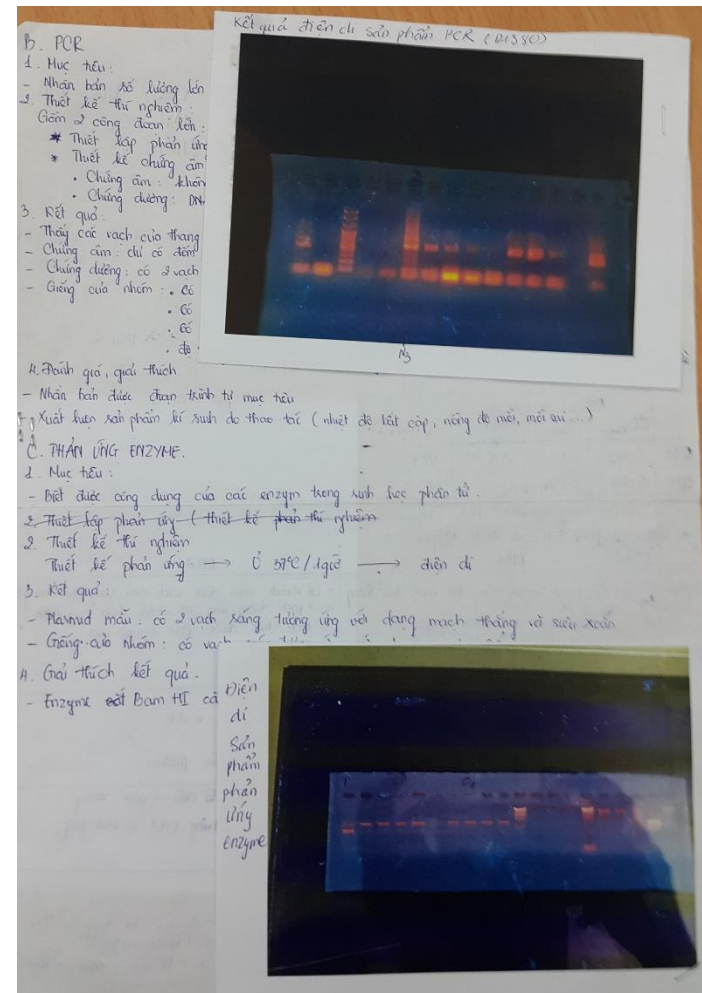
- 1 - Xác định các giếng quan tâm: thang, đối chứng, nhóm
- 2 - Mỗi giếng: quan sát trên toàn đường chạy, xác định dạng tín hiệu, số lượng, kích thước.

Trình bày kết quả điện di



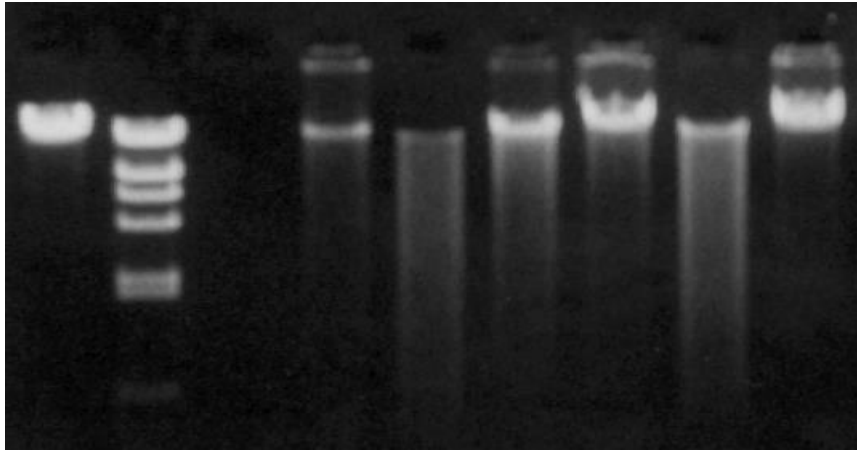
Chú thích:

- + 1 – 8 : sản phẩm PCR của nhóm 1 – 8
- + NC: chứng âm
- + PC: chứng dương
- + M: thang



Phân tích chất lượng DNA/RNA

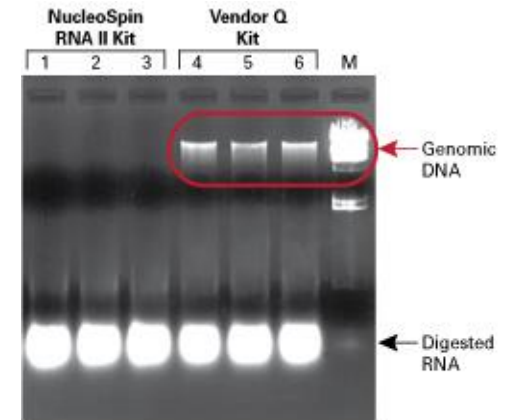
DNA bộ gene người



DNA Lambda

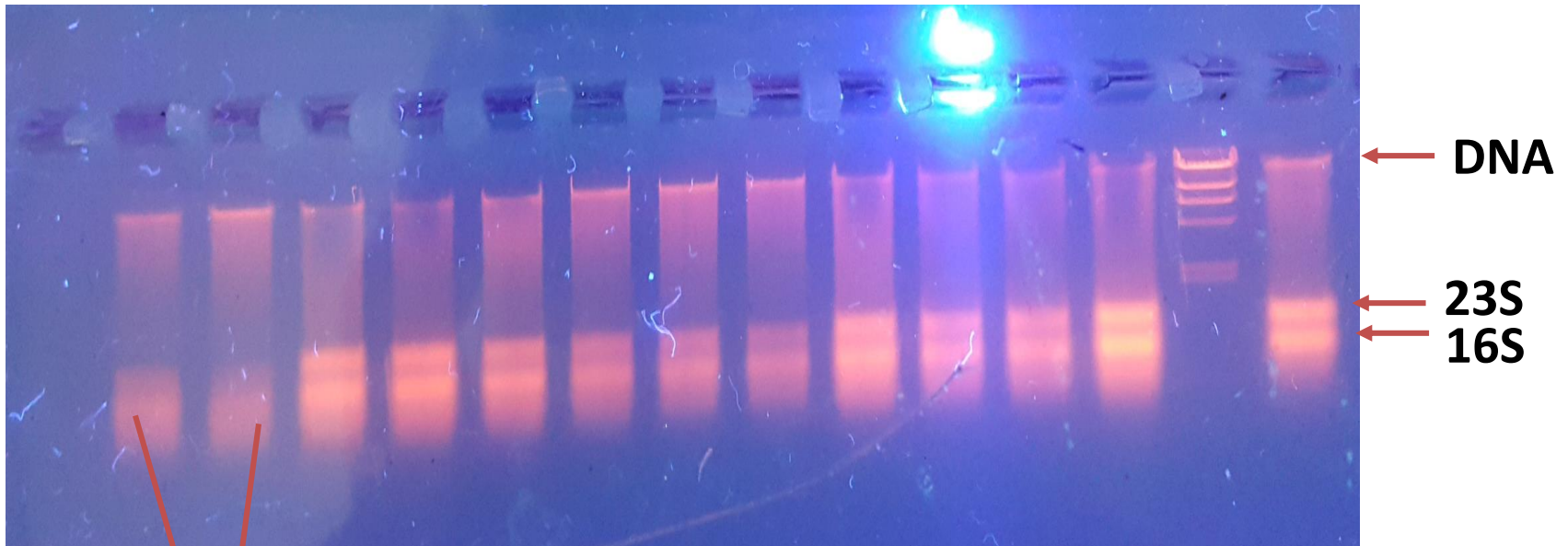
DNA Lambda bị cắt bởi
Hind III
(Thang Lambda
HindIII)

DNA bộ gene



Phân tích chất lượng DNA/RNA

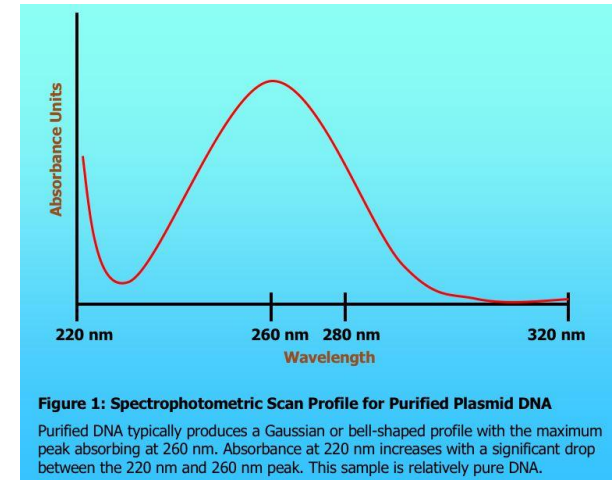
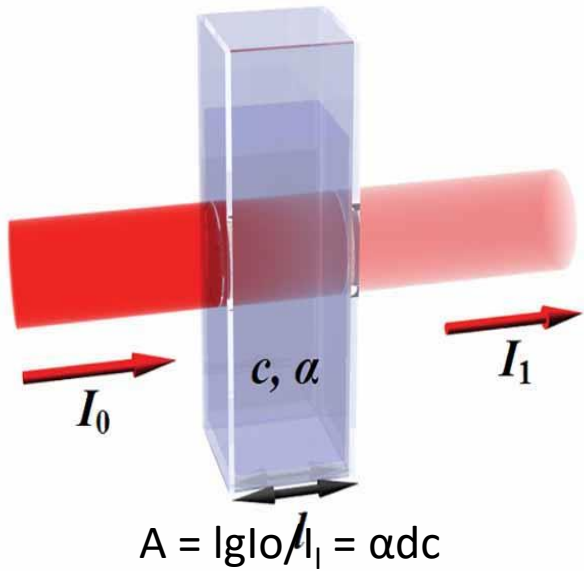
RNA vi khuẩn



RNA phân hủy

Phương pháp đo OD

Định luật Beer-Lambert



MỤC TIÊU

1. Độ tinh sạch của mẫu DNA/RNA: sự nhiễm protein, 1 số dung môi
2. Xác định nồng độ và lượng nucleic acid

Xác định nồng độ DNA/RNA

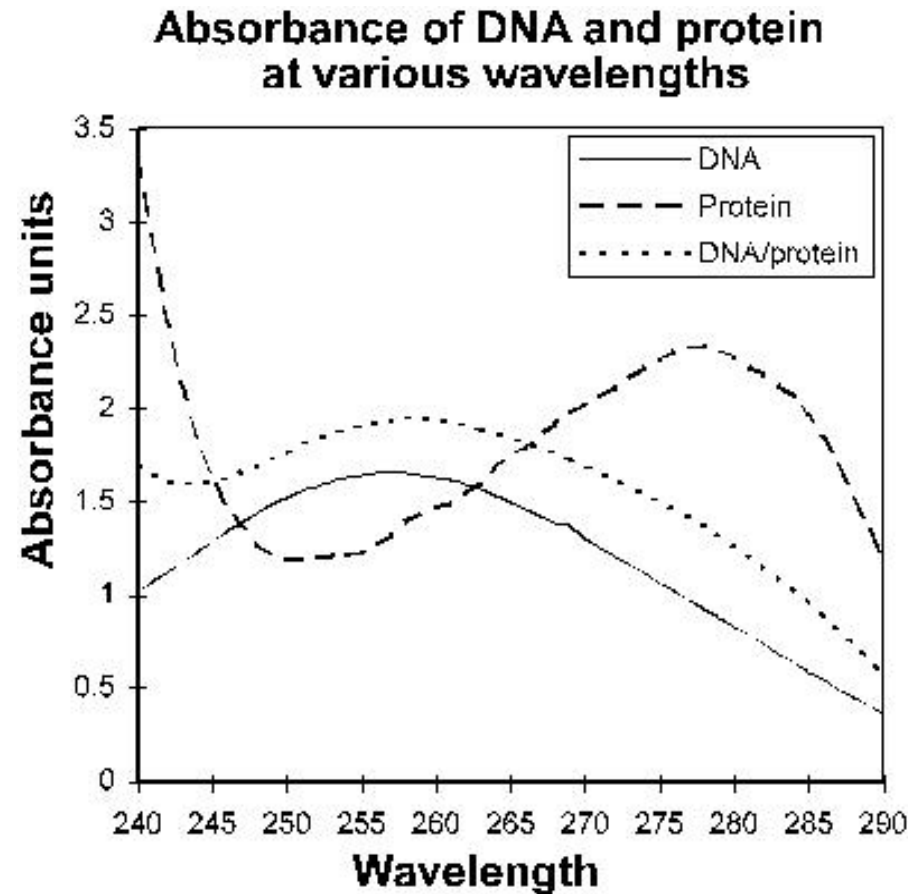
Nồng độ DNA/RNA = số μg DNA/RNA trong 1ml ($\mu\text{g}/\text{ml}$ hay $\text{ng}/\mu\text{l}$)

$[\text{DNA}] = \text{OD} \times 50 \times \text{hệ số pha loãng} (\mu\text{g}/\text{ml})$

$[\text{RNA}] = \text{OD} \times 40 \times \text{hệ số pha loãng} (\mu\text{g}/\text{ml})$

$[\text{oligonucleotide}] = \text{OD} \times 20 \times \text{hệ số pha loãng} (\mu\text{g}/\text{ml})$

Chính xác khi DNA/RNA tinh sạch



$A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$

Hóa Chất:

TE 1X

Nước cất 2 lần

Dụng Cụ

1. Micropipet
2. Eppendorf

Thiết Bị

Máy đo quang phổ

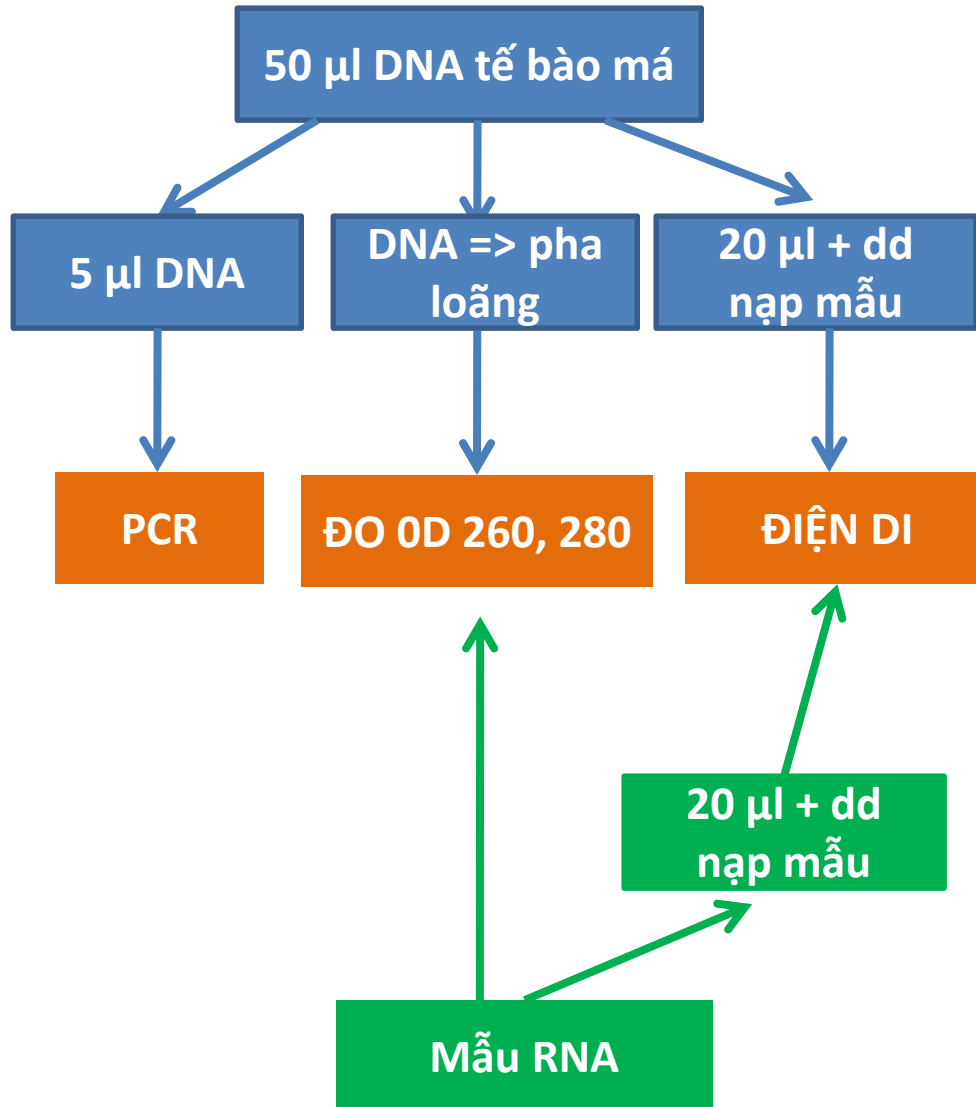


Qui trình

1. Pha loãng dung dịch DNA/RNA
2. Đo OD_{260} và OD_{280} của dung dịch DNA/RNA mẫu.
3. Tính tỉ lệ OD_{260}/OD_{280} và nồng độ DNA/RNA, tổng lượng DNA có được.
4. Kết luận.

THỰC HÀNH

Phân tích mẫu DNA và RNA đã tách chiết được



Tóm tắt

- **Điện di (electrophoresis)**
 - Phân tách các đoạn DNA/RNA
 - Xác định kích thước phân tử DNA/RNA
 - Phân tích chất lượng nucleic acid (sự nguyên vẹn, nhiễm DNA/RNA)
- **Đo mật độ quang (spectrophotometry)**
 - Phân tích chất lượng nucleic acid (nhiễm protein, dung môi hữu cơ)
 - Xác định nồng độ, lượng

Phân tích mẫu DNA/RNA:

1. Sự nguyên vẹn:
phương pháp điện di
2. Sự nhiễm :
 - Protein: phương pháp đo OD
 - Nucleic acid khác: phương pháp điện di
3. Nồng độ, lượng:
phương pháp đo OD

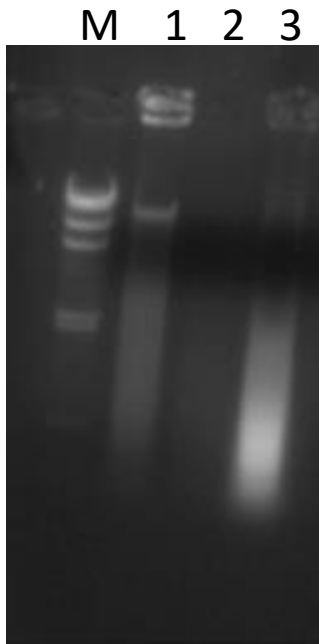
Bài tập

Tiêu chí	PP đánh giá	DNA		RNA	
		Tốt	Không tốt	Tốt	Không tốt
Nguyên vẹn					
Nhiễm protein					
Nhiễm nucleic acid khác					
Nồng độ					

KẾT QUẢ MẪU DNA BỘ GENE TÁCH CHIẾT ĐƯỢC

Nhóm	OD 280	OD 260
Nhóm 1	0.677	1.239
Nhóm 2	0.102	0.151
Nhóm 3	0.937	1,829

Mẫu DNA được
pha loãng 5 lần



M: thang lamda HindIII

1,2,3: lần lượt là mẫu của nhóm 1, 2, 3