



## GIỚI THIỆU MINI-PROJECT 1

### Thiết kế plasmid biểu hiện insulin tái tổ hợp bằng *E. coli*

Protein Expression and Purification 157 (2019) 63–69

---

Contents lists available at ScienceDirect



**Protein Expression and Purification**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yprep](http://www.elsevier.com/locate/yprep)



**Expression and purification of recombinant human insulin from *E. coli* 20 strain**

Marcin Zieliński\*, Agnieszka Romanik-Chruścielewska, Diana Mikiewicz, Natalia Łukasiewicz, Iwona Sokółowska, Jarosław Antosik, Agnieszka Sobolewska-Ruta, Anna Bierzwińska-Krzysik, Piotr Zaleski, Andrzej Płucienniczak


Institute of Biotechnology and Antibiotics, Staroicimska 5, Warszawa, 02-516, Poland

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

7

7



CHƯƠNG I

# SINH TỔNG HỢP DNA, RNA, PROTEIN

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

8

8



## NỘI DUNG

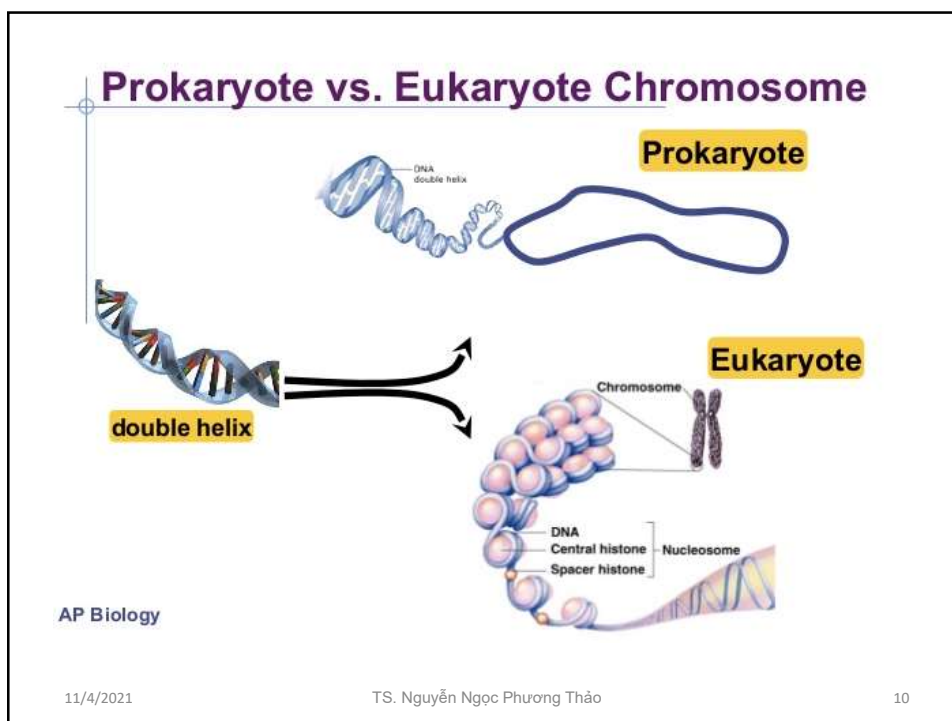
- 1.1 Cấu trúc của DNA
- 1.2 Quá trình sao chép DNA
- 1.3 Giải mã thông tin di truyền: RNA (phiên mã) và protein (dịch mã)
- 1.4 Điều hoà phiên mã ở sinh vật nhân sơ
- 1.5 Điều hoà phiên mã ở sinh vật nhân chuẩn

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

9

9



11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

10

10



# 1.1. DNA structure

[https://www.youtube.com/watch?v=o\\_-6JXLYS-k](https://www.youtube.com/watch?v=o_-6JXLYS-k)

11/4/2021

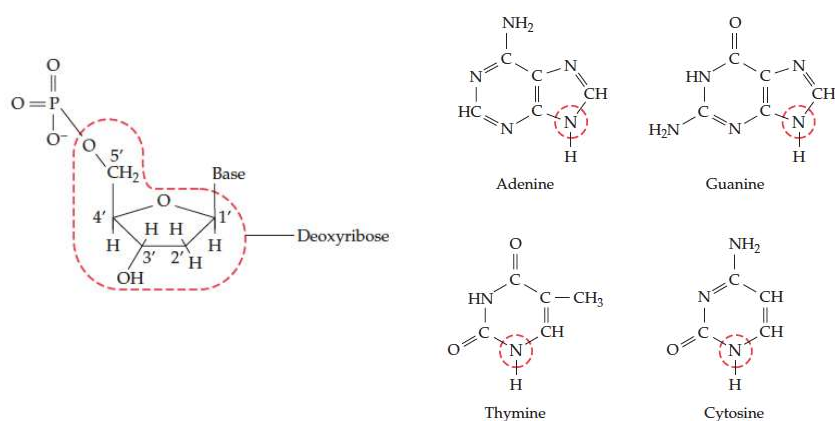
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

11

11



# 1.1. DNA structure

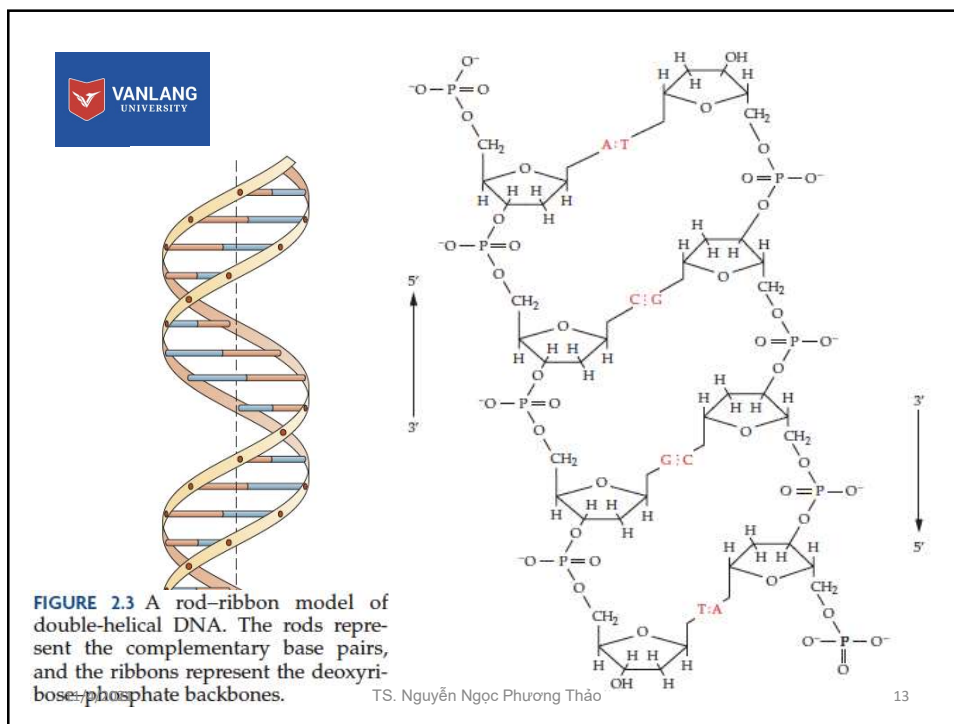


11/4/2021

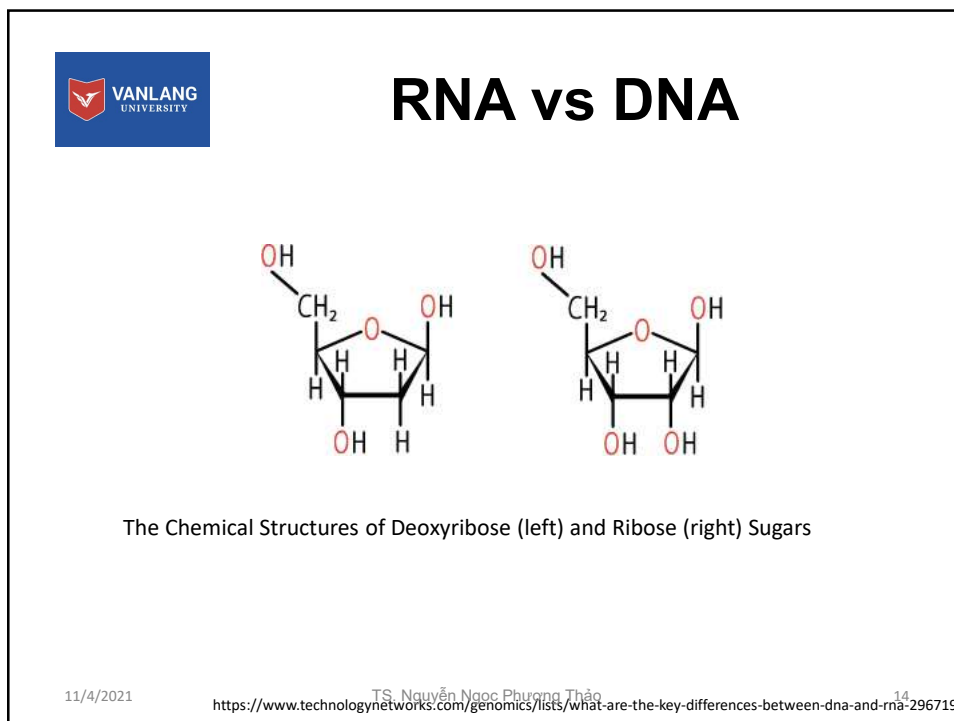
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

12


12



13

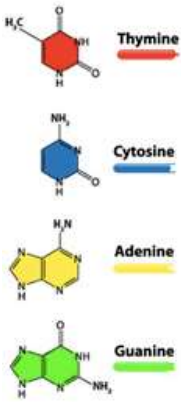


14




**VANLANG UNIVERSITY**

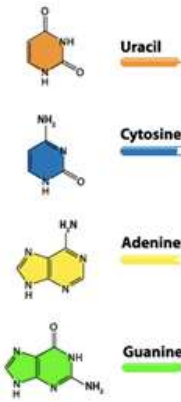
# RNA vs DNA




**Nucleobases of DNA**



**DNA**  
Deoxyribonucleic Acid



**Nucleobases of RNA**




**RNA**  
Ribonucleic Acid

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

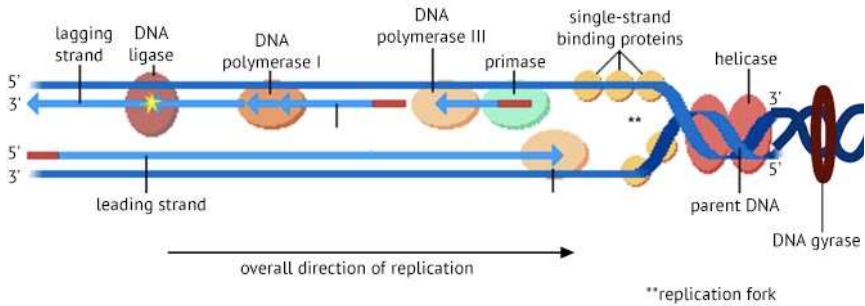
11/4/2021
15

15



**VANLANG UNIVERSITY**

## 1.2. SAO CHÉP DNA (DNA REPLICATION)



5' 3' leading strand

5' 3' lagging strand

parent DNA

overall direction of replication

\*\*replication fork

[https://www.youtube.com/watch?v=TNKWgcFPHqw&ab\\_channel=yourgenome](https://www.youtube.com/watch?v=TNKWgcFPHqw&ab_channel=yourgenome)

11/4/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo
16

16



## 1.2 SAO CHÉP DNA (DNA REPLICATION)

No.	Quá trình	Các nhân tố tham gia
1	Tách mạch đôi, hình thành chạc ba sao chép (replication fork) tại vị trí khởi đầu sao chép (replication origin)	Helicase, gyrase, single-strand binding protein
2	Tạo RNA primers	Primase
3	Tạo sợi bổ sung theo chiều 5'-3' Leading strand: liên tục Lagging strand: đoạn okazaki	DNA polymerase III, primer, dNTPs, primase
4	Loại bỏ RNA primers Thay thế bằng các dNTPs	Exonuclease DNA polymerase I
5	Nối các đoạn okazaki	DNA ligase

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

17

17



## 1.3. PHIÊN MÃ VÀ DỊCH MÃ

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

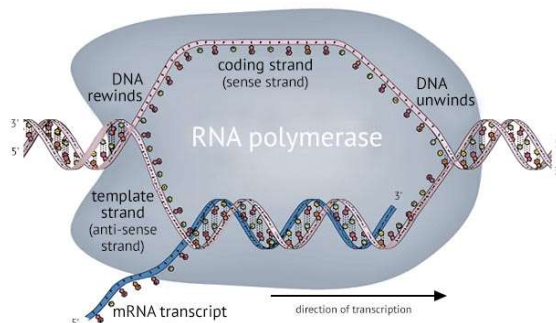
18

18



## 1.3.1 Phiên mã (FROM DNA TO RNA)

[https://www.youtube.com/watch?v=\\_Zyb8bpGMR0&ab\\_channel=ArmanHossain](https://www.youtube.com/watch?v=_Zyb8bpGMR0&ab_channel=ArmanHossain)



11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

19

19



## 1.3.1 Phiên mã (FROM DNA TO RNA)

No.	Quá trình	Các nhân tố tham gia
1	Tháo xoắn, mở mạch, các protein bám dính lên sợi DNA tại vùng promoter	Transcription factors, RNA polymerase
2	Kéo dài chuỗi polymer, chiều 5' đến 3'	NTPs, RNA polymerase
3	Kết thúc phiên mã	Yếu tố kết thúc (terminator)
4	Tách sợi RNA và DNA	
5	Gắn nón 5' và đuôi polyA	
6	Intron splicing	Spliceosome
7	Di chuyển mRNA vào tế bào chất	


- RNA polymerase I transcribes genes encoding ribosomal RNA (rRNA)
- **RNA polymerase II** transcribes messenger RNA (mRNA).
- RNA polymerase III transcribes genes encoding transfer RNAs (tRNA)

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

20

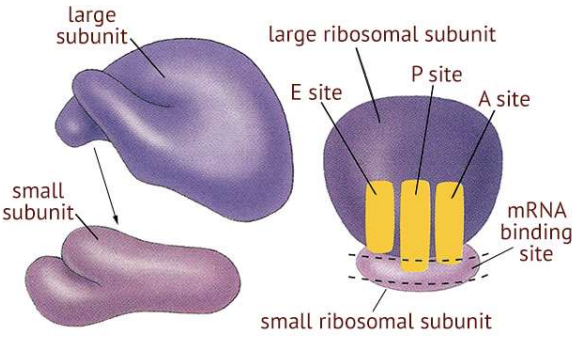
20



**VANLANG UNIVERSITY**

## 1.3.2 Dịch mã (RNA to PROTEIN)

[https://www.youtube.com/watch?v=NDIjexTT9j0&ab\\_channel=RedMedBd](https://www.youtube.com/watch?v=NDIjexTT9j0&ab_channel=RedMedBd)




Labels in diagram: large subunit, small subunit, large ribosomal subunit, small ribosomal subunit, E site, P site, A site, mRNA binding site.

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

21

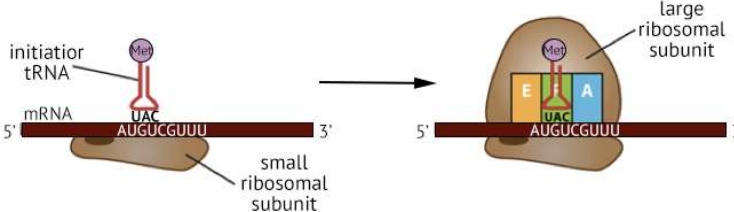
21



**VANLANG UNIVERSITY**

## 1.3.2 Dịch mã (RNA to PROTEIN)

No.	Quá trình	Các nhân tố tham gia
1	Initiation (bắt đầu) tạo phức hợp ribosome, mRNA, tRNA <sup>Met</sup> -Tiểu phần nhỏ ribosome bám lên mRNA, nhận diện codon khởi đầu (AUG) -tRNA <sup>Met</sup> bám lên codon khởi đầu -Tiểu phần lớn liên kết với tiểu phần nhỏ tạo phức hợp	ribosome, mRNA, tRNA <sup>Met</sup>



Labels in diagram: initiator tRNA, mRNA, AUGUGUUU, small ribosomal subunit, large ribosomal subunit, E, A.

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

22

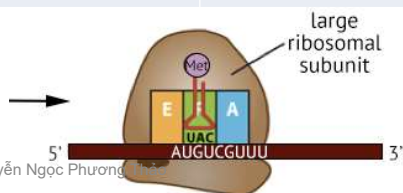
22





## 1.3.2 Dịch mã (RNA to PROTEIN)

No.	Quá trình	Các nhân tố tham gia
1	Initiation	
2	Enlongation (kéo dài) - tRNA <sup>anticodon2</sup> đến vị trí Acceptor (A) -liên kết peptide với Met -tRNAMet bị deacylated, dịch qua vị trí Exit (E) -tRNA <sup>anticodon2</sup> di chuyển qua vị trí Peptidyl (P) -.... Cứ như thế chuỗi protein được kéo dài	Ribosome, các tRNA, mRNA



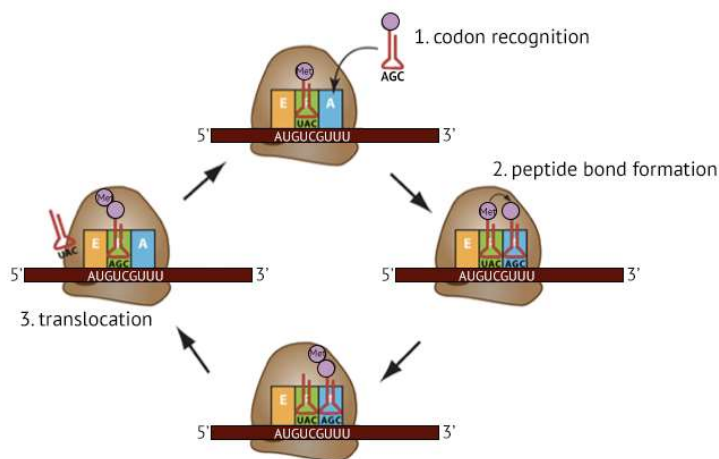
11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

23



## 1.3.2 Dịch mã (RNA to PROTEIN)



Dịch mã: giai đoạn kéo dài (Enlongation)

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

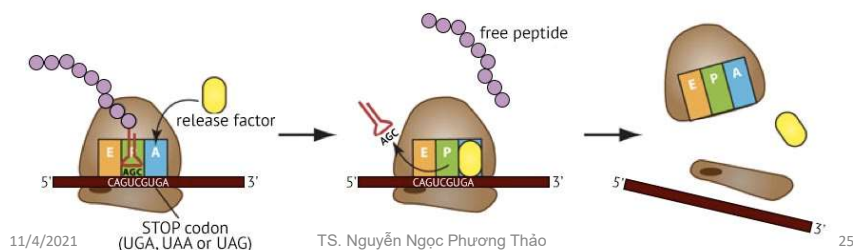
24

24



## 1.3.2 Dịch mã (RNA to PROTEIN)

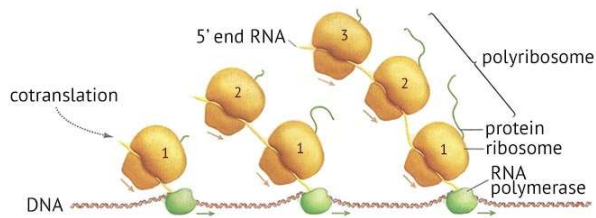
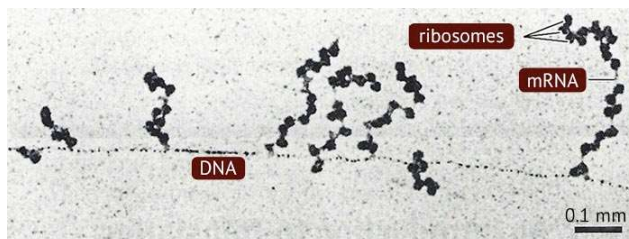
No.	Quá trình	Các nhân tố tham gia
1	Initiation	
2	Enlongation	
3	Termination: tại codon kết thúc, yếu tố release factor chiếm lấy vị trí A. Quá trình tạo chuỗi polypeptide ngừng	Ribosome, Release Factor, mRNA



25



## Phiên mã - dịch mã prokaryotes




11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

26

26



# Dịch mã

**TABLE 21** Genetic code and codon usage in *E. coli* and humans

Codon	Amino acid	Frequency of use in:	
		<i>E. coli</i>	Humans
GCG	Glycine	0.13	0.23
GGA	Glycine	0.09	0.26
GGU	Glycine	0.38	0.18
GGC	Glycine	0.40	0.33
GAG	Glutamic acid	0.30	0.59
GAA	Glutamic acid	0.70	0.41
GAU	Aspartic acid	0.59	0.44
GAC	Aspartic acid	0.41	0.56
GUG	Valine	0.34	0.48
GUA	Valine	0.17	0.10
GUU	Valine	0.29	0.17
GUC	Valine	0.20	0.25
GCG	Alanine	0.34	0.10
GCA	Alanine	0.22	0.22
GCU	Alanine	0.19	0.28


*(continued)*

**TABLE 21** Genetic code and codon usage in *E. coli* and humans *(continued)*

Codon	Amino acid	Frequency of use in:	
		<i>E. coli</i>	Humans
GCC	Alanine	0.25	0.40
AAG	Lysine	0.24	0.60
AAA	Lysine	0.76	0.40
AAU	Asparagine	0.39	0.44
AAC	Asparagine	0.61	0.56
AUG	Methionine	1.00	1.00
AUA	Isoleucine	0.07	0.14
AUU	Isoleucine	0.47	0.35
AUC	Isoleucine	0.46	0.51
ACG	Threonine	0.23	0.12
ACA	Threonine	0.12	0.27
ACU	Threonine	0.21	0.23
ACC	Threonine	0.43	0.58
UGG	Tryptophan	1.00	1.00
UGU	Cysteine	0.43	0.42
UGC	Cysteine	0.57	0.58
UGA	Stop	0.30	0.61
UAG	Stop	0.09	0.17
UAA	Stop	0.62	0.22
UAU	Tyrosine	0.53	0.42
UAC	Tyrosine	0.47	0.58
UUU	Phenylalanine	0.51	0.43
UUC	Phenylalanine	0.49	0.57
UCG	Serine	0.13	0.06
UCA	Serine	0.12	0.15
UCU	Serine	0.19	0.17
UCC	Serine	0.17	0.23
AGU	Serine	0.13	0.14
AGC	Serine	0.27	0.25
CGG	Arginine	0.08	0.19
CGA	Arginine	0.05	0.10
CGU	Arginine	0.42	0.09
CCG	Arginine	0.37	0.19
AGG	Arginine	0.03	0.22
AGA	Arginine	0.04	0.21
CAG	Glutamine	0.69	0.73
CAA	Glutamine	0.31	0.27
CAU	Histidine	0.52	0.41
CAC	Histidine	0.48	0.59
CUG	Leucine	0.55	0.43
CUA	Leucine	0.03	0.07
CUU	Leucine	0.10	0.12
CUC	Leucine	0.10	0.20
UUG	Leucine	0.11	0.12
UUA	Leucine	0.11	0.06
CCG	Proline	0.55	0.11
CCA	Proline	0.20	0.27
CCU	Proline	0.16	0.29
CCC	Proline	0.10	0.33

11/4/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

27



# Bài tập

## Câu hỏi ngắn - Elearning

11/4/2021
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo
28

28



## 1.4. ĐIỀU HOÀ PHIÊN MÃ Ở PROKARYOTES

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

29

29



## CÁC MÔ HÌNH ĐIỀU HOÀ CHÍNH

- A. Ức chế** (negative regulation) RNA polymerase thực hiện phiên mã bởi repressor protein
- **Inducer**: khi yếu tố bên ngoài môi trường kích hoạt thực hiện phiên mã
  - **Co-Repressor**: khi yếu tố bên ngoài môi trường bất hoạt phiên mã
  - **Effector**: từ dùng chung cho inducer và co-repressor
- B. Kích hoạt** (positive regulation) RNA polymerase thực hiện phiên mã bởi activator protein

11/4/2021

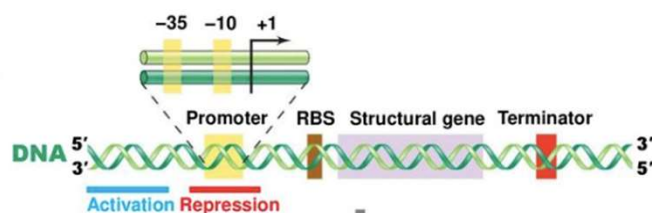
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

30

30



## CẤU TRÚC GENE Ở PROKARYOTES



- **Operon**: 1 hoặc nhiều CDS
- **Coding Sequence (CDS)**: start codon, stop codon
- **Promoter** (-35 box: TTGACA, -10 box (Pribnow box): TATAAT )
- **TSS, Transcription Stop Site**
- **Operator**: vùng trình tự xung quanh vị trí bám dính của RNA polymerase

11/4/2021

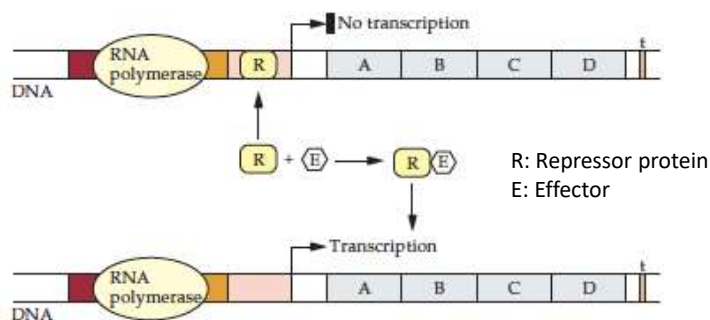
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

31

31



## Mô hình điều hoà 1



**FIGURE 2.24** Induction of the on state for transcription of a bacterial operon. The repressor protein (R) binds to the operator region and blocks transcription. The binding of an effector molecule (E) to the repressor protein changes the conformation of the repressor protein. The repressor protein-effector (RE) complex cannot bind to the operator region; thus, RNA polymerase can transcribe the operon.

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

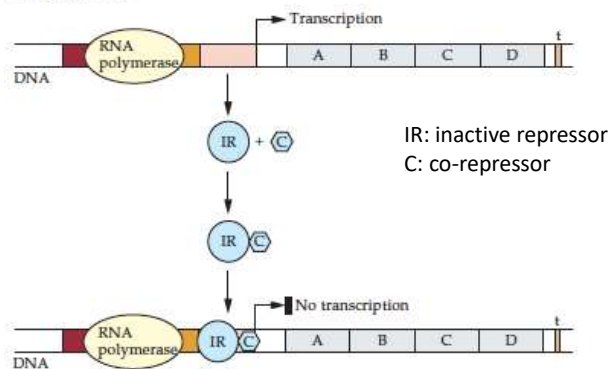
32

32



## Mô hình điều hoà 2

FIGURE 2.25 Induction of the off state for transcription of a bacterial operon. The binding of a corepressor molecule (C) to an inactive repressor protein (IR) changes the conformation of the repressor protein. The corepressor-repressor protein complex (IR-C) binds to the operator region and blocks transcription of the operon by RNA polymerase.



11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

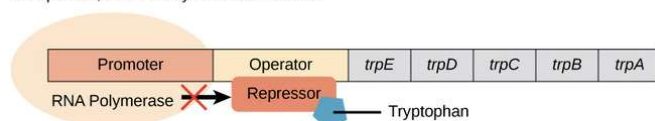
33

33

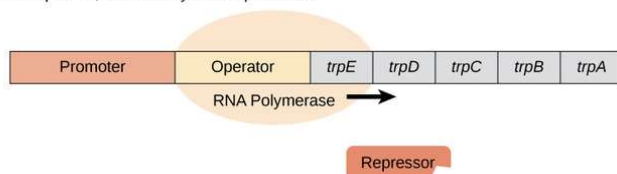


## Ví dụ 1: Tryptophan operon

When tryptophan is present, the trp repressor binds the operator, and RNA synthesis is blocked.



In the absence of tryptophan, the repressor dissociates from the operator, and RNA synthesis proceeds.



5 genes tham gia sinh tổng hợp tryptophan: trpABCDE

OFF: khi trong môi trường đã có Tryptophan

ON: khi trong môi trường ko có Tryptophan

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

34

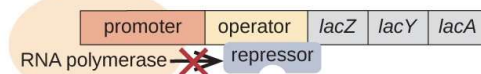
34



## Ví dụ 2: *Lac* operon

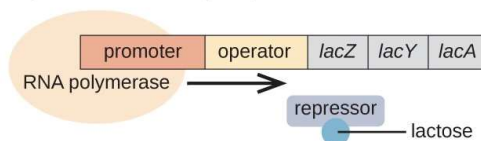
In the absence of lactose, the *lac* repressor binds the operator, and transcription is blocked.

OFF: w/o lactose



In the presence of lactose, the *lac* repressor is released from the operator, and transcription proceeds at a slow rate.

ON: w lactose



3 genes mã hoá enzyme chuyển hoá lactose: LacZYA  
Repressor: LacI

11/4/2021

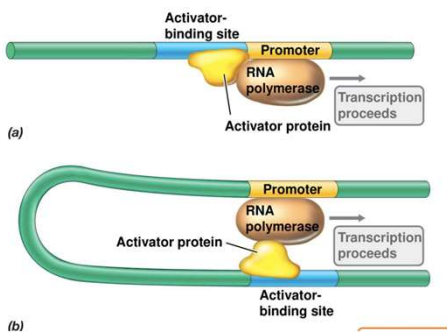
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

35

35



## Mô hình điều hoà 3



- RNA polymerase bám dính yếu vào promoter
- Activator giúp RNA polymerase nhận ra promoter: thay đổi cấu trúc DNA hoặc tương tác với RNA polymerase
- Vị trí bám dính với activator có thể cách xa vị trí promoter (vài trăm base pair)

11/4/2021

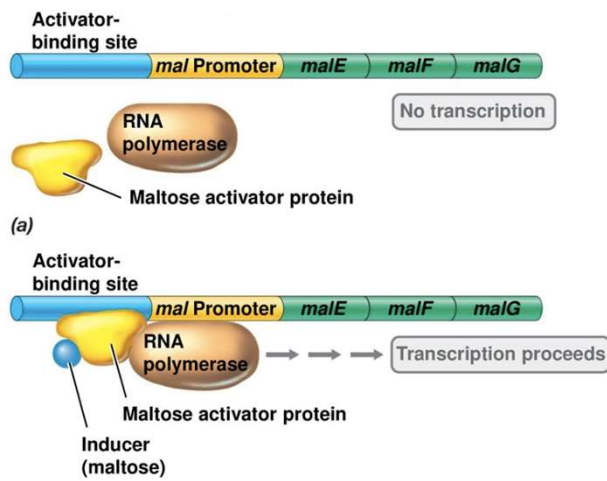
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

36

36



### Ví dụ 3: maltose catabolism

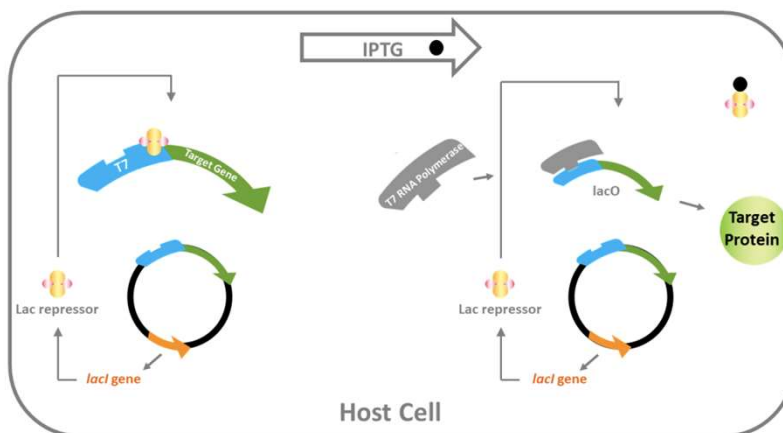


Maltose activator protein: MalT

37



### Ứng dụng: IPTG inducible promoter for protein expression



38





## 1.4. ĐIỀU HOÀ PHIÊN MÃ Ở EUKARYOTES

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

39

39



## Các mức độ điều hoà phiên mã ở eukaryotes

- Cấu trúc sợi chromatin
- Khởi đầu phiên mã
- Quá trình “chế biến” sản phẩm RNA: splicing, 5' methyl guanosine, 3' polyA
- Quá trình vận chuyển sợi mRNA
- Độ bền của sợi mRNA

[https://themedicalbiochemistrypage.org/regulation-of-gene-expression/#Histone\\_Modifications,\\_Chromatin\\_Structure,\\_Transcriptional\\_Regulation](https://themedicalbiochemistrypage.org/regulation-of-gene-expression/#Histone_Modifications,_Chromatin_Structure,_Transcriptional_Regulation)

11/4/2021

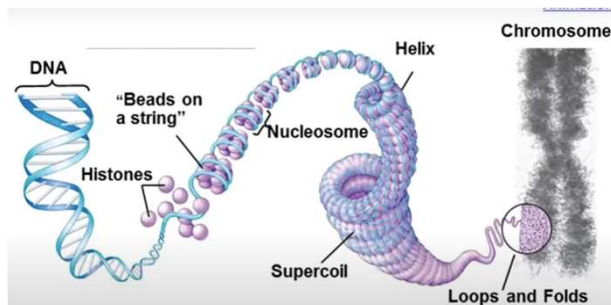
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

40

40



## Điều hoà trước phiên mã



Sợi DNA được nén lại cùng với các histone. Cấu trúc sợi NST phải được thay đổi để các enzyme tiếp xúc DNA và thực hiện phiên mã.

- Acetyl hoá histone giúp nới lỏng sợi chromatin để thực hiện phiên mã
- Deacetyl hoá histone: đóng
- Methyl hoá, ubiquitin hoá, phosphoryl hoá histone...

11/4/2021

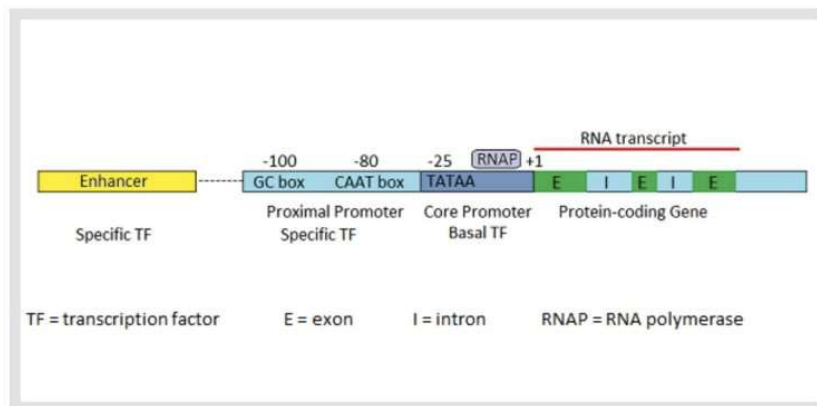
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

41

41



## Cấu trúc gene của tế bào nhân chuẩn



General structure of a eukaryotic gene and its major regulatory regions

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

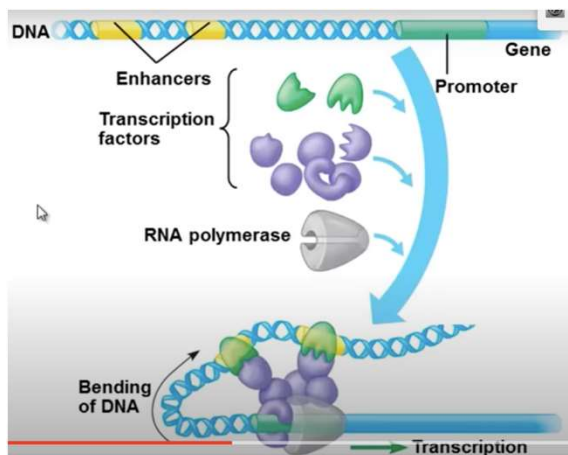
42

42



## Các yếu tố phiên mã (transcriptional factors-TFs)

- RNA polymerase
- Promoter
- **Enhancer**: vùng DNA thường xa CDS, nơi các TF bám vào
- **TF**: các protein điều hoà, bám lên vùng enhancer và giúp RNAP bám vào promoter để khởi đầu phiên mã



11/4/2021

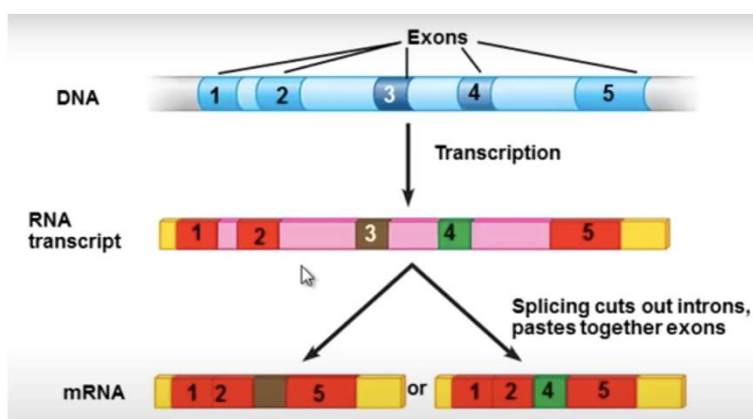
TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

43

43



## Quá trình process sợi RNA



11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

44

44



## TÓM TẮT

- 1.1 Cấu trúc của DNA
- 1.2 Quá trình sao chép DNA
- 1.3 Giải mã thông tin di truyền: RNA (phiên mã) và protein (dịch mã)
- 1.4 Điều hoà phiên mã ở sinh vật nhân sơ
- 1.5 Điều hoà phiên mã ở sinh vật nhân chuẩn

11/4/2021

TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo

45

45



## CHƯƠNG 2: CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

NGUYỄN NGỌC PHƯƠNG THẢO  
Thao.nnp@vlu.edu.vn

46