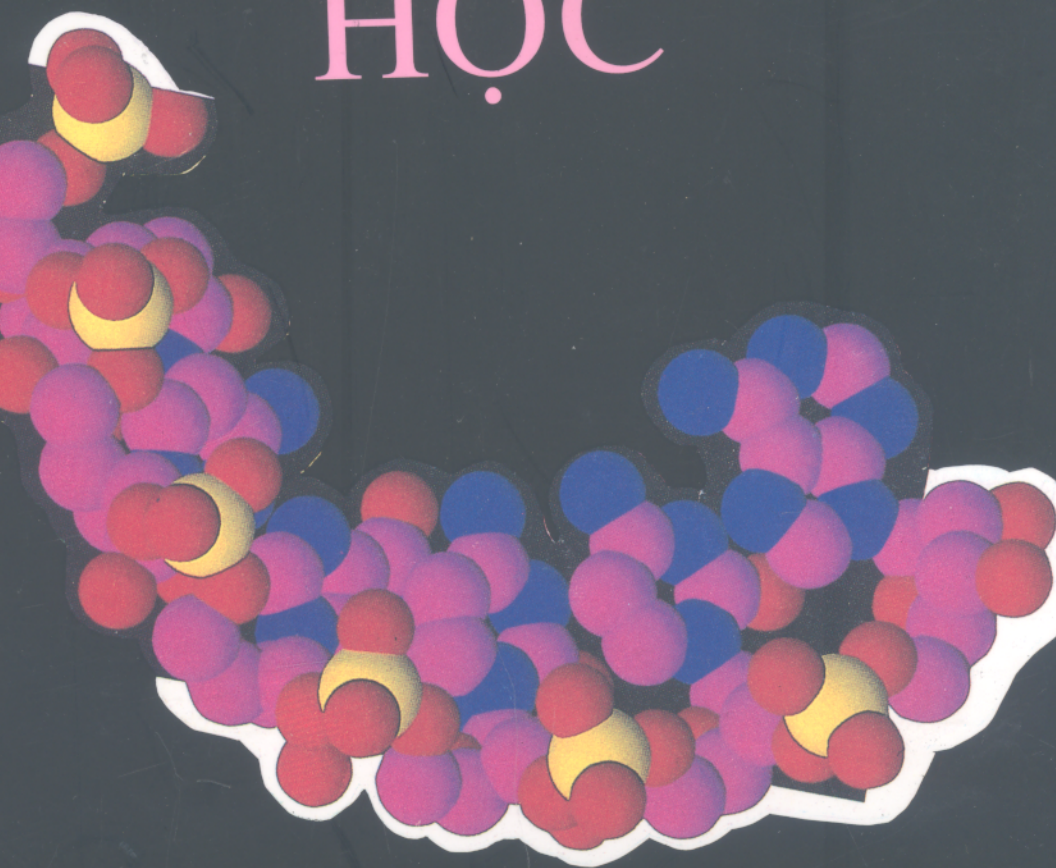


PHẠM THÀNH HỔ

DI TRUYỀN HỌC



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

PHẠM THÀNH HỒ

DI TRUYỀN HỌC

(Tái bản lần thứ bảy)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

LỜI NÓI ĐẦU

Di truyền học ra đời năm 1900, đến nay đã hơn 100 tuổi. Suốt thế kỉ 20, Di truyền học đã phát triển nhanh như vũ bão : trong 50 năm đầu, cứ 10 năm có một phát minh lớn và sau đó khoảng cách rút lại còn 2 năm. Sự hiểu biết sâu sắc về bản chất của tính di truyền đã có **vai trò cách mạng hóa** đối với sinh học. Đặc biệt trong 25 năm vừa qua, kể từ khi phát minh ra **kĩ thuật di truyền**, nhiều vấn đề sinh học trước đây tưởng chừng khó với tới thì nay đã có những bước tiến quan trọng. Nhờ đó, có **sự thống nhất** giữa các nghiên cứu sinh học : từ gen đến protein và tiếp theo là sinh hóa - sinh lí của tính trạng. Chưa bao giờ sự hiểu biết về bộ gen của nhiều sinh vật và nhất là của bộ gen người được chi tiết như hiện nay. Sự tích lũy một khối lượng kiến thức khổng lồ đã đưa đến nhiều thay đổi căn bản trong tư duy và **phương pháp luận** của Di truyền học nói riêng và Sinh học nói chung.

Di truyền học có nhiều ứng dụng hết sức to lớn cho thực tiễn sản xuất của xã hội loài người như **"cách mạng xanh"** vào những năm 1960 và **"cách mạng công nghệ sinh học"** hiện nay. Các ứng dụng của công nghệ di truyền tạo nên hàng loạt chuyển đổi sâu sắc trong các chiến lược phát triển của y dược học, trồng trọt, chăn nuôi và nhiều lĩnh vực khác. Sự kết hợp kĩ thuật di truyền với các lĩnh vực khoa học hàng đầu như tin học và hóa tổ hợp (combinatorial chemistry) sẽ mở ra triển vọng ứng dụng to lớn đến mức khó lường. Quyền lực cải biến sinh giới và cả bản thân mình của con người chưa bao giờ mạnh như hiện nay. Việc kéo dài tuổi thọ và sự "bất tử" của con người không còn là vấn đề viễn tưởng. Do vậy, các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng nhận được nguồn kinh phí lớn nhất (ví dụ, Mĩ đang chi 3 tỉ USD cho công trình bộ gen người hay sẽ cấp kinh phí 13 tỉ USD cho NIH (National Institute of Health) trong năm 1998).

Bên cạnh những thành tựu to lớn, các thí nghiệm di truyền học đồng thời gây cho nhân loại nhiều nỗi lo âu. Ủy ban

Quốc tế về Đạo lí sinh học của UNESCO kêu gọi “bảo vệ sự toàn vẹn của bộ gen người”.

Trong bối cảnh đó của sự phát triển di truyền học, do các nguyên nhân khách quan và chủ quan, các sách về di truyền học ở nước ta còn quá ít và có khoảng cách khá xa về thông tin so với những thành tựu trên thế giới. Trên cơ sở nguồn thông tin tương đối cập nhật (nhiều sách tham khảo từ những năm 1990 đến 1997), ngoài những kiến thức căn bản có tính chất kinh điển, chúng tôi cố gắng trình bày trong quyển “Di truyền học” này các quan điểm hiện đại, một số kĩ thuật mới, nhiều thành tựu ngoạn mục và triển vọng đầy hứa hẹn của môn học.

Sách được biên soạn vừa là giáo trình, vừa làm tài liệu tham khảo. Do đó, chúng tôi cố gắng theo tinh thần :

Thứ nhất, các kiến thức được trình bày tương đối hệ thống và toàn diện. Thứ hai, giúp người đọc có phương pháp luận đúng về môn học để định hướng tốt cho hoạt động khoa học kĩ thuật. Thứ ba, cập nhật hóa các thông tin để nắm được phân nào các xu hướng phát triển chủ yếu trên thế giới.

Do khả năng có hạn, chúng tôi không tránh khỏi nhiều thiếu sót, rất mong nhận được những ý kiến phê bình và đóng góp của các đồng nghiệp và người đọc để sách ngày càng được hoàn chỉnh hơn. Xin chân thành cảm ơn trước.

PGS-TS PHẠM THÀNH HỒ

Khoa SINH HỌC - ĐẠI HỌC KHTN TPHCM

LƯU Ý : Trong sách, chúng tôi sử dụng các thuật ngữ tiếng Anh, được các nước trên thế giới coi là thuật ngữ quốc tế.

Ví dụ : Theo tiếng Anh, Desoxyribonucleic Acid được gọi tắt là **DNA**, nhưng ta quen gọi **ADN** (Acide desoxyribonucleique - theo tiếng Pháp). Hiện nay trên thế giới, ngay sách tiếng Pháp cũng in là DNA, nên để hòa nhập, chúng tôi dùng DNA và tương tự là RNA chỉ Ribonucleic Acid. Cytosine được viết tắt là C.

Nhiều thuật ngữ quen thuộc được dùng theo tinh thần nêu trên : amino acid, glucose, nucleotide, polypeptide, polymerase,... Riêng thuật ngữ “gen” đã thông dụng ở nước ta nên chúng tôi giữ nguyên, tuy đọc theo tiếng nước ngoài.

PHẦN MỞ ĐẦU

CHƯƠNG I

DI TRUYỀN HỌC - TRUNG TÂM CỦA SINH HỌC

Trước khi tìm hiểu chi tiết cần có *tầm nhìn tổng quan* về ngành học. biết khái quát về những *vấn đề, phạm vi* và *mức độ* nghiên cứu. Ngoài ra, cần nắm vững các *phương pháp* và *sơ lược lịch sử bộ môn* để hướng *tư duy* theo đúng những đặc điểm của môn học. Cuối cùng, để có cái nhìn tổng quan và hài hòa cũng cần phải biết những kiến thức về mối quan hệ với các ngành học khác và với thực tiễn.

Vi sao cần nghiên cứu di truyền học ? Những tiến bộ của tri thức loài người đã dẫn đến sự hình thành và phát triển của *nhiều ngành khoa học* nhằm hiểu biết bản chất của các hiện tượng tự nhiên và xã hội, từ đó tìm ra các ứng dụng phục vụ lợi ích con người. *Di truyền học* là một bộ môn của *Sinh học*, là ngành *khoa học tự nhiên* nghiên cứu thế giới sinh vật, nó có vị trí và vai trò đặc biệt đối với *con người*. Thứ nhất, tính di truyền rất *gắn gũi* nhưng *đầy bí ẩn* đối với con người. Thứ hai, các cơ chế di truyền liên quan và phục vụ trực tiếp cho *con người*. Thứ ba, nó liên quan đến nhiều *cơ chế căn bản* của sự sống. Thứ tư, di truyền học phát triển với *tốc độ rất nhanh*, có *vai trò cách mạng hóa* đối với sinh học nên *luôn mới mẻ* và hứa hẹn có *tiềm đồ rộng lớn* trong tương lai.

Nếu *thế kỉ 21 là thế kỉ của Sinh học*, thì Di truyền học sẽ là một *trọng tâm* của sự phát triển đó. Sự hiểu biết về Di truyền học không những cần thiết cho các nhà sinh học, mà cả những nhà nghiên cứu giáo dục học, triết học, luật học và nhiều lĩnh vực khác.

I. THẾ NÀO LÀ DI TRUYỀN HỌC ?

Di truyền học nghiên cứu hai đặc tính cơ bản của sự sống là *tính di truyền* và *biến dị*, mà thiếu chúng sự sống không thể tồn tại và phát triển đến ngày nay.

1. Sự giống nhau

Tính di truyền biểu hiện ở *sự giống nhau* của các tính trạng giữa thế hệ cha mẹ và hậu thế, cả sự xuất hiện ở con cháu những tính trạng từ tổ tiên xa. Sự giống nhau này dễ nhận thấy và gần gũi với mọi người : một đứa bé mới sinh ra, mọi người đều quan tâm nó giống ai ?

Tuy nhiên, xét từ góc độ khoa học về *sự tinh vi* và *độ chính xác cao* của những điểm giống nhau thì vấn đề này thuộc loại *khó hiểu* nhất. Ví dụ, làm sao để hàng tỉ con người và con cháu đều có con mắt giống nhau ở chỗ có thể phân biệt được khoảng 7 triệu loại màu sắc do sự pha trộn với độ đậm nhạt khác nhau? Tính di truyền có *sự ổn định rất lớn* qua nhiều thế hệ. Cổ sinh học ghi nhận có loài cá sấu hiện nay không khác mấy so với tổ tiên của chúng sống cách nay khoảng 300 triệu năm. Trải qua vô số thế hệ nối tiếp nhau, trong điều kiện môi trường luôn biến đổi, lại phải đấu tranh cho sự sinh tồn mà không có những biến đổi lớn, thật là điều đáng kinh ngạc !

2. Thông tin di truyền và sự phát triển

Chứa và truyền đạt thông tin là tính chất tuyệt diệu nhất của sinh giới, không có ở giới vô sinh nếu thiếu sự chế tạo do con người. Thông tin liên quan đến tất cả các quá trình sống như *sinh trưởng, sinh sản, phát triển, tiến hóa và các phản ứng thích nghi*.

Mọi cấu trúc vật chất đều chứa đựng thông tin phản ánh các đặc tính cấu trúc và chương trình chuyển hóa bản thân nó từ trạng thái này sang trạng thái khác. Cơ thể sống cũng vậy, nhưng có lẽ khả năng chứa đựng và truyền đạt thông tin giữa các thế hệ là một trong những tính chất tuyệt diệu của sự sống. Các tế bào sống có hai dạng thông tin chủ yếu: thông tin di truyền và thông tin thích nghi (ví dụ, hệ thần kinh ghi nhận các tín hiệu khác nhau để có phản ứng đáp lại).

Ở người, tế bào trứng của mẹ kết hợp với tinh trùng của cha tạo ra *hợp tử* là cầu nối giữa hai thế hệ. Hợp tử không trực tiếp mang các đặc tính của cha mẹ mà chứa *chương trình phát triển cá thể* ở dạng *bộ gen*, được gọi là *thông tin di truyền*.

Thông tin di truyền được *mã hóa* ở dạng trình tự thẳng của 4 loại nucleotide của nucleic acid (DNA và RNA). Đơn vị của thông tin di truyền là các *gen*. Mọi *tính trạng* của sinh vật đều chịu sự chi phối của các *gen tương ứng*. Trong khối đa dạng của nhiều tính trạng, các nhà sinh học có thể tách riêng từng đơn vị riêng lẻ để nghiên cứu, đó là đơn vị *gen - tính trạng*.

Thông tin di truyền được *hiện thực hóa* ở thế hệ sau trong quá trình phát triển cá thể. Đây là mặt biểu hiện thứ hai của tính di truyền khó nhận thấy. Mỗi sinh vật trong quá trình lớn lên đều lặp lại chính xác các giai đoạn phát triển như của cha mẹ. Con người bắt đầu từ giai đoạn hợp tử rồi phôi, thai, sinh ra, mọc răng, biết nói, đi,..., trưởng thành, già, chết. Bộ máy di truyền *chi phối mọi biểu hiện sống* : tái tạo các cấu trúc tinh vi, điều hòa việc thực hiện hàng loạt chuỗi phản ứng hóa học phức tạp giúp cơ thể phản ứng và thích nghi với môi trường. Do vậy, truyền đạt các tính trạng đặc trưng của loài qua nhiều thế hệ chỉ là một mặt của tính di truyền, mặt quan trọng hơn, nó là *cơ sở cho mọi biểu hiện sống đặc trưng* ở mỗi sinh vật.

Thông tin di truyền được ghi lại rất *tinh vi* trên phân tử chất di truyền là DNA. Hợp tử của người chứa 6.10^{-12} g DNA (6 phần nghìn tỉ gam). Thật khó hình dung một khối vật chất nhỏ như vậy lại chứa nổi một lượng thông tin cực lớn để điều khiển quá trình từ tế bào hợp tử trải qua quá trình phân chia tạo nên cơ thể con người (gồm khoảng 10^{14} tức trăm nghìn tỉ tế bào) có trí tuệ sáng tạo, mà cuộc sống có thể kéo dài thậm chí cá biệt đến hơn trăm tuổi.

3. Sự liên tục của chất sống

Thông tin di truyền *tinh vi* được truyền đạt cho nhiều thế hệ nối tiếp với *sự ổn định cao* nhờ các cơ chế *sao chép chính xác* và *phân chia đều* cho các tế bào con. Cá thể sinh vật đến lúc nào đó sẽ *chết*, nhưng *thông tin không chết*, vẫn được truyền cho thế hệ sau và có thể *biến đổi tiến hóa*. Nhờ có thông tin nên thế giới sinh vật không những *bất tử* mà còn hoàn thiện không ngừng, dẫn đến *con người trí tuệ* để chuyển sang giai đoạn *tiến hóa xã hội*.

Do sự nối tiếp di truyền mà *sự sống* từ khi xuất hiện cho đến nay là một *dòng liên tục* và các sinh vật trên Quả Đất đều có quan hệ họ hàng, bắt nguồn từ một tổ tiên chung.

4. Biến dị

Biến dị biểu hiện ở sự *sai khác* so với cha mẹ và cả với các cá thể khác cùng đàn. Một mặt, sự biến đổi của bộ máy thông tin di truyền dẫn đến các

biến dị, mặt khác cũng chính các cơ chế di truyền tạo *sự đa dạng* đến mức xét về chi tiết thì không có 2 cá thể nào hoàn toàn giống nhau. Tuy nhiên, biến dị tuy có số lượng rất lớn và hết sức đa dạng nhưng xảy ra trong một *khuôn khổ* nhất định nên mới có thể xếp các sinh vật vào những đơn vị phân loại như loài, giống, họ, bộ,...

Di truyền và biến dị là hai trong ba *nhân tố tiến hóa* theo quan điểm của Darwin. Biến dị tạo *sự đa dạng* cung cấp nguyên liệu cho tiến hóa, di truyền *duy trì* các đặc tính, còn chọn lọc tự nhiên là nhân tố thứ ba *định hướng* phát triển các dạng sinh vật và dẫn đến sự đa dạng của sự sống như ngày nay.

Thông tin thích nghi lúc đầu xuất hiện ở đời sống cá thể tạo ưu thế trong cuộc đấu tranh sinh tồn nên được *chọn lọc tự nhiên* giữ lại và ghi thêm vào thông tin di truyền của sinh vật. Do vậy, thông tin thích nghi cũng chịu *sự chi phối của bộ gen* và được lưu truyền. Trong tiến hóa có sự *thừa kế*. Bộ gen của những sinh vật tiến hóa cao hơn vẫn còn mang nhiều thông tin di truyền của tổ tiên. Điều này thể hiện rõ ở *sự lặp lại ngắn gọn* các giai đoạn của tổ tiên trong phát triển phôi của những sinh vật bậc cao: phôi người lúc đầu giống cá, bò sát, có vú,... Tiến hóa thích nghi đã tạo nên sự đa dạng của các sinh vật như ngày nay từ một tổ tiên ban đầu.

5. "Trái tim" của Sinh học

Di truyền học đi sâu vào các vấn đề cơ bản của *sự tồn tại và lưu truyền sự sống* nên nó giữ một vị trí quan trọng đặc biệt, có người ví "*Di truyền học là trái tim của Sinh học*", vì không ít thì nhiều nó liên quan và chi phối bất kì lĩnh vực nào của sinh học, từ các cơ chế phân tử của sự sống cho đến sự tiến hóa của toàn bộ thế giới sinh vật trên hành tinh của chúng ta.

Trong một thời gian dài trước đây, sinh học sử dụng các phương pháp mô tả đơn giản, nên được coi là *khảo học mô tả*. Thực chất, sự sống là một dạng hoạt động vật chất phức tạp hơn nhiều so với các quá trình vật lý và hóa học. Sự thiếu chính xác của các phương pháp nghiên cứu không phải do tính hỗn độn và không đo được của các quá trình sinh học, mà do *mức phát triển thấp* của các khoa học chính xác và do thiếu sự vận dụng chúng của các nhà sinh học để *phân tích tổng hợp và đồng bộ* đối với sự sống.

Sự xuất hiện khái niệm *gen, nhân tố di truyền* đã cung cấp cho sinh học một đơn vị chính xác không những để quan sát, mà còn nghiên cứu thực nghiệm chi tiết các hiện tượng muôn màu muôn vẻ của sinh giới. Ví dụ, trong số hàng ngàn enzyme của tế bào, các nhà sinh hóa học muốn tách đúng cái cần tìm thì phải dựa vào các đột biến sai hỏng ở chức năng tương ứng.

Dựa vào đơn vị nghiên cứu là gen, cùng những phương pháp nghiên cứu độc đáo mà ngày nay di truyền học là một **khoa học chính xác**, được đánh giá **tương đương với vật lý học** nói chung. Những phát minh lớn với số lượng tăng vọt của di truyền học đã có tác dụng **cách mạng hóa sinh học**, biến sinh học từ mô tả thành thực nghiệm chính xác. Hội nghị Di truyền học thế giới ở Toronto (Canada) năm 1988 đã nêu phương châm **"Di truyền học hòa"** Sinh học.

II. CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN CĂN BẢN CỦA DI TRUYỀN HỌC

1. Giai đoạn trước Mendel

Từ thời xa xưa loài người đã quan tâm đến các hiện tượng di truyền và biến dị. Cách nay 6.000 năm, người Babilon đã tạc trên vách đá những thể hệ nối tiếp của một dòng ngựa (hình 1.1) và đã biết cho thụ phân chéo một số cây trồng.



Hình 1.1. Hình ảnh lai ngựa trên vách đá cách nay 6000 năm

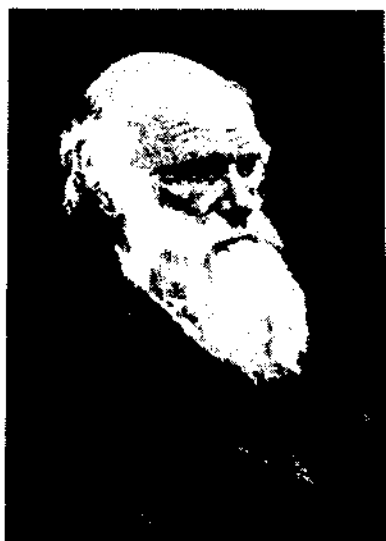
Những phương pháp chọn lọc các giống cây trồng và vật nuôi, thuần hóa và lai giống đã được tất cả các dân tộc cổ xưa áp dụng. Nhưng thời bấy giờ, loài người chưa đủ hiểu biết về các quy luật di truyền đầy bí ẩn nên có rất nhiều quan niệm ngây thơ và sai lầm. Những người Hi Lạp cổ xưa đã có những tưởng tượng như hươu cao cổ sinh ra do lai giữa lạc đà và beo, lạc đà lai với chim sẽ sinh ra đà điểu.

Vấn đề hai **giới tính nam nữ** đối ngược nhau đã thu hút sự chú ý và giải thích của nhiều nhà khoa học từ thời cổ đại. Giải thích của thầy thuốc-nhà thơ Empedocle (490 - 430 tr.CN) là một ví dụ : "nếu mầm sống của cha mẹ đều nóng thì con trai được sinh ra giống cha; nếu mầm sống của cả hai đều lạnh sinh con gái giống mẹ; nếu của cha nóng, của mẹ lạnh thì sinh con trai có mặt giống mẹ; nếu của mẹ nóng, của cha lạnh thì sinh con gái giống cha".

Có chuyện thần thoại cổ Hi Lạp cho rằng, nam giới hoàn thiện hơn liên quan với bên phải cơ thể, còn nữ giới kém hơn với bên trái. Theo Y học cổ Ấn Độ, con trai phát triển ở bên phải tử cung, còn con gái – ở bên trái.

Ngay từ thế kỉ V trước CN, hai luận thuyết đã được nêu ra : sự *di truyền trực tiếp* và *gián tiếp* của các tính trạng. Hippocrate theo thuyết di truyền trực tiếp cho rằng, vật liệu sinh sản được thu thập từ tất cả các phần của cơ thể và như vậy tất cả các cơ quan có ảnh hưởng gián tiếp đến con cháu. Về sau, Aristotle (thế kỉ IV trước CN) theo thuyết di truyền gián tiếp, bài bác quan điểm của Hippocrate, cho rằng vật liệu sinh sản được tạo ra từ chất dinh dưỡng, mà về bản chất đã tiền định cho cấu tạo các phần khác nhau của cơ thể.

Vào thế kỉ 19, nhờ sự phát triển mạnh mẽ của sinh vật học, các *phương pháp lai giống* đã được sử dụng ở thực vật và động vật. Các nhà sinh vật học cũng đã hiểu được rằng cả hai cha mẹ đều có góp phần vào các tính trạng của hậu thế. Tuy nhiên quan niệm phổ biến thời này là sự *di truyền hòa hợp* (blending), tức các tính trạng của cha và mẹ trộn lẫn nhau tạo nên các tính trạng trung gian ở con cái, như lai cây hoa đỏ với hoa trắng sẽ tạo các con lai có hoa hồng. Lamarck chú ý nhiều đến vai trò ngoại cảnh, nêu quan niệm về sự *di truyền tập nhiễm*, tức các biến đổi do luyện tập và nhiễm trong đời sống cũng được di truyền.



Hình 1.2. C.Darwin

Thuyết di truyền gián tiếp đã tồn tại 23 thế kỉ. Darwin, (1809 - 1882 – hình 1.2) chịu ảnh hưởng quan niệm này, đã phát triển *thuyết pangen* (Pangenesis) trong tác phẩm “Sự biến đổi của các động vật và thực vật trong nuôi trồng” (1868).

Theo ông, mỗi phần của cơ thể sinh sản ra những phần tử nhỏ là *gemmule (mầm)* theo máu từ các phần cơ thể tập trung về cơ quan sinh dục. Mỗi cá thể sinh ra do sự *hòa hợp* tính di truyền của cả cha lẫn mẹ, hơn thế nữa gồm cả các tính tập nhiễm.

Ngay vào năm 1871, F. Galton đã tiến hành thực nghiệm kiểm tra thuyết pangen của Darwin. Galton đã truyền máu thỏ đen cho thỏ trắng, sau

đó lai những con được truyền máu với nhau. Thí nghiệm lặp lại qua 3 thế hệ và không tìm thấy ảnh hưởng gì đối với thỏ trắng. Như vậy, ít nhất máu thỏ không chứa gemmule.

Đến cuối thế kỉ 19 giới khoa học vẫn chưa có quan niệm đúng đắn về tính di truyền. Darwin – nhà sinh học lớn nhất thời đó nhiều lần nhấn mạnh rằng: “về các quy luật di truyền và biến dị chúng ta hãy còn biết quá ít”. Tiếc rằng, năm 1866 Gr. Mendel đã công bố tác phẩm “Các thí nghiệm lai ở thực vật”, nhưng Darwin chưa biết đến.

2. Giai đoạn di truyền Mendel

Gr. Mendel (hình 1.3) là *người đầu tiên* phát hiện các quy luật di truyền. Kết quả nghiên cứu của ông được trình bày trước “Hội các nhà tự nhiên học của thành phố Brno” trong hai buổi họp ngày 8 tháng 2 và 8 tháng 3 năm 1865. Cả hai báo cáo được công bố ở dạng một bài dài 44 trang “*Các thí nghiệm lai ở thực vật*” (Versuche uber Pflanzen-Hibriden) trong “Kì yếu của hội” năm 1866.

Mendel đã chứng minh sự di truyền các tính trạng có tính gián đoạn được chi phối bởi các *nhân tố (element) di truyền* mà sau này gọi là các *gen*. Phát minh này đặt nền móng cho di truyền học. Ngày nay công lao của ông ví như công lao của *Newton đối với vật lí học*.

Tuy nhiên phát minh của Mendel chưa được công nhận trong 35 năm. Có quan niệm sai lầm rằng công trình của Mendel bị lãng quên. Thực tế cho thấy phát minh của ông *đi trước thời đại*. Từ năm 1865 đến 1900, công trình của Mendel được trích dẫn ít nhất 6 lần, cả ở bách khoa toàn thư của nước Anh trong mục về “sự lai giống”.

Những người đương thời không hiểu được phát minh vĩ đại đó, do sinh học lúc đó chưa đủ tri thức để tiếp nhận. Những phát minh tế bào học vào nửa cuối thế kỉ 19 đã tạo cơ sở tri thức hiểu được công trình của Mendel (bảng 1.1).

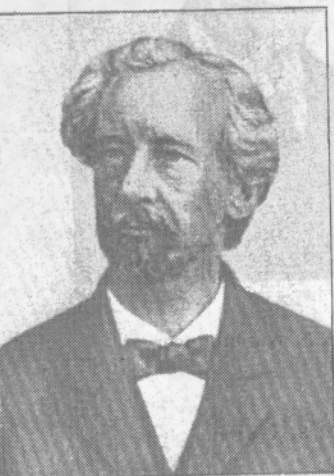


Hình 1.3. Gr. Mendel

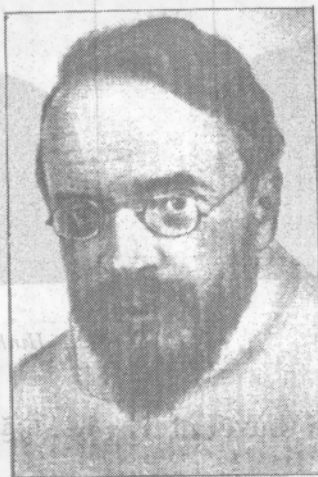
BẢNG 1.1. Những phát minh tế bào học cuối thế kỉ 19

Các năm	Sự kiện	Tác giả
1838-1839	Học thuyết tế bào	T.Schwann M.Schleiden
1865	Các thí nghiệm lai ở thực vật	G.Mendel
1870	Mô tả nguyên phân ở thực vật	E.Strasburger
1875	Mô tả nguyên phân ở động vật	E.van Beneden
	Mô tả sự hợp nhân khi thụ tinh :	
1879-1882	– ở động vật	V. Flemming
1883-1884	– ở thực vật	O.Hertving N.N.Gorojankin E.Strasburger
1883-1884	Thuyết di truyền nhân tế bào	B.Roux E.Strasburger O.Hertving
1883	Thuật ngữ “nhiễm sắc thể” ra đời	V.Valdeier
1884-1887	Phát hiện “sự phân li” của nhiễm sắc thể	L.Geizer L.Giniar E.van Beneden
1885	Số lượng ổn định của nhiễm sắc thể	K.Rable
1887	Mô tả giảm phân	V.Flemming E.van Beneden
1900	Phát minh lại các quy luật Mendel	H. de Vries E.K.Correns E.Tschermak

Mãi đến năm 1900, Hugo Marie de Vries (Hà Lan – hình 1.4), Erich Karl Correns (Đức - hình 1.5) và E.Von Tschermak (Áo – hình 1.6) độc lập với nhau, đã một lần nữa **phát hiện lại** các quy luật Mendel.



Hình 1.4. H. de Vries



Hình 1.5. E.K. Correns



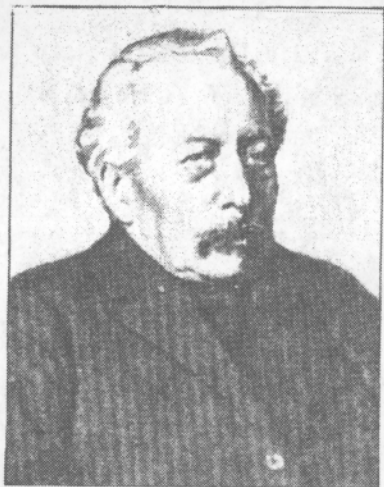
Hình 1.6. E. Tschermak

Năm 1900 được coi là năm khai sinh và thế kỉ 20 là thế kỉ phát triển của di truyền học. Năm 1902, W. Bateson và L. Cuénot chứng minh các quy luật Mendel ở động vật. Trong những năm này, các hiện tượng tương tác gen cũng đã được phát hiện.

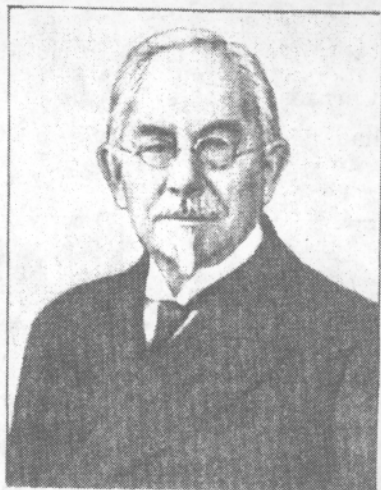
Thời kì này các quan điểm đầu tiên về **sự di truyền của nhiễm sắc thể** đã được nêu ra. T. Boveri chứng minh vai trò của nhân và W. Sutton gắn các nhân tố Mendel với nhiễm sắc thể (1903). Đặc biệt, A. Weismann (1834-1914), nhà sinh học Đức nổi tiếng dựa trên suy diễn đã nêu **thuyết di truyền nhiễm sắc thể**.

Ngay năm 1901, Hugo de Vries đã nêu ra **thuyết đột biến**.

Tên gọi môn **Di truyền học (Genetics)** – từ chữ la tinh *Genetikos*, liên quan đến **nguồn gốc, sinh sản**) do nhà di truyền học Anh W. Bateson (hình 1.7) nêu ra vào năm 1906. Vào năm 1909, nhà khoa học Đan Mạch W. Johansen (hình 1.8) nêu ra các thuật ngữ quan trọng như **Gen** (từ chữ Hi Lạp *genes* – dòng giống, sinh sản, bắt nguồn), **kiểu gen** (genotype) và **kiểu hình** (phenotype).



Hình 1.7. W.Bateson



Hình 1.8. W.Johannsen

3. Sự phát triển của thuyết di truyền nhiễm sắc thể

Sự kết hợp chặt chẽ giữa di truyền học và tế bào học đã tạo nên bước phát triển vững chắc tiếp theo của di truyền học.

Từ năm 1911, T.H.Morgan (1866-1945) cùng 3 cộng sự là A.Sturtevant, C.Bridges và H.J.Muller đã tiến hành thí nghiệm trên đối tượng mô hình mới là ruồi giấm *Drosophila melanogaster* xây dựng nên **thuyết di truyền nhiễm sắc thể**. Các kết quả của phòng thí nghiệm “ruồi” này chứng minh các gen nằm trên nhiễm sắc thể, xếp theo đường thẳng, tạo thành nhóm liên kết gen. **Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể** đã được xây dựng.

Năm 1920, N.I.Vavilov, nhà di truyền học Xô viết nêu ra quy luật về “các dãy tương đồng trong biến dị di truyền” và sau này nêu ra thuyết về **các trung tâm giống cây trồng trên thế giới**.

Năm 1925-1927 tác động **gây đột biến** của tia X được chứng minh (Muller, 1927), đặt cơ sở cho các nghiên cứu đột biến nhân tạo.

Năm 1933, T.Painter phát hiện **nhiễm sắc thể khổng lồ** ở côn trùng 2 cánh (*Diptere*) đặt cơ sở cho các nghiên cứu đột biến nhiễm sắc thể và lập bản đồ di truyền tế bào.

Vào năm 1941, G.Beadle và E.Tatum nêu ra **thuyết 1 gen - 1 enzyme** chứng minh **gen kiểm tra các phản ứng sinh hóa**. Cho đến lúc này, di truyền học vẫn chỉ được coi là “**hình thức**” (formal genetics) vì chỉ dựa vào kết quả lai mà suy đoán về các gen. Quá trình từ gen đến tính trạng như thế nào chưa biết. Sự kết hợp giữa di truyền học với sinh hóa học thực hiện trên đối

tượng vi sinh vật là mốc vàng bánh mì *Neurospora crassa* đã tạo nên bước phát triển mới đi vào chi tiết hoạt động của gen.

Trong những năm 40, bà Mc Clintock, nhà di truyền học nổi tiếng của Mỹ đã phát hiện các **gen di chuyển** dọc trên nhiễm sắc thể, gọi là “các phần tử kiểm soát” (“controlling elements”) mà sau này gọi là các **phần tử di động** (transposable elements). Bà nhận giải Nobel năm 1983 ở tuổi 80.

Thời kì cho đến cuối những năm 40 được coi là **hình diễn** của di truyền học vì những nguyên lí căn bản đã được tìm ra. Lịch sử di truyền học gắn chặt với sự phát triển và cụ thể hóa khái niệm về gen, cùng sự biểu hiện của chúng.

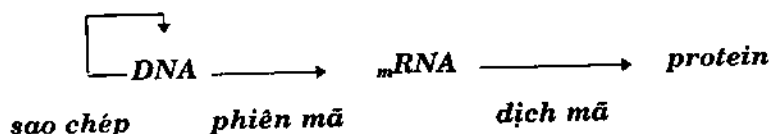
4. Sự phát triển của di truyền học phân tử

Sau chiến tranh thế giới thứ hai, các nghiên cứu sinh học phát triển rất mạnh dẫn đến những phát minh lớn. Đặc biệt vào thời gian này, nhiều nhà vật lí học chuyển sang nghiên cứu sinh học, chủ yếu là di truyền học nhằm tìm ra những quy luật vật lí mới. F.Crick là một ví dụ. Những người này đem **tư duy chính xác** của vật lí học thêm vào cho di truyền học.

Năm 1944, O.Avery, McLeod và McCarty thực hiện biến nạp, chứng minh trực tiếp **DNA là chất di truyền**. Nhưng mãi đến năm 1952 vai trò di truyền của DNA mới được xác nhận.

Năm 1953, **mô hình cấu trúc DNA** của Watson-Crick ra đời, được coi là **phát minh lớn nhất của thế kỉ**, tạo ra bước ngoặt mới cho di truyền học và sinh học nói chung. Các thí nghiệm nghiên cứu di truyền học có thể tiến hành trong ống nghiệm (*in vitro*).

Học thuyết trung tâm (central dogma) của sinh học phân tử ra đời :



Năm 1961, M.Nirenberg và J.Matthei tìm ra bộ mã di truyền đầu tiên. Đến giữa những năm 60, toàn bộ 64 codon (bộ ba mã) đã được xác định (nhóm của Nirenberg và nhóm của H.Khorana).

Năm 1961, F.Jacob, J.Monod tìm ra cơ chế di truyền điều hòa tổng hợp protein.

5. Giai đoạn từ khi kĩ thuật di truyền ra đời đến nay

Từ đầu những năm 70, *kĩ thuật di truyền* (gentech) ra đời tạo nên cuộc *cách mạng mới* trong di truyền học và cả sinh học. Sự hiểu biết về gen đạt tới từng nucleotide. Qua 25 năm phát triển, nó được đánh giá là có tầm quan trọng tương tự phát minh ra kính hiển vi.

Việc xác định trình tự các nucleotide của gen đã nhanh chóng dẫn đến kĩ thuật mới : *gây đột biến định hướng* (site-directed mutagenesis), cho phép tạo các biến đổi tùy ý trên gen như thay thế nucleotide này bằng nucleotide khác hay cắt ngắn hoặc nối dài gen ở những điểm định sẵn. Các biến đổi định hướng này trên gen đưa đến những thay đổi thành phần amino acid tương ứng trên phân tử protein. Kĩ thuật này thúc đẩy sự phát triển của *công nghệ protein* (protein engineering).

Vào đầu những năm 1990, sự kết hợp giữa sinh học và tin học đưa đến một phương pháp mới là nghiên cứu *in silico* (nghiên cứu sinh học trên máy điện toán).

Kĩ thuật di truyền kéo theo sự "bùng nổ" của *công nghệ sinh học* (biotechnology) và đã có nhiều ứng dụng to lớn ví tương tự sự kiện phát minh ra phản ứng hạt nhân. Ngoài mặt tích cực, nó cũng rất "*đáng sợ*".

III. CÁC NGUYÊN TẮC NGHIÊN CỨU SINH HỌC

Di truyền học là một *bộ môn* của Sinh học, nên các nghiên cứu của nó phải tuân thủ những nguyên tắc chung của Sinh học.

1. Nguyên tắc thứ nhất : Các kiến thức sinh học phải nằm trong *hệ thống các kiến thức về sự tiến hóa* của thế giới sinh vật. Con số các đối tượng sinh vật được dùng trong nghiên cứu rất nhỏ so với khối đa dạng to lớn trong thiên nhiên. Tuy nhiên, đó là những *đối tượng tiêu biểu*, các kết quả thu từ chúng có thể suy ra được cho từng nhóm hay cả thế giới sinh vật. Ví dụ, ruồi giấm là đối tượng mô hình nghiên cứu các quy luật di truyền. Các kết quả nghiên cứu thu được đều có thể *so sánh, đối chiếu* với những hiện tượng tương ứng ở những sinh vật bậc thấp hoặc cao hơn trên thang tiến hóa. Những so sánh đối chiếu sẽ giúp hiểu sâu vấn đề, nhìn rõ sự phát triển từ thấp lên cao, từ đơn giản đến phức tạp. Quan điểm tiến hóa sẽ giúp việc thu nhận kiến thức sinh học một cách có *hệ thống*. Từ những kiến thức tổng quát có thể suy đoán về những hiện tượng sẽ xảy ra ở từng nhóm sinh vật.

2. Nguyên tắc thứ hai : *Tế bào là đơn vị* nghiên cứu của sinh học.

3. Nguyên tắc thứ ba : Sự tương quan *thống nhất giữa cấu trúc và chức năng* biểu hiện ở tất cả các mức tổ chức khác nhau. Để hiểu rõ chức năng nào đó, cần biết chi tiết nó được thực hiện do cấu trúc nào. Ngược lại biết rõ chức năng có thể suy ra cấu trúc.

4. Nguyên tắc thứ tư : Tất cả các sinh vật đều có thành phần cấu tạo vật lí và hóa học như giới vô sinh và toàn bộ các quá trình sống đều *tuân theo các quy luật vật lí và hóa học*.

5. Nguyên tắc thứ năm : Các sinh vật phải *thu nhận năng lượng* và vật liệu để duy trì cấu trúc đặc thù, rồi thải phế phẩm ra ngoài.

6. Nguyên tắc thứ sáu : *Bộ gen chứa thông tin di truyền* chi phối mọi biểu hiện sống. Các nghiên cứu sinh học đạt đến tận gốc khi hiểu biết về hoạt động của các gen.

7. Nguyên tắc thứ bảy : Nghiên cứu sinh học phải đặt trong *tiến trình của sự phát triển cá thể*. Hoạt động sống diễn ra liên tục và cơ thể sinh vật đổi mới thường xuyên. Hoạt động sống của cơ thể trẻ khác với già. Khi tìm hiểu các quá trình sinh học phải biết nó nằm trong giai đoạn nào của sự phát triển.

8. Nguyên tắc thứ tám : Sự phổ biến của các *cơ chế phản hồi*. Các sinh vật thường xuyên thu nhận nhiều tín hiệu thông tin, chúng xử lí và có phản ứng đáp lại. Một dạng của biểu hiện này là *mối liên hệ ngược* (feed-back): khi một chất được tổng hợp dư thừa, nó sẽ ức chế các enzyme đầu chuỗi phản ứng tổng hợp ra nó dừng lại.

9. Nguyên tắc thứ chín : *Sự thừa kế* của các quá trình sinh học. Nguyên tắc này nằm trong hệ thống các kiến thức về tiến hóa.

Các nghiên cứu di truyền học đều có liên quan ít nhiều đến các nguyên tắc trên, nguyên tắc 6 và 7 là đặc thù của di truyền học.

IV. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN HỌC

Nhiều phương pháp nghiên cứu của sinh học, vật lí học và hóa học được sử dụng để đi sâu vào các cơ chế di truyền. Ngoài ra, di truyền học có các phương pháp nghiên cứu đặc thù và thông dụng riêng.

1. Phương pháp lai

Đây là phương pháp *đặc thù* của di truyền học. Phương pháp lai giữa các cá thể và theo dõi sự phân li qua nhiều thế hệ nối tiếp nhau do Gr. Mendel nêu ra. Phương pháp này thường kết hợp với việc thu nhận các dạng đột biến khác nhau. Phương pháp lai về sau này được sử dụng cả ở vi khuẩn và virus.

Theo dõi *phả hệ* là một biến dạng của phương pháp lai.

Phương pháp lai xa được sử dụng nhằm xác định mối quan hệ họ hàng giữa các loài và các giống.

Sau này, phương pháp lai giữa các tế bào sinh dưỡng (soma) được thực hiện phổ biến ở động và thực vật.

2. Phương pháp toán học

Nhờ Mendel sử dụng phương pháp *tính số lượng* để đánh giá kết quả lai, nên ngay từ khi ra đời di truyền học đã trở thành khoa học chính xác. Từ đó đến nay, sự đối chiếu các kết quả thực nghiệm với dự đoán lí thuyết là phần không thể thiếu được trong phân tích di truyền. Đây là phương pháp không thay thế được trong nghiên cứu di truyền số lượng và thường biến.

3. Phương pháp tế bào học

Phương pháp lai kết hợp với *quan sát nhiễm sắc thể* là cơ sở của di truyền tế bào. Sự kết hợp giữa di truyền học và tế bào học đã nâng di truyền học lên bước phát triển mới.

4. Kỹ thuật di truyền

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA là thành tựu của di truyền học, đồng thời nó trở thành *công cụ* quan trọng không những góp phần đi sâu vào các cơ chế di truyền, mà cả nhiều quá trình sinh học rất khó nghiên cứu trước đây. Phương pháp này có vai trò *cách mạng hóa* đối với sinh học nói chung. Nhờ phương pháp này, di truyền học nghiên cứu các gen đến từng nucleotide.

Cùng với sự phát triển chung của khoa học, các phương pháp mới được ứng dụng nhiều hơn và nhanh hơn trong di truyền học.

V. TẾ BÀO

1. Tế bào là đơn vị cơ sở của sinh giới

Học thuyết tế bào (Cell theory) tức quan niệm cho rằng tất cả các sinh vật được **cấu tạo từ các tế bào** do nhà thực vật học **J. Schleiden** công bố vào năm 1838 và nhà động vật học **T. Schwann** công bố năm 1839 ở Đức. Năm 1858, **R. Virchow** (người Đức) phát triển thêm rằng tất cả các **tế bào đều bắt nguồn từ những tế bào** sống trước nó (*omnis cellula ex cellula*) và không có sự hình thành tế bào ngẫu nhiên từ chất vô sinh.

Năm 1862, nhà bác học Pháp L. Pasteur chứng minh chắc chắn rằng **sự sống không tự ngẫu sinh**.

Ngày nay, học thuyết tế bào hiện đại khẳng định rằng **“Tất cả các sinh vật đều cấu tạo nên từ tế bào và các sản phẩm của tế bào, những tế bào mới được tạo nên từ sự phân chia của những tế bào trước nó, có sự giống nhau căn bản về thành phần hóa học và các hoạt tính trao đổi chất giữa tất cả các loại tế bào và hoạt động của cơ thể là sự tích hợp hoạt tính của các đơn vị tế bào độc lập”**.

Sinh giới có nhiều mức độ tổ chức khác nhau. Tế bào là cấu trúc nhỏ nhất có biểu hiện đầy đủ các tính chất của sự sống. **Tế bào** quan trọng đối với sinh học như **phân tử** đối với hóa học.

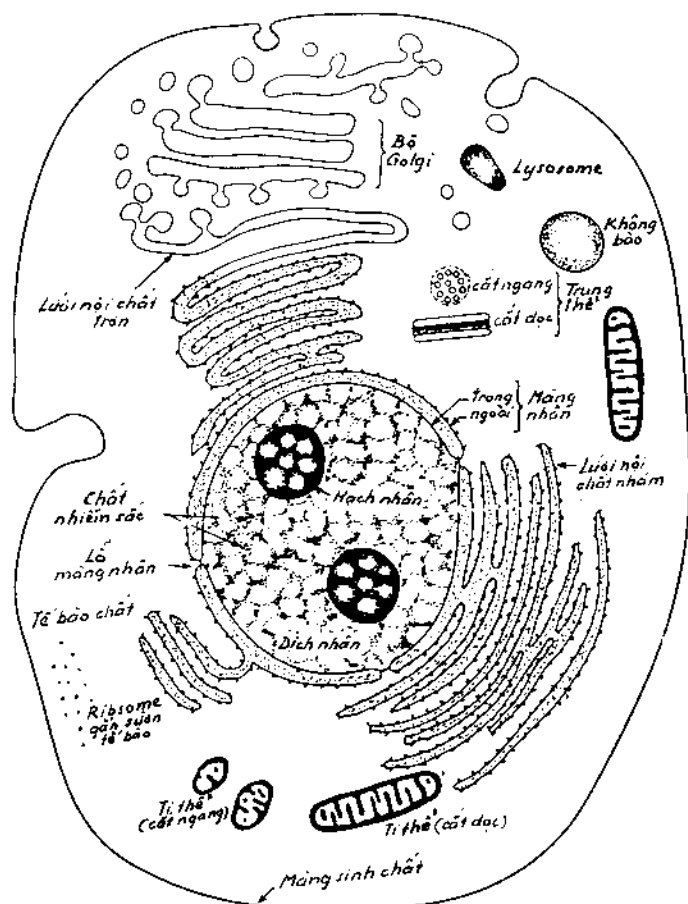
Các sinh vật có cấu trúc hóa học rất phức tạp. Tuy nhiên, chỉ các chất hóa học phức tạp chưa đủ để có hoạt động sống, chúng phải được tổ chức lại trong các **phức hệ phân tử** của **những bào quan** với những **chức năng chuyên biệt** khác nhau để hình thành tế bào là **đơn vị cơ sở của sự sống**. Các đặc tính của sự sống chỉ biểu hiện **thống nhất, đồng bộ, hài hòa, đầy đủ ở mức tế bào và cao hơn**. Việc hiểu rõ **cấu trúc của tế bào** là cơ sở để nắm vững các **cơ nguyên căn bản của sự sống**.

Di truyền là một đặc tính của tế bào, liên quan chặt chẽ với các **cấu trúc** phức tạp, nhờ **nguồn năng lượng** và sự **sinh sản** của tế bào. Tính di truyền có **biểu hiện trọn vẹn** chỉ ở mức tế bào. Ngược lại, nhờ có tính di truyền mà hệ thống cấu trúc tinh vi và sự biến đổi năng lượng phức tạp của **tế bào được tái tạo**.

2. Tế bào Prokaryotae và tế bào Eukaryotae

Các tế bào nhỏ bé của những sinh vật ở mức tiến hóa thấp như **vi khuẩn (Bacteria)** và **vi khuẩn lam (Cyanobacteria)** chưa có nhân hoàn chỉnh nên gọi là **tế bào tiến nhân** và những sinh vật này được gọi là những sinh vật tiến nhân (**Prokaryotae**). Các tế bào có nhân hình thành rõ ràng được gọi là **tế bào nhân thực** (còn gọi là nhân chuẩn). Các tế bào nhân thực có ở

các sinh vật nhân thực (Eukaryotae). Sự khác nhau giữa tế bào *Prokaryotae* và *Eukaryotae* lớn hơn sự khác nhau giữa tế bào động vật và thực vật.



Hình 1.9. Tế bào động vật điển hình

Các tế bào *Prokaryotae* không có phần lớn các bào quan và màng nhân, có vùng tương tự nhân gọi là **nucleoid**. Ngoài ra, bộ gen gồm DNA không kèm protein histone.

Thực tế cho thấy khó biểu thị một tế bào nào đại diện chung cho tất cả nhóm *Eukaryotae*. Để có khái niệm cụ thể về tế bào, người ta mô tả tế bào “điển hình” làm đại diện, như tế bào động vật trên đây (hình 1.9).

Điểm nổi bật để phân biệt tế bào *Eukaryotae* là **có nhân** (nucleus) **điển hình** với **màng nhân** bao quanh. Bên trong tế bào có **hệ thống màng phức tạp** và các bào quan như **lưới nội chất**, **bộ Golgi**, **lysosome**, **ti thể**, **lục lạp**. Nhiễm sắc thể của *Eukaryotae* thẳng, phức tạp được cấu tạo từ DNA, RNA và protein.

Phát hiện sự khác nhau lớn giữa *Prokaryotae* và *Eukaryotae* là thành tựu lớn của Sinh học phân tử. Sự khác nhau thể hiện rõ, xuyên suốt ở hàng loạt cơ chế di truyền.

3. Các cấu trúc có khả năng tự tái sinh

Các tế bào *Prokaryotae* có vùng nhân gọi là **nucleoid** chứa DNA, được tái tạo và phân đều về các tế bào con khi sinh sản. Các tế bào *Eukaryotae* có nhiều bào quan, nhưng chỉ có **nhân**, **ti thể** và **lục lạp** có chứa DNA và nhờ khả năng tự tái sinh nên tham gia vào các cơ chế di truyền.

Nhân chứa thông tin di truyền, giữ vai trò chủ yếu trong sinh sản, chiếm khoảng 10% thể tích và hầu như toàn bộ DNA của tế bào (95%). Nó được giới hạn bởi **màng nhân** do hai lớp màng xếp đồng tâm, bên trong có hai cấu trúc chủ yếu là **hạch nhân** (nucleolus) như một nhân nhỏ trong nhân và **chất nhiễm sắc** (chromatin) là dạng tháo xoắn của **nhễm sắc thể** (chromosome).

Sự phân chia đều của nhiễm sắc thể về các tế bào con đảm bảo sự chia đều thông tin di truyền cho thế hệ sau. Có định nghĩa rằng : **“Sự sống - đó là sự duy trì và tái tạo tích cực cấu trúc đặc thù kèm theo tiêu tốn năng lượng”**. Có người coi điều này là **“Tiên đề thứ nhất của sự sống”**.

VI. GEN VÀ CƠ THỂ

Mỗi sinh vật có hoạt động sống trong môi trường ở mức cơ thể. Các sinh vật đơn bào có cơ thể là một tế bào. Cơ thể sinh vật đa bào gồm nhiều tế bào có sự **biệt hóa chức năng**, nhưng toàn bộ chúng phối hợp với nhau hài hòa thành một **thể thống nhất** trong mối quan hệ với môi trường trong và ngoài. Hoạt động của gen trong cơ thể thống nhất là vấn đề phức tạp cần tính đến.

1. Kiểu gen và kiểu hình

Ở người, hợp tử sau khoảng hơn 50 lần phân chia nguyên phân tạo nên cơ thể trưởng thành với hơn 200 loại tế bào khác nhau. Nguyên phân tạo ra các tế bào có bộ gen giống nhau, nhưng chúng lại biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau. Như vậy, giữa đầu vào là các gen và đầu ra của sự phát triển có khác nhau. Ngay thời Mendel, ông đã nhận thấy sự khác nhau giữa nhân tố di truyền và sự biểu hiện của chúng, mà sau này gọi là kiểu gen và kiểu hình.

Phát hiện sự khác nhau lớn giữa *Prokaryotae* và *Eukaryotae* là thành tựu lớn của Sinh học phân tử. Sự khác nhau thể hiện rõ, xuyên suốt ở hàng loạt cơ chế di truyền.

3. Các cấu trúc có khả năng tự tái sinh

Các tế bào *Prokaryotae* có vùng nhân gọi là **nucleoid** chứa DNA, được tái tạo và phân đều về các tế bào con khi sinh sản. Các tế bào *Eukaryotae* có nhiều bào quan, nhưng chỉ có **nhân**, **ti thể** và **lục lạp** có chứa DNA và nhờ khả năng tự tái sinh nên tham gia vào các cơ chế di truyền.

Nhân chứa thông tin di truyền, giữ vai trò chủ yếu trong sinh sản, chiếm khoảng 10% thể tích và hầu như toàn bộ DNA của tế bào (95%). Nó được giới hạn bởi **màng nhân** do hai lớp màng xếp đồng tâm, bên trong có hai cấu trúc chủ yếu là **hạch nhân** (nucleolus) như một nhân nhỏ trong nhân và **chất nhiễm sắc** (chromatin) là dạng tháo xoắn của **nhễm sắc thể** (chromosome).

Sự phân chia đều của nhiễm sắc thể về các tế bào con đảm bảo sự chia đều thông tin di truyền cho thế hệ sau. Có định nghĩa rằng : “**Sự sống - đó là sự duy trì và tái tạo tích cực cấu trúc đặc thù kèm theo tiêu tốn năng lượng**”. Có người coi điều này là “**Tiên đề thứ nhất của sự sống**”.

VI. GEN VÀ CƠ THỂ

Mỗi sinh vật có hoạt động sống trong môi trường ở mức cơ thể. Các sinh vật đơn bào có cơ thể là một tế bào. Cơ thể sinh vật đa bào gồm nhiều tế bào có sự **biệt hóa chức năng**, nhưng toàn bộ chúng phối hợp với nhau hài hòa thành một **thể thống nhất** trong mối quan hệ với môi trường trong và ngoài. Hoạt động của gen trong cơ thể thống nhất là vấn đề phức tạp cần tính đến.

1. Kiểu gen và kiểu hình

Ở người, hợp tử sau khoảng hơn 50 lần phân chia nguyên phân tạo nên cơ thể trưởng thành với hơn 200 loại tế bào khác nhau. Nguyên phân tạo ra các tế bào có bộ gen giống nhau, nhưng chúng lại biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau. Như vậy, giữa đầu vào là các gen và đầu ra của sự phát triển có khác nhau. Ngay thời Mendel, ông đã nhận thấy sự khác nhau giữa nhân tố di truyền và sự biểu hiện của chúng, mà sau này gọi là kiểu gen và kiểu hình.

Kiểu gen là tập hợp các nhân tố di truyền của cơ thể. Kiểu hình là biểu hiện của kiểu gen qua tương tác với môi trường. **Kiểu hình** thể hiện ở tập hợp nhiều tính trạng hình thái, sinh lí, tập tính và quan hệ sinh môi. Kiểu gen có tiềm năng lớn hơn những cái biểu hiện trong sự phát triển. Mỗi sinh vật có một kiểu gen và một kiểu hình. Điều này chung cho cả sinh giới và được coi như **"Tiên đề thứ hai của sự sống"**.

Một kiểu gen có thể tạo các kiểu hình khác nhau do điều kiện môi trường, ngược lại kiểu hình giống nhau có thể từ các kiểu gen khác nhau. Cái khó của phân tích di truyền là từ kiểu hình xác định đúng kiểu gen.

2. Phạm vi phản ứng

Dưới tác động của các yếu tố môi trường, tác động của gen có thể bị dao động. Nhưng mức độ biến đổi xảy ra trong giới hạn nhất định gọi là **phạm vi phản ứng**. Thường biến là một dạng biến dị không di truyền rất phổ biến, như trong chăn nuôi có thức ăn dư thừa con vật to béo, thiếu thì gầy còi. Tuy nhiên, heo "mọi" dù thức ăn dư thừa cũng không lớn bằng heo giống nhập nội. Phạm vi phản ứng cũng do **kiểu gen xác định**. Thông thường các giống vật nuôi và cây trồng có mức phản ứng quy định giới hạn của năng suất. Muốn vượt giới hạn năng suất cũ phải tạo giống mới. Các tính trạng tập nhiễm chỉ có ở mức cá thể và không di truyền.

3. Chuỗi sự kiện phức tạp từ các biến đổi di truyền

Các phản ứng sinh hóa trong cơ thể thực hiện theo dây chuyền, mà mỗi phản ứng do gen tương ứng xác định. Sự sai hỏng ở một gen có thể dẫn đến nhiều hậu quả khác nhau. Ví dụ, ở bệnh hồng cầu hình liềm, sai hỏng trên gen gây ra hàng loạt sự kiện như: biến đổi trên DNA → hemoglobine S (thay cho hemoglobine A bình thường) → hồng cầu hình liềm (chức năng vận chuyển O₂ kém) → ba hậu quả khác nhau:

- hồng cầu nhanh chóng bị phá hủy → thiếu máu, tim yếu, sức yếu, trí não suy.
- rối loạn tuần hoàn → thương tổn não (lâm liệt), thương tổn các cơ quan khác (sưng phổi, thấp khớp, suy thận).
- tích tụ hồng cầu hình liềm ở lá lách → thương tổn lá lách.

Nhiều hậu quả khác nhau đó sẽ gây khó khăn cho phân tích di truyền. Ngược lại, khi biết được chính xác biến đổi trên gen thì vấn đề sẽ được hiểu tận gốc.

VII. QUAN HỆ VỚI CÁC KHOA HỌC KHÁC VÀ VỚI THỰC TIỄN

Di truyền học không những là trung tâm của sinh học, mà còn có quan hệ với nhiều ngành khoa học tự nhiên và xã hội khác, góp phần rất lớn cho hoạt động thực tiễn của xã hội loài người. Kỹ thuật di truyền ra đời tạo sự bùng nổ của *công nghệ sinh học mới (new biotech)* mở ra triển vọng vô cùng to lớn để hiểu biết và cải tạo thế giới sinh vật đến nỗi một số người coi đó là “*quyền lực ghê gớm nhất mà con người dành được kể từ sau thành tựu phân hạch nguyên tử*” hay “*bà hoàng của thế kỉ 21*”.

1. Di truyền học và chọn giống

Di truyền học là *cơ sở khoa học* của chọn giống. Các thành tựu của di truyền học được ứng dụng sớm, nhanh và nhiều hơn cả cho đến nay là trong chọn giống. Kiến thức di truyền học là cơ sở để xây dựng các phương pháp *lai tạo* và *cải thiện giống*, phương pháp *chọn lọc*, tạo *vật liệu ban đầu*,... Đơn cử vài ví dụ về ứng dụng di truyền học vào chọn giống.

Ứng dụng *ưu thế lai* (heterosis) vào chọn giống bắp ở Mỹ đem lại lợi nhuận dư bù đắp chi phí trong thế chiến II. Thị trường giống cây trồng lai trên thế giới khoảng hơn 50 tỉ USD mỗi năm. “*Cách mạng xanh*” làm tăng vọt sản lượng lúa mì, lúa nước nhờ sử dụng các dạng đột biến thân lùn.

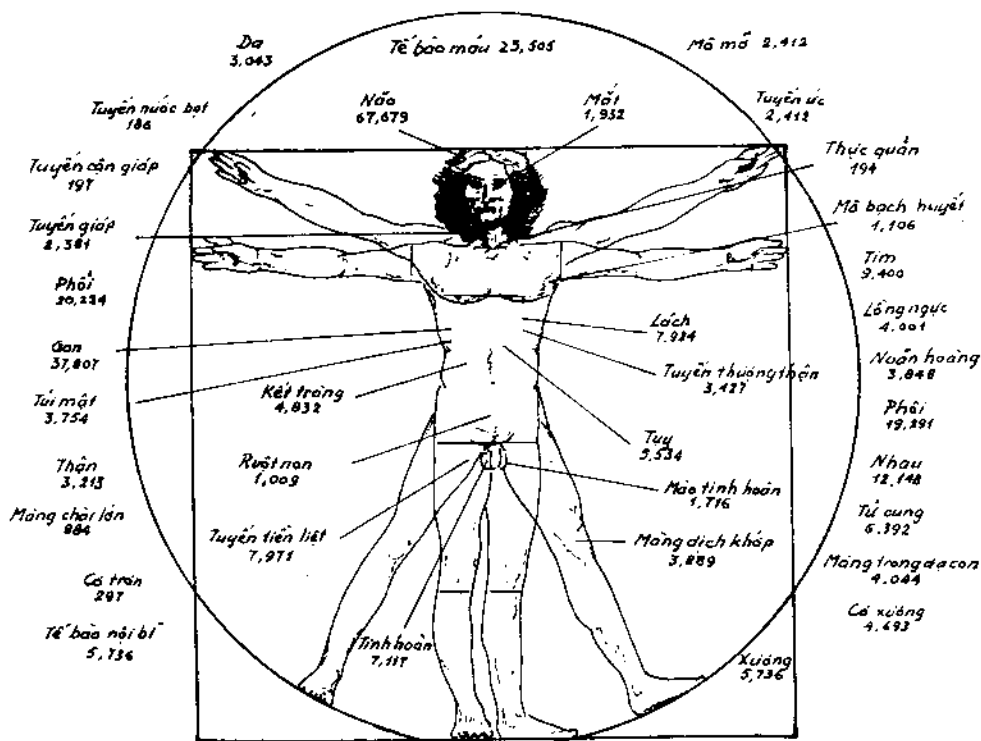
Nhờ áp dụng các phương pháp gây đột biến nhân tạo, các chủng vi sinh vật công nghiệp (sinh kháng sinh, glutamic acid,...) năng suất rất cao được tạo ra. Ví dụ, chủng nấm mốc *Penicillium chrysogenum* để sản xuất penicillin có năng suất tăng từ 100 đv/ml đến nay đạt 40.000 đv/ml, hơn chủng ban đầu đến 400 lần.

Ngày nay, kỹ thuật di truyền giúp cho chọn giống *vượt giới hạn của tiến hóa*. Cuối năm 1995, ở Mỹ đã có trại nuôi 575 con *dê mang gen người* để sản xuất protein người làm thuốc. Ở Anh, có trại nuôi cả nghìn con *heo được ghép gen người*, để cung cấp tim, gan, phổi... cho việc thay thế các cơ quan hỏng của người với giá thành rẻ đồng thời không xảy ra phản ứng loại bỏ cơ quan lạ ở người được thay. Tháng 3/1997 đã có thông báo về thành công trong chuyển *gen tạo hemoglobine máu người* vào cây thuốc lá, hứa hẹn sẽ sản xuất protein máu người và nhiều protein quý hiếm khác bằng trồng trọt.

Các mối quan hệ trong nông nghiệp sẽ có những thay đổi căn bản. Trước đây nông nghiệp đòi hỏi “nước, phân, cần, giống”. Kỹ thuật di truyền cho phép chuyển gen chịu hạn, chịu phèn, chịu lạnh, gen cố định đạm không khí, kháng bệnh, kháng thuốc trừ cỏ,... vào các cây trồng. *Giống* sẽ giữ vai trò quan trọng hàng đầu. Một số ít *tập đoàn khổng lồ sản xuất giống* sẽ giữ vai trò thống trị trong nông nghiệp.

2. Di truyền học và y học

Nhờ những thành tựu mới của kĩ thuật di truyền, vào cuối năm 1989 Mĩ đã chấp nhận **đầu tư 3 tỉ USD cho chương trình xác định toàn bộ trình tự nucleotide của bộ gen người** (DNA có hơn 3.10^9 cặp nucleotide, coi như 1 nucleotide /1USD). Số tiền tương đương cho việc đưa người lên Mặt Trăng của Mĩ. James Watson là người được chọn để lấy DNA phân tích nên vấn đề có tên gọi là **"DNA của James"**. Trước đây người ta nói nhiều đến **những đứa bé trong ống nghiệm** ("tést tube babies"), bây giờ bắt đầu nói đến những **đứa bé theo đơn đặt hàng** ("l'enfants à la carte"), tức khi hiểu rõ bộ máy di truyền và các gen của người thì có thể tạo ra các đứa bé theo ý muốn. Hiện nay vấn đề can thiệp vào tế bào sinh dục bị nhiều người phản đối và cho rằng chỉ nên tác động đến các tế bào soma của cơ thể để chữa trị những bệnh di truyền.



Hình 1.10. Danh mục một số gen điển hình đã biết của bộ gen người
Theo "Nature", sept. 1995 - supplement.

Năm 1992, con người đã tạo dòng được **2375** gen hoạt động ở bộ não của người. Từ đó đã bắt đầu bước ngoặt lớn trong nghiên cứu các **chất điều khiển trí thông minh**. Cuối năm 1995, con người đã thực hiện bước nhảy ngoạn mục : nắm bắt được 87.983 gen, trong đó có **67.679** gen hoạt động ở bộ não của người (hình 1.10). Hiện nay, các chất điều khiển trí thông minh đang được thử nghiệm.

Phương pháp trị các bệnh di truyền mới ra đời có tên gọi là **liệu pháp gen** (genotherapy) nhằm đưa các gen bình thường vào cơ thể thay thế các gen bệnh.

Y học tương lai sẽ nặng về **dự phòng**, vì khi đứa bé sinh ra có thể biết được ngay sẽ dễ bị bệnh gì và có biện pháp dự phòng. Vấn đề **chẩn đoán phân tử** sẽ giữ vai trò quan trọng và trở nên rất thông dụng. Ngành y có thể **không chỉ trị bệnh**, mà có thể tham gia **cải biến trí thông minh** của con người.

3. Di truyền học và tin học

Khoa học của thế kỉ 20 phát triển đến chóng mặt với tốc độ ngày càng nhanh hơn. Sự hòa hợp của hai lĩnh vực hàng đầu là Sinh học và Tin học ở ngay những năm cuối này , đánh dấu đỉnh cao của khoa học, được coi như **"cuộc ráp nối của thế kỉ"**. Công nghệ thông tin đã tiến những bước khổng lồ và đang đứng trước những thách thức mới. Các máy điện toán sinh học (biocomputer) đang được nghiên cứu chế tạo. Mới đây (1995), việc sử dụng các đoạn chất di truyền vào điện toán đã tạo nên **"sự bùng nổ trong các kế hoạch điện toán dùng DNA"**.

a) Xác định toàn bộ trình tự các nucleotide của nhiều bộ gen

Trên thế giới hiện nay có hơn 80 phòng thí nghiệm nghiên cứu xác định trình tự các nucleotide **bộ gen người** kể cả chương trình của Mi trong 15 năm (cuối 1989 đến 2005- 2006) với 3 tỉ USD đầu tư. Nhật bản đầu tư 2 tỉ yên để xác định trình tự các nucleotide bộ gen của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* và các vi khuẩn *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Châu Âu thực hiện chương trình với một loài thực vật là cây *Arabidopsis thaliana* với khoảng 70 triệu USD để hiểu rõ các quy luật tăng trưởng và phát triển ở thực vật nhằm tiến tới chủ động điều khiển các cây trồng. Xác định toàn bộ trình tự các nucleotide của nhiều bộ gen là công việc **khai phá đồ sộ**, tương tự như xác lập bản đồ thiên văn.

Hàng trăm nghìn đoạn DNA của bộ gen được xác định trình tự các nucleotide. Sự **lưu trữ và sử dụng** các kết quả đạt được cần đến tin học. Tin học can thiệp vào các chương trình xác định trình tự các nucleotide bộ gen ở

ba mức độ : *thu số liệu, khai thác sử dụng và điều khiển chúng*. Sự kết hợp giữa hai ngành sẽ mở ra lĩnh vực nghiên cứu *liên ngành mới* hứa hẹn dẫn đến nhiều phát minh lớn.

Những kết quả xác định trình tự các nucleotide của các bộ gen sẽ là những tri thức *quý báu* cho tin học. Cơ chế trữ và biểu hiện thông tin di truyền của thế giới sinh vật cực kì tinh vi và chính xác sẽ cung cấp nhiều ý tưởng cho tin học mô phỏng.

b) Thí nghiệm sinh học trên máy điện toán

Vấn đề trung tâm của hoạt động tương hỗ giữa tin học và sinh học là thông qua việc xây dựng các *đối tượng sinh học nhân tạo* (các gen và protein) nhờ điện toán rồi sau đó quay lại thí nghiệm để kiểm tra và chỉnh lí. Đây sẽ là phương tiện hữu hiệu gắn chặt các sáng tạo tin học và sinh học với nhau. Và như vậy, ngoài các phương pháp thông thường của sinh học như thí nghiệm trong cơ thể sinh vật (*in vivo*); thí nghiệm trong ống nghiệm (*in vitro*) như cắt, nối, sao chép DNA; còn có thể thêm *thí nghiệm sinh học trên máy điện toán (in silico)*. Nếu chúng ta nhớ lại rằng nhờ phát minh ra mô hình cấu trúc DNA (1953) dẫn đến nghiên cứu tính di truyền *trong ống nghiệm (in vitro)* đã thúc đẩy sinh học phân tử phát triển nhanh đến mức chưa lường hết được các thành tựu sắp tới, thì phương pháp mới nghiên cứu sinh học trên máy điện toán (*in silico*) sẽ có ý nghĩa quan trọng cỡ nào.

c) Biến đổi chất lượng protein

Khi biết trình tự nucleotide của một gen, tin học có thể dựa vào các tính chất và quy luật về cấu trúc phân tử protein để xây dựng nên các *mô hình cấu trúc* khác nhau của phân tử protein. Từ đó chọn *mô hình tối hảo* rồi quay lại làm *thí nghiệm kiểm chứng* trong ống nghiệm. Bằng cách này con người không những tạo ra các protein với nhiều tính chất được cải thiện *tốt hơn* của thiên nhiên, mà còn có thể tạo ra nhiều loại *protein mới* chưa hề có trong thiên nhiên với những tính chất ưu việt phù hợp với kĩ thuật hiện đại. Chính ở đây, việc sử dụng phương pháp thí nghiệm trên máy điện toán (*in silico*) là không thể thiếu được.

Cuộc ráp nối giữa sinh học và tin học chỉ mới bắt đầu, chúng ta hi vọng trong thời gian sắp tới sẽ được chứng kiến những thành tựu ngoạn mục hơn.

4. Sự liên quan với các ngành khoa học xã hội

Di truyền học liên quan đến nhiều ngành khoa học tự nhiên và xã hội khác nhau. Luật hôn nhân và gia đình “cấm hôn nhân giữa những người có

quan hệ họ hàng trực hệ ba đời” có cơ sở khoa học từ di truyền học. Ở đây chỉ nhắc thêm vài lĩnh vực chủ yếu có liên quan nhiều lĩnh vực khác nhau.

a) “Đạo lí sinh học” (Bioethics)

Đặc điểm của cuộc cách mạng sinh học mới hiện nay là không những tác động làm tốt hơn các nhu cầu sống của con người, mà còn có thể tác động *trực tiếp làm biến đổi bản thân con người*. Do đó hiện nay đề cập nhiều đến “*đạo lí sinh học*”.

Vào tháng 9 năm 1993, các nhà nghiên cứu của Đại học Washington đã thành công trong “*tạo dòng phôi người*” (human embryo cloning). Thông báo trên làm nổ ra những tranh cãi và phản đối gay gắt. Với kĩ thuật trên, con người có thể tạo ra *hàng loạt phôi* giống hệt nhau từ 1 phôi ban đầu, điều đã được thực hiện ở các động vật nuôi. Ví dụ ở cừu, 1 tế bào trứng được thụ tinh, sau đó chia thành 2, rồi 4, 8 tế bào con. Người ta đã tách 8 tế bào rời ra để nuôi riêng mỗi cái tạo thành 1 phôi và có 8 phôi như nhau sẽ cho ra 8 cừu con giống nhau. Kĩ thuật này được gọi là *tạo dòng*. Trong thập niên gần đây kĩ thuật tạo dòng phôi đã cho nhiều kết quả ở bò, cừu, thỏ, heo, khỉ.

Cuối tháng 2/1997, I.Wilmut và các cộng sự ở Anh đã công bố bài báo “*Sinh sản vô tính*” làm xôn xao dư luận trên thế giới đến nỗi các tổng thống Mĩ, Pháp và nghị viện Anh phải lên tiếng. Vấn đề là ở chỗ, thành công này mở ra khả năng “*tạo dòng người*”.

Nhiều người cho rằng, về mặt đạo lí những thí nghiệm tương tự không được phép tiến hành ở con người. Trong những năm đầu của thập kỉ 90 này, Nghị viện châu Âu đã thông qua 3 luật cấm các thí nghiệm liên quan đến đạo lí.

b) Nhiều vấn đề mới đặt ra

Nhờ sự phát triển nhanh của CNSH, hiện nay người ta bắt đầu nói về các “*siêu nhân*”, về “*sự bất tử*” của con người trong thế kỉ tới. Điều này chưa biết sẽ xảy ra hay không, nhưng nó có đầy đủ cơ sở khoa học. Trong lịch sử tiến hóa của loài người, từ 200.000 năm trở lại đây con người về mặt sinh học hầu như không có biến đổi lớn. Tuy nhiên *quyền lực trí tuệ* của loài người hiện nay tạo nên những biến đổi *vượt giới hạn tiến hóa tự nhiên*, kể cả biến đổi cơ thể sinh vật của con người. Ba xu hướng sau đây đang và sẽ diễn ra trong thời gian sắp tới:

- *Đưa gen của người vào các sinh vật* : Đã đưa các gen của người vào các virus, vi khuẩn, nấm men, dê, heo, bò,... để tạo các *protein người* làm được phẩm hoặc *cơ quan thay thế*.

- Con người nhận các **gen** hoặc **cơ quan** từ các sinh vật : Con người có thể mang gen các sinh vật khác nhau để chống lại bệnh tật hay tim hỏng được thay bằng tim heo,...
- Con người có **tuổi thọ kéo dài** và có thể **bất tử**. Hàng loạt thuốc mới có hiệu quả hơn; máu người, các cơ quan của người được tạo ra để thay thế; ướp lạnh xác chết chờ lúc làm sống lại....Vấn đề con người bất tử không còn là viễn tưởng.

Vài điều vừa nêu trên cho thấy rằng trong tương lai nào đó sẽ có sự can thiệp trực tiếp vào bộ máy di truyền để cải thiện cơ thể sinh vật của con người. Có thể xuất hiện một **chủng loại người mới** có nhiều ưu việt hơn con người sản phẩm của thiên nhiên. Đó sẽ là những **con người tiên hóa của trí tuệ**.

Những thành tựu trên đặt ra nhiều vấn đề mới đáng suy gẫm cho giáo dục học, luật học, triết học, xã hội học. Di truyền học có nhiều thành tựu “đáng sợ” đến mức hiện nay có nhiều nhà khoa học đặt vấn đề cấm một số nghiên cứu di truyền học.

Một cuộc cách mạng mới trong sinh học đã bắt đầu và đến nay chưa lường hết được những thành tựu mà nó sẽ đem lại có ảnh hưởng sâu sắc đến ngay **bản thân con người**, đến nhiều lĩnh vực kinh tế xã hội.

VIII. ĐÔI ĐIỀU VỀ DI TRUYỀN HỌC Ở VIỆT NAM

Từ thời tiền sử, các dân tộc Đông Nam Á, đã có nhiều thành tựu trong chọn giống cây trồng vật nuôi như :

- Việc trồng và chọn giống lúa nước, bầu bí, trâu cau, dâu,...
- Thuần dưỡng nhiều gia súc như gà, heo, trâu (mà cho đến năm 1450 tr.CN đã được đưa đến vùng Ai Cập). Trong “Nguồn gốc các loài” Darwin đã khẳng định rằng các **giống gà nuôi** trên thế giới đều bắt nguồn từ **gà rừng** Đông Nam Á *Gallus bankiva*.

Tiếc rằng thời nay các nhà chọn giống Việt Nam chưa có đóng góp lớn như tổ tiên đã làm, nhiều giống lúa, giống gà phải nhập nội.

Theo sách “Cơ sở văn hóa Việt Nam” của PGS.PTS. Trần Ngọc Thêm:

“Ở Việt Nam, **tin ngưỡng phồn thực** (phồn = nhiều, thực = nảy nở) từng tồn tại suốt chiều dài lịch sử, và có tới hai dạng biểu hiện : thờ cơ quan sinh dục nam nữ và thờ bản thân hành vi giao phối.

- “Việc thờ cơ quan sinh dục nam nữ được gọi là *thờ sinh thực khí* (sinh = đẻ, thực = nảy nở, khí = công cụ).” Đến nay, nhiều tập tục còn phổ biến ở một số địa phương nước ta.
- “... tục thờ hành vi giao phối ..được thể hiện trên nhiều hình của trống đồng...”. “Ngay cả những hiện tượng tưởng chừng rất xa xôi như chùa Một Cột (dương) trong cái hồ vuông (âm), tháp Bút (dương) và đài Nghiên (âm) ở cổng đền Ngọc Sơn (Hà Nội),... cũng đều liên quan tới tín ngưỡng phồn thực.”

Trong hôn nhân, dân tộc ta đã có quan điểm chọn dòng giống như:

- “*Lấy vợ kén tông, lấy chồng kén giống*”
- “*Mua heo chọn nái, mua gái chọn dòng*”...

Nước ta có sự kiện đáng lưu ý là đời **nhà Trần** (1225 - 1400), trong 175 năm có quy định con trai họ Trần chỉ lấy con gái họ Trần. Do kết hôn trong họ hàng nên có hiện tượng *giao phối cận huyết*.

Nhà di truyền học Việt Nam có công trình nghiên cứu đáng tự hào là Anh hùng lao động – Tiến sĩ nông học **Lương Định Của**. Các nghiên cứu đa bội thể của ông tiến hành ở Nhật Bản có giá trị vào những năm 1950 và được nhiều nhà di truyền học trên thế giới trích dẫn. Sau 1954, ở miền Bắc nước ta ông đã tạo được giống dưa hấu không hạt và rau muống đa bội. Đó là những sản phẩm di truyền học có giá trị đầu tiên ở nước ta và vào thời đó là **sớm** so với nhiều nước trong lĩnh vực đa bội thể.

Trong một thời gian dài (1954- 1965), ở miền Bắc nước ta di truyền học chịu ảnh hưởng của Liên Xô (cũ) theo quan điểm sai lầm của Lư-xen-cô. Di truyền học Mendel-Morgan bị coi là phản động. Sau nghị quyết của BCH Trung ương Đảng Cộng sản Liên Xô tháng 10/ 1964 về “ bình thường hóa tình hình di truyền học”, mọi việc được hồi phục. Vào năm 1966, di truyền học được giảng dạy trong các trường đại học. Lúc đó, trong vài năm ở một số trường đại học hai giáo trình Di truyền học Mendel-Morgan và quan điểm của Lư-xen-cô được dạy song song. Thời gian này, Hội Di truyền học được thành lập và hoạt động cho đến nay.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Di truyền học là bộ môn sinh học nghiên cứu hai đặc tính căn bản, chi phối mọi biểu hiện sống là *di truyền* và *biến dị*. Nó được nghiên cứu tuân theo *các nguyên tắc chung* của sinh học. Phạm vi nghiên cứu của di truyền học rất rộng : từ mức phân tử đến tế bào, cơ thể và sự tiến hóa của sinh giới. Nó có những phương pháp nghiên cứu đặc thù và lịch sử phát triển đáng tự hào. Di truyền học có mối quan hệ không những với các bộ môn sinh học, mà với nhiều ngành khoa học khác. Nhiều ứng dụng của di truyền học có ý nghĩa to lớn đối với xã hội loài người.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vì sao nói : di truyền học *khó hiểu nhất*, đồng thời *hấp dẫn nhất* và cũng *đáng sợ nhất* ?
2. Hãy nêu rõ phạm vi nghiên cứu của di truyền học.
3. Kể ra các phương pháp nghiên cứu căn bản của di truyền học.
4. Những sự kiện nào góp phần quyết định để công nhận các quy luật di truyền Mendel ?
5. Nêu các ứng dụng của di truyền học trong chọn giống và y học.
6. Phương pháp nghiên cứu sinh học *in silico* là gì ?
7. Vì sao có đề nghị cấm một số nghiên cứu di truyền học ?
8. Thử tính DNA của 6 tỉ hợp tử người nặng bao nhiêu gram ?

PHẦN I

DI TRUYỀN HỌC CỔ ĐIỂN

CHƯƠNG II

DI TRUYỀN HỌC MENDEL

Bằng các phương pháp thí nghiệm chính xác, Gr.Mendel đã chứng minh sự di truyền có *tính gián đoạn* do những *nhân tố di truyền* mà sau này được gọi là *gen*. Ông đã nêu ra các quy luật di truyền : *giao tử thuần khiết* và *phân li độc lập, tổ hợp tự do*. Các hiện tượng *trội không hoàn toàn, di truyền tương đương* và *đa allele* làm phong phú thêm khái niệm về gen.

I. MENDEL VÀ QUAN NIỆM VỀ GEN

1. Mendel - Newton của Sinh học

Gregor Mendel – người sáng lập ra Di truyền học, sinh ngày 22 tháng 7 năm 1822 (1822-1884 – hình 1.3). Ông sinh ra cùng năm với L. Pasteur (1822 - 1895), cùng thời với Darwin (1809-1882) – tác giả học thuyết tiến hóa cổ điển và với nhiều danh nhân khác. Tuy số phận gặp nhiều không may, nhưng phát minh của ông ngày càng được đánh giá cao hơn. Tượng đài ông được dựng ở tu viện Brno (Tiệp Khắc) (hình 2.1.). Ngày nay công lao của ông đối với sinh học ví như công lao của Newton đối với vật lý học.

Johann Mendel sinh ra trong gia đình nông dân nghèo ở Silesie, nay thuộc Brno (Tiệp Khắc). Khi còn học trung học ông đã thể hiện nhiều khả năng thông minh, có chí hướng trở thành nhà giáo, dạy khoa học tự nhiên. Do điều kiện sống thiếu thốn, ông vào tu viện thành phố Brno để tiếp tục học thành nhà giáo. Thuở đó tu viện có lệ đặc biệt là các thầy dòng phải

giảng dạy các môn khoa học cho các trường thành phố, nên họ thường tiến hành nghiên cứu khoa học. Tu viện đã đặt tên *Gregor* (thay cho Johann) và cử ông đi học ở Đại học Viên (Áo) từ 1851 đến 1853. Khi trở về ông dạy các môn toán, vật lí và một số môn khoa học khác.



Hình 2.1. Tượng đài Gr.Mendel

Mendel tiến hành thí nghiệm ở đậu Hà Lan (*Pisum sativum*) từ năm 1856 đến năm 1863 trên mảnh vườn nhỏ (rộng 7m, dài 35m) trong tu viện (hình 2.2).

Ông đã trồng khoảng 37.000 cây và quan sát đặc biệt chừng 300.000 hạt. Các kết quả nghiên cứu được trình bày trước "Hội các nhà tự nhiên học" ở Brno trong hai buổi họp năm 1865 và được công bố năm 1866 (h. 2.4). Mendel đã nhờ có **phương pháp thí nghiệm độc đáo** chứng minh sự di truyền do các **nhân tố (element) di truyền** và dùng các kí hiệu số học đơn giản biểu hiện các **quy luật truyền thụ tính di truyền**. Phát minh này đặt nền móng cho di truyền học, nó rất căn bản và là thành phần kiến thức không thể thiếu ở bậc trung học phổ thông.

nghiên cứu của ông. Phương pháp thí nghiệm độc đáo và đúng đắn của Mendel đến nay vẫn là mẫu mực cho các nghiên cứu di truyền. Các thí nghiệm có đánh giá số lượng của ông khác hẳn với các phương pháp mô tả của các nhà sinh học vẫn thường sử dụng ở thế kỉ 19.

a) Đối tượng nghiên cứu

Trong các thí nghiệm, Mendel chọn *đối tượng thuận tiện* cho nghiên cứu là đậu Hà Lan *Pisum sativum* (có lẽ do dễ trồng và có nhiều thứ phân biệt rõ ràng, là cây hàng năm, có những tính trạng biểu hiện rõ, tự thụ phấn nghiêm ngặt nên dễ tạo dòng thuần).

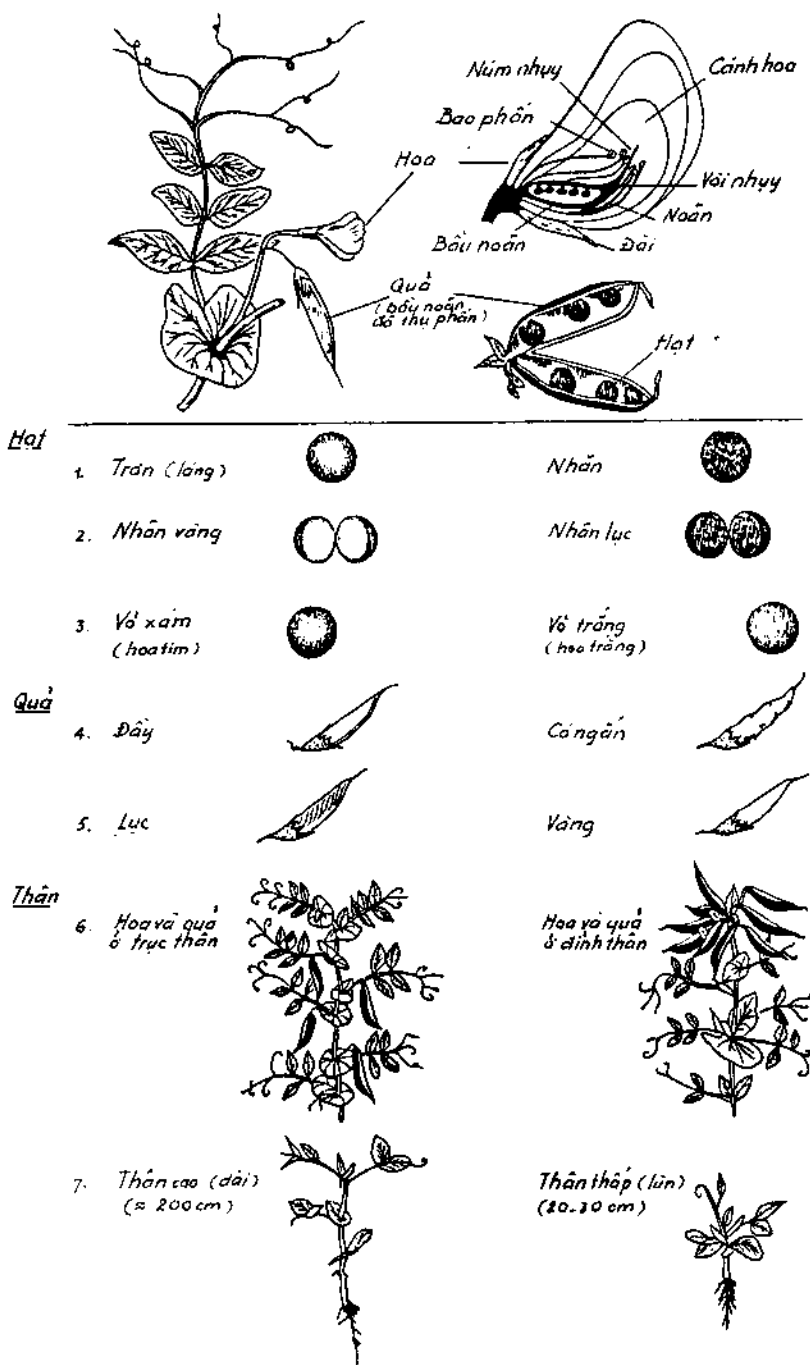
Thời Mendel việc chọn giống đậu được quan tâm, nên đã có những thí nghiệm lai ở đậu. Bản thân Mendel đã tạo được vài giống đậu có giá trị kinh tế. Tuy nhiên, các thí nghiệm của ông đã làm cho đậu Hà Lan trở thành *đối tượng mô hình* đầu tiên của di truyền học. Về sau, những bước phát triển lớn của di truyền học đều gắn liền với các đối tượng mô hình nhất định: đó là ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*) với học thuyết di truyền nhiễm sắc thể hay các đối tượng vi sinh vật với di truyền học phân tử.

Ngày nay việc chọn đối tượng mô hình là công việc quan trọng hàng đầu cho bất kì nghiên cứu sinh học thực nghiệm nào.

b) Tính trạng hay dấu hiệu.

Thông thường khi quan sát các loài sinh vật khác nhau, sẽ thấy chúng có những nét dễ dàng nhận biết, đó là các *tính trạng* (character) hay *dấu hiệu* (trait). Ở người mắt có thể đen, nâu, xanh hoặc xám; tóc có thể vàng, nâu hoặc đen. Ngoài những tính trạng *hình thái* dễ quan sát như ví dụ vừa nêu ở người, còn có những tính trạng bên trong liên quan đến các phản ứng *sinh hóa*, các biểu hiện *sinh lí* thậm chí có cả những tính trạng tâm thần.

Mendel đã thực hiện một cách tài tình việc chọn ở đậu *bảy cặp tính trạng chất lượng* có biểu hiện rõ ràng (hình 2.4). Sau này, khi Morgan chứng minh sự liên kết gen, có người nghi ngờ tính khách quan của các số liệu của Mendel, vì chẳng lẽ cả 7 cặp tính trạng đều nằm ở 7 cặp nhiễm sắc thể khác nhau. Thậm chí vào năm 1927, khi xác định chính xác ở đậu Hà Lan (*Pisum sativum*) có 7 cặp nhiễm sắc thể, có người cho rằng Mendel gặp may. Tuy nhiên, hiện nay biết rõ rằng bảy cặp tính trạng mà Mendel nghiên cứu chỉ nằm trên 4 cặp nhiễm sắc thể của đậu. Các gen xác định tính trạng màu nhân hạt và vỏ hạt, hình dạng quả và vị trí hoa chỉ thuộc vào 2 nhóm liên kết gen, nhưng chúng nằm cách nhau xa đến nỗi kết quả thu được như chúng không liên kết với nhau.



Hình 2.4. Các cặp tính trạng Mendel ở *Pisum sativum*

BẢNG 2-1. Các kết quả lai đơn tính của Mendel

TT	Tổ hợp lai - P	Thế hệ F ₁	Thế hệ F ₂	Tỉ lệ F ₂
1	Hạt tròn × hạt nhăn	Hạt tròn	5474 tròn : 1850 nhăn	2,96 : 1
2	Hạt vàng × hạt lục	Hạt vàng	6022 vàng : 2001 lục	3,01 : 1
3	Vỏ xám × Vỏ trắng	Vỏ xám	705 xám : 224 trắng	3,15 : 1
4	Quả đầy × quả ngắn	Quả đầy	802 đầy : 229 ngắn	2,95 : 1
5	Quả lục × quả vàng	Quả lục	428 lục : 152 vàng	2,82 : 1
6	Hoa ở thân × Hoa ở đỉnh	Hoa ở thân	651 hoa thân : 207 hoa đỉnh	3,14 : 1
7	Thân cao × Thân lùn	Toàn thân cao	787 cao : 277 lùn	2,84 : 1
	Tổng cộng		14889 trội : 5010 lặn	2,98 : 1

Các cặp tính trạng này được gọi là cặp tính trạng **chất lượng** vì trong mỗi cặp có **sự tương phản** dễ ghi nhận như tròn và nhăn hay vàng với lục. Để chọn được các dạng như vậy, Mendel đã trồng 34 thứ đậu trong hai năm, thu hai thế hệ. Trong số đó, 22 thứ được giữ lại do có các tính trạng tương phản biểu hiện rõ.

c) Cách tiến hành

Cách tiến hành thí nghiệm của Mendel cũng khác thường, chứng tỏ ông đã đầu tư nhiều trí tuệ và tính toán chi li.

- Thứ nhất, **vật liệu thuần chủng** và được biết rõ ràng **nguồn gốc**. Mendel đã cho các cây thí nghiệm tự thụ phấn trong 2-3 đời để được thuần chủng. Mỗi cây đem thí nghiệm đều được biết rõ nguồn gốc từ cha mẹ nào.
- Thứ hai, theo dõi riêng từng cặp **tính trạng** qua **nhiều thế hệ nối tiếp** nhau. Trong loạt thí nghiệm đầu tiên, Mendel tiến hành lai

để theo dõi sự di truyền của một cặp tính trạng. Từng cặp tính trạng tương phản được khảo sát đồng thời và qua các thế hệ nối tiếp nhau. Chính qua lai đơn tính Mendel đã phát hiện các hiện tượng như trạng thái *trội lặn*, *sự phân li* ở thế hệ thứ hai của các con lai. Ông nêu ra các thuật ngữ *trội* và *lặn*. Đặc biệt, sự xuất hiện các tính trạng lặn ở thế hệ thứ hai giúp Mendel dễ dàng nhận thấy các *tính trạng không trộn lẫn* như quan niệm di truyền hòa hợp (blending) thời đó và trải qua nhiều thế hệ không mất đi.

Về sau Mendel tiến hành lai với hai cặp tính trạng và nhiều cặp tính trạng hơn để phát hiện tiếp quy luật di truyền độc lập.

- Thứ ba, *đánh giá khách quan và tính số lượng chính xác*. Trong thí nghiệm lai, Mendel quan sát tất cả các hạt và con lai xuất hiện không bỏ sót cá thể nào. Ông thống kê cả số lượng và tính tỉ lệ từng loại.
- Thứ tư, sử dụng *kí hiệu* và *công thức* toán học để biểu hiện kết quả thí nghiệm. Một công lao to lớn nữa của Mendel là ông đã tìm ra phương pháp *đơn giản* đến đáng kinh ngạc để biểu hiện các kiểu dạng khi lai bằng những *công thức số học*. Ông là người đầu tiên dùng kí hiệu chữ để chỉ các nhân tố di truyền. Tuy công thức của Mendel không giống như ngày nay (ví dụ: thế hệ F_2 được viết $A + 2Aa + a$) nhưng nguyên tắc căn bản đó được sử dụng mãi trong di truyền học.

3. Sự xác lập khái niệm về gen

Vào năm 1865, Gregor Mendel là người đầu tiên phát hiện các quy luật căn bản của tính di truyền. Mãi đến năm 1900, Hugo Marie de Vries (Hà Lan) xác nhận các quy luật Mendel cùng lúc ở 16 loài thực vật. E.K. Correns (Đức) và E. von Tschermak (Áo) độc lập với nhau, đã một lần nữa *phát hiện lại* các quy luật Mendel ở đậu *Pisum sativum*. Thời gian này nhờ các phát minh tế bào học cuối thế kỉ 19, giới khoa học dễ dàng chấp nhận các quy luật Mendel. Mốc phát minh lại này được coi là thời điểm ra đời của di truyền học.

Năm 1902, W. Bateson chứng minh các quy luật Mendel ở sự di truyền màu gà và L. Cuénot xác nhận ở sự di truyền màu lông chuột xám và trắng. Ngay từ năm 1909, W. Bateson đã công bố danh mục kể ra gần 100 tính trạng ở thực vật và gần 100 tính trạng ở động vật có sự di truyền theo quy luật Mendel. Tiếp theo, các hiện tượng *tương tác gen* được phát hiện và đã bổ sung thêm cho các quy luật di truyền Mendel.

Tên gọi môn **Di truyền học** (Genetics - 1906) và các thuật ngữ như **gen** (gene), **kiểu gen** (genotype) và **kiểu hình** (phenotype), **đồng hợp tử** (homozygote) và **dị hợp tử** (heterozygote) được nêu ra .

Đầu thế kỉ 20, khái niệm gen được xác lập và di truyền học bắt đầu phát triển nhanh với nhiều thành tựu mới. Công lao to lớn của Mendel là trong muôn ngàn hiện tượng phức tạp của thiên nhiên và của tính di truyền ông đã tách ra được các tính trạng riêng rẽ (do nhân tố bên trong là gen chi phối) làm đơn vị nghiên cứu. Nếu như C.Darwin là người hệ thống hóa sự phát triển sinh giới ở cấp **vĩ mô**, thì Gr.Mendel là người mở đầu cho các nghiên cứu đi sâu vào thế giới **vi mô** của sự sống. Khái niệm gen thực sự đã làm nền tảng cho những phát minh lớn của sinh học thế kỉ 20 nên Mendel được coi như Newton của sinh học.

4. Về cách phát biểu các quy luật Mendel

Mendel không hề có sự phân biệt căn bản nào khi ghi nhận các kết quả lai đơn tính và đa tính và đã đi đến kết luận như sau : "*Hậu thế của các cây lai, kết hợp trong bản thân chúng vài tính trạng tương phản về căn bản khác nhau, là những thành viên của một dãy tổ hợp, trong dãy này có kết hợp các dãy của sự phát triển của mỗi một cặp tính trạng tương phản*". Đồng thời do đó cũng chứng minh rằng *hành tung trong tổ hợp lai của mỗi cặp tính trạng tương phản không phụ thuộc vào những cặp tính trạng tương phản khác ở cả hai cha mẹ ban đầu*" và vì thế "*các tính trạng tương phản ổn định, mà thường gặp ở những dạng khác nhau của một nhóm thực vật có họ hàng thân thuộc với nhau, có thể gia nhập vào tất cả các tổ hợp có thể có được theo các nguyên tắc về tổ hợp*". Chính ở chỗ này, Mendel **đúng hơn**, không phát biểu thành 3 hay 2 quy luật một cách **nhân tạo** như sau này. Ông cũng không phạm sai lầm như các nhà di truyền học đầu thế kỉ 20, coi kiểu-*Pisum* có tính phổ cập chung ở dạng "quy luật thứ nhất của Mendel". Rõ ràng, sự biểu hiện của gen là thống nhất dù lai đơn tính hay đa tính.

Đầu thế kỉ 20, sự truyền thụ các tính trạng di truyền được phát biểu thành 3 quy luật di truyền Mendel như sau :

- **Quy luật đồng nhất của thế hệ con lai thứ nhất** hay quy luật **tính trội**.
- **Quy luật phân li tính trạng** (theo tỉ lệ kiểu hình 3:1).
- **Quy luật phân li độc lập**.

Về quy luật phân li độc lập không có gì bàn luận. Tuy nhiên quy luật thứ nhất và thứ hai theo cách phát biểu này thiếu chính xác vì :

- Phải có các điều kiện như thuần chủng và trội hoàn toàn.

- Đúng một phần cho di truyền tương đương và trội không hoàn toàn.
- Không dùng được cho phân li giao tử và sinh vật đơn bội.

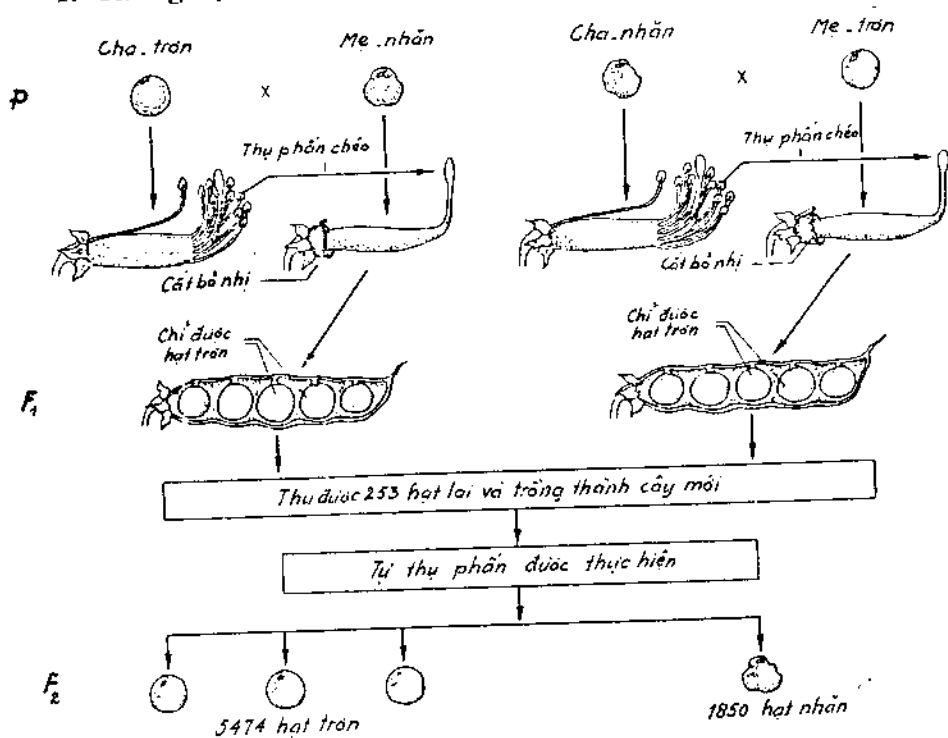
Sau này, đa số các nhà di truyền học phát biểu thành 2 quy luật :

- QUY LUẬT THỨ NHẤT : **quy luật phân li** hay quy luật **giao tử thuần khiết**.
Phân li ở đây được hiểu là các allele của gen tách nhau ra khi tạo thành giao tử. Cách phát biểu này phản ánh đúng cơ chế phân bào khi tạo thành giao tử, nó đúng cho mọi trường hợp mà không nhất thiết phải thuần chủng và cho cả cá thể đơn bội.
- QUY LUẬT THỨ HAI : **quy luật phân li độc lập**.

II. LAI ĐƠN TÍNH VÀ QUY LUẬT GIAO TỬ THUẦN KHIẾT

Lai đơn tính là quá trình lai trong đó cha mẹ khác nhau theo một cặp tính trạng.

1. Thí nghiệm trên đậu Hà Lan

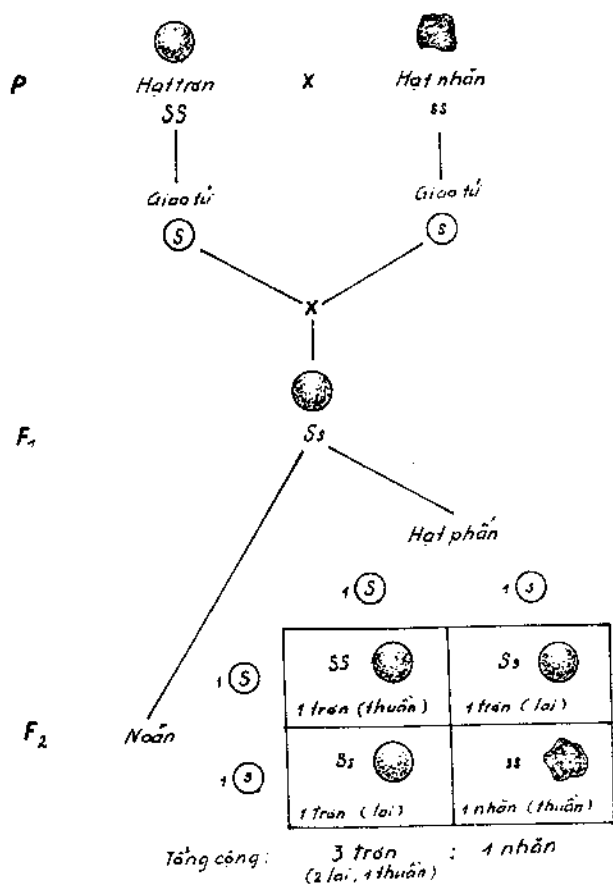


Hình 2.5. Lai đơn tính : tròn và nhăn

(Khi lai, lông nhị đực của cây mẹ được cắt bỏ chỉ giữ noãn và được thụ phấn của cây cha)

Mendel lấy đậu hạt trơn lai với hạt nhăn, kết quả thu được như mô tả trong hình 2.5. Thế hệ cha mẹ được kí hiệu bằng chữ P (*parenta*), ♂ biểu hiện giống đực, ♀ - giống cái, con lai thế hệ thứ nhất kí hiệu F_1 (tiếng La tinh *Filii*-con), con lai thế hệ thứ hai là F_2 . Kí hiệu $\times$ chỉ sự lai. Thế hệ F_1 (hạt trên cây cha mẹ) tất cả con lai đều hạt trơn. Ở thế hệ thứ hai (hạt trên cây F_1) có sự phân li tỉ lệ 3 trơn : 1 nhăn. Tính trạng trơn được biểu hiện ở F_1 gọi là tính trạng *trội* (dominant) và gen quy định nó được kí hiệu bằng chữ hoa A , còn tính trạng nhăn gọi là *lặn* (recessive) và gen quy định nó được kí hiệu a .

Để chỉ đúng tên tính trạng, sau này chữ đầu của tên tiếng Anh được dùng làm kí hiệu trội như trơn-láng S (Smooth) và s chỉ tính lặn là nhăn. Trong 3 phần đậu hạt trơn có một phần thuần chủng tức đem gieo tiếp chỉ cho đậu hạt trơn. Còn hai phần kia nếu đem gieo sẽ xuất hiện cả trơn lẫn nhăn theo tỉ lệ 3:1. F_1 cho thụ phấn- Mỗi cá thể F_1 tạo hai loại giao tử A và a.



Hình 2.6. Sơ đồ và khung Punnet mô tả lai đơn tính

Sơ đồ lai được nêu trên hình 2.6. Để dễ dàng theo dõi F_2 , nhà di truyền học người Anh R.C Punnett có sáng kiến nêu ra khung kẻ ô được gọi là khung Punnett (hình 2.6) đến nay vẫn được sử dụng. Sự gặp nhau ngẫu nhiên của hai loại giao tử trên cho sự phân li theo kiểu hình ở F_2 là 3 trơn: 1 nhăn và sự phân li theo kiểu gen 1 AA: 2Aa: 1aa.

Trong lai đơn tính tỉ lệ phân li ở F_2 theo **kiểu hình** là **3:1**, nhưng theo **kiểu gen** là 1AA: 2 Aa: 1aa.

Các kết quả lai đối với bảy cặp tính trạng của Mendel được nêu trên bảng 2-1 trên. Số liệu cho thấy tỉ lệ kiểu hình ở F_2 đều là 3 : 1.

2. Lai phân tích (Test-cross)

Mendel cho rằng mỗi tính trạng do một cặp nhân tố kiểm tra và mỗi cá thể có hai nhân tố đó: một nhận từ cha và cái khác từ mẹ. Ông cũng tiên đoán rằng giao tử chỉ chứa một nhân tố, ở con lai sẽ tạo hai loại giao tử. Ông đã tiến hành lai phân tích bằng cách lấy con lai Aa lai ngược với bố hoặc mẹ mang tính lặn:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{P} & Aa & \times \quad aa \\
 \\
 \text{Giao tử} & A \text{ và } a & \quad \quad a \quad \text{ và } \quad a \\
 \\
 \text{Con lai} & 1 Aa & : \quad \quad 1 aa
 \end{array}$$

Vì dạng lặn thuần chủng chỉ tạo một loại giao tử **a** nên tỉ lệ 1:1 là do sự **phân li** ở cây lai khi tạo thành giao tử. Cả hai tổ hợp lai $Aa \times AA$ và $Aa \times aa$ đều được gọi là **lai ngược** (back cross) nhưng tổ hợp sau được gọi là **lai phân tích** (test - cross) vì nó giúp phát hiện dạng lai có thuần chủng không.

3. Các thuật ngữ căn bản

Từ các thí nghiệm trên có thể nêu các thuật ngữ căn bản sau :

- **Gen** : Nhân tố di truyền xác định các tính trạng của sinh vật, như hình dạng hạt, màu sắc, trái và hoa...
- **Allele** (Allele) : Các trạng thái khác nhau của một gen. Như gen hình dạng hạt có hai **allele** là trơn và nhăn.
- **Đồng hợp tử** (Homozygote) : Các cá thể có 2 allele giống nhau như AA và aa.
- **Dị hợp tử** (Heterozygote): Các cá thể có 2 allele khác nhau như Aa.
- **Kiểu gen** (Genotype) : Tập hợp các nhân tố di truyền của cá thể.

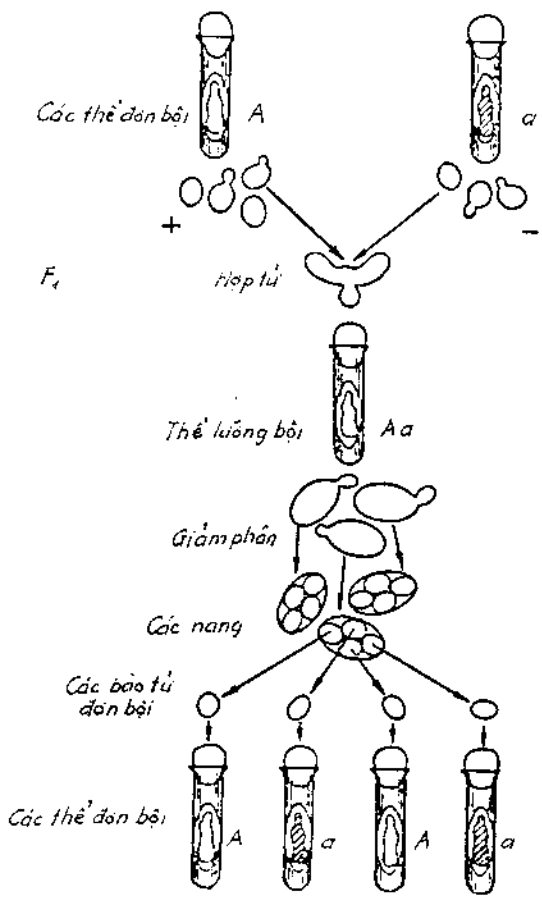
Kiểu hình (Phenotype): Là biểu hiện của tính trạng, nó là kết quả sự tương tác giữa kiểu gen với môi trường.

LƯU Ý : Trong thực tế, hai khái niệm kiểu gen và kiểu hình được dùng không chính xác theo định nghĩa, mà chỉ nhằm vào một số ít gen hay tính trạng. Đúng ra là *kiểu gen "một phần"* và *kiểu hình "một phần"*.

Hai dạng AA và Aa có kiểu hình giống nhau là hạt trơn, nhưng kiểu gen thì khác nhau.

4. Sự phân li giao tử

Kết quả của lai phân tích với tỉ lệ 1:1 chứng tỏ có sự phân li các gen khi tạo thành giao tử. Nhưng kết quả này ở thực vật là gián tiếp vì nó được



Hình 2.7. Sự phân li giao tử ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae*
(Tỉ lệ phân li là 2A : 2a tức 1 : 1)

quan sát sau khi các giao tử đã kết hợp với nhau thành hợp tử rồi tạo cây lai lưỡng bội. Sự phân li trực tiếp ở giao tử dễ dàng nhận thấy khi theo dõi các **bộ bốn** (tetrad) ở một số nang khuẩn (nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, nấm mốc *Neurospora crassa*) hay ở tảo đơn bào *Chlamydomonas reinhardtii*.

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong chu trình sống có 2 dạng đơn bội là **A** và **a**, tương đương 2 loại giao tử của động thực vật. A và a cũng là 2 allele của một gen, khi tế bào của chúng kết hợp với nhau tạo tế bào lưỡng bội tương tự hợp tử. Hợp tử này chia giảm nhiễm tạo 4 bào tử trong nang. Bốn bào tử trong mỗi nang là sản phẩm của chia giảm nhiễm cho tỉ lệ $2A : 2a$ (hình 2.7).

Tỉ lệ phân li $1 : 1$ ở đây phản ánh đúng sự phân li giao tử. Tỉ lệ phân li này cũng được xác nhận ở phần hoa của thực vật. Việc chứng minh trực tiếp sự phân li ở giao tử cho thấy các quy luật di truyền Mendel có **cơ sở tế bào học**.

Đến đây, có thể phát biểu quy luật thứ nhất của Mendel gọi là **quy luật phân li** hay **giao tử thuần khiết**: Trong cơ thể các gen tồn tại theo từng đôi, khi tạo thành giao tử từng đôi gen phân li nhau và mỗi gen đi vào một giao tử. Sau khi hai giao tử kết hợp với nhau các gen tương ứng lại hợp thành từng đôi trong hợp tử.

Quy luật này đúng cho cả sinh vật lưỡng bội ($2n$) và đơn bội (n) khi tỉ lệ phân li giống tỉ lệ của phép lai phân tích, tức $1:1$.

III. LAI VỚI HAI VÀ NHIỀU CẶP TÍNH TRẠNG

1. Quy luật phân li độc lập

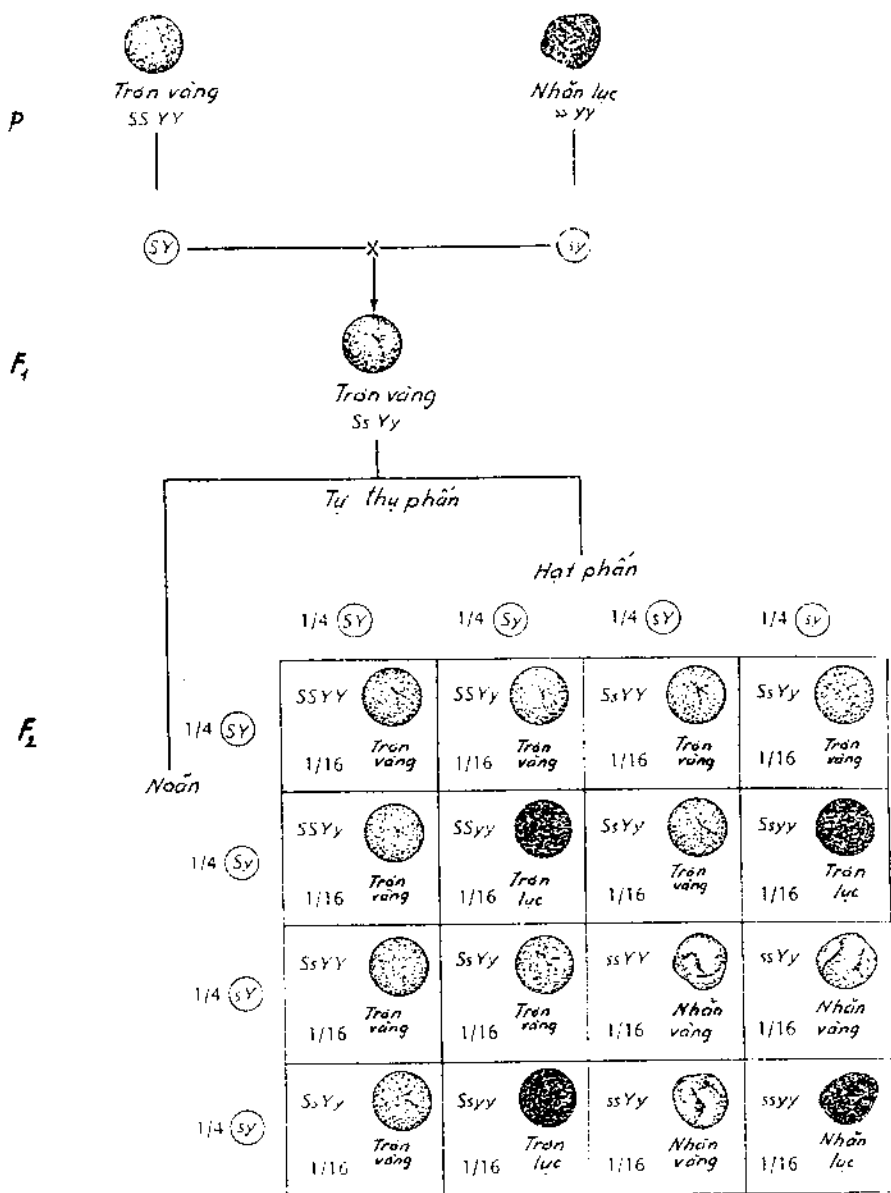
Mendel đồng thời theo dõi sự di truyền của cả hai cặp tính trạng trong phép lai đậu hạt trơn-vàng với đậu hạt nhăn-xanh lục như hình 2.8.

Lai phân tích với 2 cặp tính trạng cho kết quả như sau: F_1 có 4 loại giao tử: SY, Sy, sY và sy. Tỉ lệ phân li kiểu hình F_2 là 9 trơn-vàng : 3 trơn-xanh lục : 3 nhăn-vàng : 1 nhăn-xanh lục.

Kết quả chứng minh là cây lai F_1 giữa 2 dòng thuần SSYY và ssyy có **kiểu gen dị hợp SsYy**.

Kết quả thí nghiệm cho thấy thế hệ thứ nhất F_1 cũng đồng nhất và biểu hiện các tính trạng trội trơn-vàng. Thế hệ thứ hai tỉ lệ phân li kiểu hình là 9 trơn-vàng : 3 trơn-xanh lục : 3 nhăn-vàng : 1 nhăn-xanh lục. Xét riêng từng cặp một thì tỉ lệ phân li theo kiểu hình cũng là $3 : 1$ (12 trơn : 4 nhăn và 12 vàng : 4 xanh lục).

Điều đó cho thấy sự di truyền của từng cặp tính trạng độc lập với nhau. Sự độc lập này có thể chứng minh bằng toán học và xác suất của **hai sự kiện độc lập** với nhau cùng trùng hợp bằng **tích xác suất** của hai sự kiện đó. Tỷ lệ phân li của cặp trơn-nhăn có xác suất là $3/4$ trơn : $1/4$ nhăn và của cặp vàng-xanh lục là $3/4$ vàng : $1/4$ xanh lục. Tổ hợp tính trạng trơn trùng với vàng sẽ có xác suất bằng $3/4 \times 3/4 = 9/16$; trơn trùng với xanh lục bằng $3/4 \times 1/4 = 3/16$; vàng trùng với nhăn bằng $3/4 \times 1/4 = 3/16$ và nhăn trùng xanh lục bằng $1/4 \times 1/4 = 1/16$.



Hình 2.8. Lai với hai cặp tính trạng

Quy luật thứ hai của Mendel còn gọi là **quy luật phân li độc lập và tổ hợp tự do** : Các gen của từng cặp trong phân bào giảm nhiễm phân li nhau một cách độc lập với các thành viên của những cặp gen khác và chúng tập hợp lại trong các giao tử một cách ngẫu nhiên.

2. Lai với nhiều cặp tính trạng

Có thể lai với 3 cặp tính trạng hoặc nhiều hơn. Khi lai với 3 cặp tính trạng: AABBCc × aabbcc thì các giao tử F_1 sẽ là ABC, AbC, ABc, aBC, aBc, abC, abc và F_2 có 64 tổ hợp. Để tiện theo dõi người ta tiến hành lai phân tích xác định các loại giao tử. Sự phân li theo kiểu hình ở F_2 sẽ là :

27 A - B - C -

9 A - B - cc

9 A - bb C -

9 aa B - C -

3 A - bb cc

3 aa B - cc

3 aa bb C -

1 aa bb cc

(Dấu gạch ngang (-) sau chữ hoa chỉ allele có thể trội hoặc lặn)

LƯU Ý : Cách viết giao tử : Nguyên tắc khi tạo thành giao tử là mỗi giao tử chỉ chứa 1 trong 2 allele mỗi loại, nên khi viết kiểu gen không được để trùng 2 allele như nhau vào cùng một giao tử. Ví dụ : Không thể có 2A hoặc 2B trong 1 giao tử. Khi xác định số loại giao tử chỉ căn cứ vào số cặp tính trạng dị hợp tử.

Công thức chung của lai đa tính được thể hiện ở bảng sau :

BẢNG 2.2. Các công thức chung của lai

Số cặp tính trạng	Số loại giao tử	Số loại tổ hợp ở F_2	Số kiểu gen F_2	Số kiểu hình F_2
1	2	4	3	2
2	$4 = 2^2$	$16 = 4^2$	$9 = 3^2$	$4 = 2^2$
3	$8 = 2^3$	$64 = 4^3$	$27 = 3^3$	$8 = 2^3$
.....				
n	2^n	4^n	3^n	2^n

3. Một số tính trạng Mendel ở người

Rất nhiều tính trạng của người có sự di truyền theo các quy luật Mendel, ở chương này chỉ nêu một số tính trạng hình thái thường gặp qua các hình ảnh như khớp ngón cái ngược ra sau được hay không, tóc mọc thành đỉnh nhọn ở trán, nhiều tàn nhang, lúm đồng tiền trên gò má, bạch tạng (hình 2.9).



Hình 2.9. Một số tính trạng di truyền theo quy luật Mendel thường gặp ở người

Dái tai của người có thể thông hay liền (hình 2.10). Dái tai thông là trội.



Hình 2.10. Dái tai liền (trái) và thông (phải)

Có 2 gen trội ảnh hưởng đến khả năng cuộn lưỡi (hình 2.11). Một gen tạo khả năng cuộn lưỡi tròn (trái) và gen trội thứ hai cho phép gấp ngược (tỉ lệ 1/1000 người).



Hình 2.11. Khả năng cuộn lưỡi tròn (trái) và gấp ngược (phải)

4. Phương pháp khi - bình phương χ^2

Mendel đã nhấn mạnh rằng những quy luật do ông phát hiện mang tính thuần túy thống kê và sử dụng toán xác suất đánh giá kết quả. Thay vì kẻ bảng Punnett, có thể dùng phương pháp nhân xác suất để giải các bài toán di truyền. Cơ sở của phương pháp này là xác suất (khả năng xảy ra) của **những sự kiện độc lập** với nhau cùng xảy ra một lượt thì bằng **tích** các xác suất của mỗi sự kiện riêng lẻ. Ví dụ : Ném đồng tiền có 2 mặt úp và ngửa.

Xác suất của mỗi mặt là $1/2$ hay 50% trường hợp. Nếu tung đồng tiền liên tiếp 2 lần thì xác suất cả 2 lần đều úp hoặc đều ngửa bằng $1/2 \times 1/2 = 1/4$. Xác suất cả 4 lần đều úp hoặc ngửa cả là $1/2 \times 1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 1/16$.

Phương pháp phân phối - khi bình phương χ^2 là phương pháp toán xác suất làm cơ sở để đánh giá các kết quả thí nghiệm xem có phù hợp với lý thuyết hay không. Phương pháp này do ông Carl Pearson nêu ra vào năm 1900 và có công thức như sau :

$$\chi^2 = \sum (d^2/e).$$

d - sai lệch của kết quả thu được so với tính theo lý thuyết.

e - kết quả tính theo lý thuyết.

Σ - Tổng số.

Ví dụ : Giả sử những thí nghiệm lai dự định có tỉ lệ kiểu hình 1 : 1. Trường hợp 1 có 100 cá thể cho tỉ lệ 45 : 55 thay vì 50 : 50. Trường hợp 2 có 20 cá thể được 5 : 15 thay vì 10 : 10. Vấn đề đặt ra là số liệu thu được có đúng với dự kiến hay phải tìm cách giải thích khác. Muốn vậy phải tìm khi-bình phương (χ^2) của mỗi thí nghiệm.

Bảng χ^2 trường hợp 1

	Kiểu hình I	Kiểu hình II
Số liệu thực tế.	45	55
Giá trị dự kiến (e).	50	50
Sai lệch (d).	- 5	+ 5
Sai lệch bình phương (d^2).	25	25
d^2/e	$25/50 = 0,5$.	$25/50 = 0,5$.

$$\chi^2 = \sum (d^2/e) = 0,5 + 0,5 = 1,0.$$

Bảng χ^2 trường hợp 2

	Kiểu hình I	Kiểu hình II
Số liệu thực tế.	5	15
Giá trị dự kiến (e).	10	10
Sai lệch (d).	- 5	+ 5
Sai lệch bình phương (d^2).	25	25
d^2/e	$25/10 = 2,5$.	$25/10 = 2,5$.

$$\chi^2 = \sum (d^2/e) = 2,5 + 2,5 = 5,0$$

Cần lưu ý rằng trong cả hai trường hợp trên giá trị sai lệch tuyệt đối đều bằng 5, nhưng χ^2 thì khác nhau. Trường hợp 2 có 20 cá thể thí nghiệm thì χ^2 gấp 5 lần so với trường hợp 1 có 100 cá thể. Điều này cho thấy phương pháp χ^2 rất nhạy so với số cá thể thu được trong thí nghiệm.

Trên thực tế số nhóm kiểu hình có thể nhiều hơn 2, và như vậy phương pháp χ^2 phải tính đến số lượng nhóm kiểu hình trừ đi 1. Cụ thể nếu có 2 nhóm kiểu hình thì *mức tự do* là 1, còn có 3 nhóm kiểu hình thì mức tự do là 2.

Trong thí nghiệm có 100 cá thể, nếu kiểu hình I có 45 thì kiểu hình II phải là 55, tức nhóm II phụ thuộc nhóm I, do đó nói có một mức tự do.

Sau khi tính được χ^2 và mức tự do, bước tiếp theo là tra bảng sau đây :

Xác suất đối với một số giá trị χ^2 (P = xác suất)

Mức tự do	$P = 0,20$ (1 trên 5).	$P = 0,10$ (1 trên 10).	$P = 0,05$ (1 trên 20).	$P = 0,01$ (1 trên 100).
1	1,64	2,71	3,84	6,64
2	3,22	4,60	5,99	9,21
3	4,64	6,25	7,82	11,34
4	5,99	7,78	9,49	13,28
5	7,29	9,24	11,07	15,09

Ở trường hợp 1, $\chi^2 = 1$ với mức tự do 1, tra bảng thì có xác suất $P > 0,20$ tức lớn hơn 1 sự kiện trên 5 thí nghiệm. Phần lớn các nhà sinh học công nhận rằng các sai lệch có xác suất bằng hoặc lớn hơn 0,05 (1 trên 20) không được coi là có giá trị thống kê. Như vậy, trường hợp 1 có số liệu phù hợp với giả thuyết phân li 1 : 1.

Trường hợp 2, khi tra bảng $\chi^2 = 5$ thì lớn hơn 3,84 tức $P < 0,05$ tức xác suất nhỏ hơn 0,05 (5% hoặc 1 trên 20) do đó giả thuyết 1 : 1 không đúng, cần kiểm tra lại thí nghiệm hoặc nêu giả thuyết khác để giải thích kết quả. Thông thường có một mức tự do $\chi^2 \geq 3,84$, hai mức tự do $\chi^2 \geq 5,99$ và 3 mức tự do $\chi^2 \geq 7,82$ thì giả thuyết nêu ra được coi là không phù hợp với số liệu thu được.

IV. CÁC PHÁT HIỆN BỔ SUNG

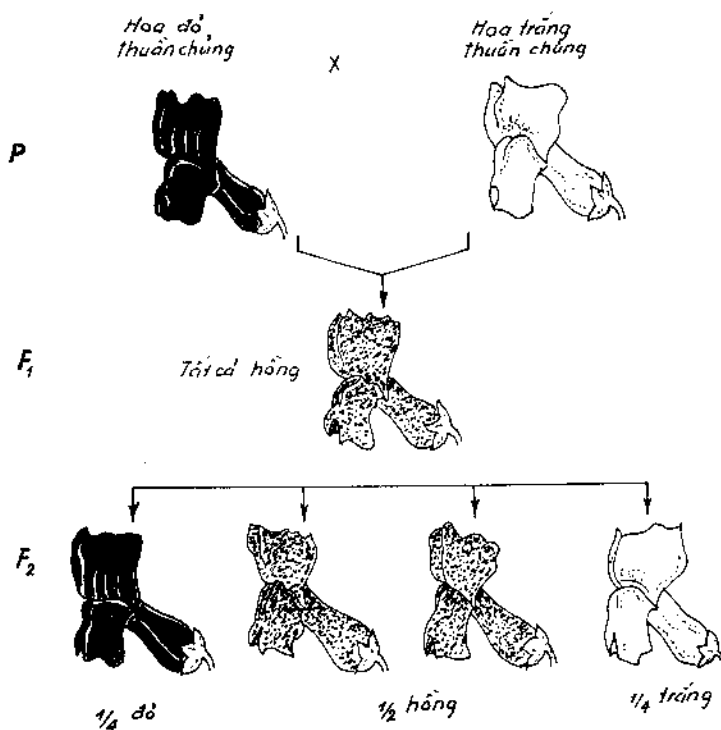
Các nghiên cứu di truyền tiếp theo đã bổ sung một số điểm cho các quy luật Mendel.

1. Trội không hoàn toàn và di truyền tương đương

Ở cây hoa phấn *Mirabilis jalapa*, khi lai hoa đỏ trội thuần chủng với hoa trắng, thế hệ F_1 đồng nhất có hoa hồng và F_2 có tỉ lệ 1 hoa đỏ : 2 hoa hồng : 1 hoa trắng (hình 2.12).

Trong trường hợp này tính **trội không hoàn toàn** hay **trung gian** và tỉ lệ phân li theo kiểu gen và kiểu hình giống nhau.

Ngoài ra còn có sự **di truyền tương đương** khi cả hai allele đều có giá trị như nhau. Ở nhóm máu ABO của người, kiểu gen $I^A I^B$ cho nhóm máu AB.



Hình 2.12. Tính trội không hoàn toàn ở hoa *Mirabilis jalapa*

2. Hiện tượng đa allele

Lúc đầu mỗi gen được hiểu có hai allele tương phản nhau, như gen màu hạt đậu có hai allele vàng và xanh lục. Về sau hiện tượng đa allele được phát hiện : một gen có nhiều hơn hai allele. Nhiều allele của 1 gen tạo nên **dãy đa allele**.

Sự di truyền **nhóm máu ABO** ở người do 3 allele : I^A , I^B và i (I^O). Đây là đa allele nhóm máu của đại gia súc có hơn 100 allele. Sự di truyền màu mắt

đỏ-trắng ở ruồi giấm có đến 12 allele, allele cuối cùng là mắt trắng kí hiệu w (từ chữ *White* - trắng theo tiếng Anh) với tính trội giảm dần theo hướng sau:

$$W^+ > W^{sat} > W^{co} > W^w > W^{ap3} > W^{ch} > W^e > W^{bl} > W^{ap} > W^i > W^t > w$$

(Tương ứng với các màu sau: đỏ đại - đỏ *satsuma* - san hô (*coral*) - rượu nho (*wine*) - trái đào 3 (*apricot 3*) - trái sôri (*cherry*) - son (*eosin*) - máu (*blood*) - trái đào (*apricot*) - ngà voi (*ivory*) - trắng đục (*tinged*) - trắng (*white*).

Vài ví dụ về kiểu gen và kiểu hình như sau: $W^+ W^{bl} \rightarrow$ đỏ hoang đại; $W^{co} W^{bl} \rightarrow$ màu đỏ san hô; $W^{bl} W^i \rightarrow$ đỏ máu; $W^w w \rightarrow$ màu ngà voi. Allele w đứng chung với các allele khác đều không có biểu hiện.

Các allele bất thụ được ở thực vật như ở chi thuốc lá *Nicotiana* tạo dây: $S_1, S_2, S_3, S_4, \dots, S_n$. Dây allele này liên quan đến tính không dung nhau của các giao tử ở thực vật.

3. Sai lệch tỉ lệ phân li và điều kiện biểu hiện đúng

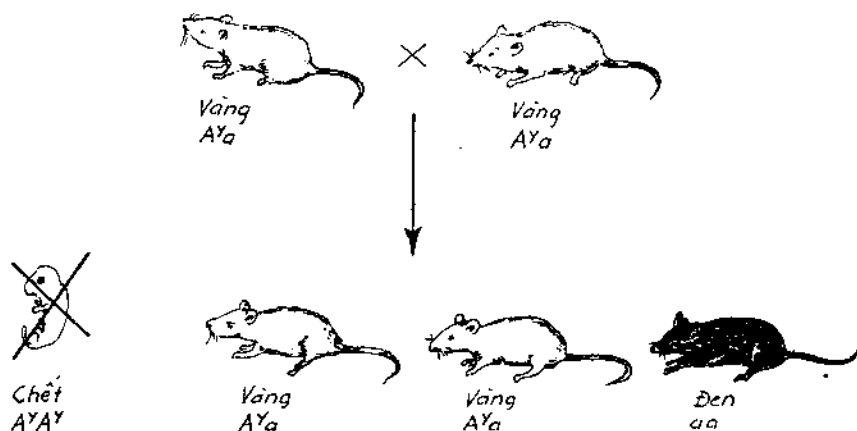
Như đã biết, sự phân tích kết quả lai dựa vào kiểu hình. Kiểu hình có được phải trải qua nhiều quá trình phức tạp của sự phát triển cá thể bắt đầu từ sự tạo thành các giao tử. Trước tiên, số lượng cá thể phải đủ lớn để các số liệu thống kê được chính xác. Ngoài ra, các quy luật Mendel cần những điều kiện sau để có biểu hiện đúng:

- **Sự phân li** nhiễm sắc thể như nhau khi tạo giao tử.
- **Sự kết hợp** như nhau của các kiểu giao tử khi thụ tinh.
- **Sức sống** như nhau của các giao tử và hợp tử.
- **Sự biểu hiện** hoàn toàn của tính trạng ở kiểu hình.

Các quy luật Mendel thật sự là các quy luật sinh học nên sự biểu hiện của chúng không thể tách rời khỏi sự sống của tế bào và cơ thể.

Ngay từ đầu thế kỉ, sự sai lệch khỏi tỉ lệ 3 : 1 ở F_2 đã được phát hiện khi lai các chuột vàng với nhau. Kết quả lai cho tỉ lệ 2 vàng : 1 đen. Hiện tượng này cũng nhận thấy ở cừu, chồn, cá chép, ruồi giấm và nhiều sinh vật khác.

Trong ví dụ chuột vàng lai với nhau, dạng đồng hợp tử trội YY (từ chữ *Yellow* - vàng) chết, nên tỉ lệ F_2 là 2 : 1 như sơ đồ sau (hình 2.13).



Hình 2.13 Sự di truyền màu lông vàng ở chuột đồng

Sự giải phẫu một số chuột cái vàng ($A^Y a$) có chứa trong tổ hợp lai đã xác minh điều đó : trong dạ con có một số bào thai lông vàng dị hình bị chết.

Ở cá chép kính vảy, dạng đồng hợp tử trội chết cũng đã được chứng minh. Bệnh thiếu máu hồng cầu liềm ở người, kiểu gen $H^s H^s$ do thiếu máu trầm trọng nên chết trước khi trưởng thành.

Allele trội màu vàng ở chuột có tác động gây chết. Đây là một ví dụ về **gen gây chết** (lethal). Về sau, các **gen nửa gây chết** (semilethal) và **gen giảm sức sống** (subvital) đã được phát hiện. Các gen này thường làm sai lệch tỉ lệ phân li.

4. Các quy luật chung của tính di truyền

Các quy luật Mendel gọi đúng là các **quy luật truyền đạt** (transmissive) các tính trạng di truyền qua các thế hệ. Từ các nghiên cứu của Mendel, có thể rút một số quy luật chung về tính di truyền như sau :

- Tính di truyền gián đoạn và do các gen.
- Gen có tính ổn định tương đối.
- Gen có các allele khác nhau (trội ,lặn hoặc nhiều hơn).

Cần phân biệt giữa các quy luật chung này với các quy luật Mendel.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Gr.Mendel là người đầu tiên phát minh ra sự di truyền các tính trạng do các *nhân tố di truyền* được gọi là *gen*. Năm 1900, được coi là năm ra đời của di truyền học, khi phát hiện lại và xác minh các quy luật di truyền Mendel ở nhiều động thực vật khác nhau. Hai *quy luật phân li* hay *giao tử thuần khiết* và *phân li độc lập* biểu hiện rõ khi lai đơn tính và đa tính. *Lai phân tích* cho thấy các allele phân li khi tạo thành giao tử. Các hiện tượng *trội không hoàn toàn*, *di truyền tương đương* và *đa allele* là những phát hiện bổ sung làm phong phú thêm khái niệm về gen. Công trình nghiên cứu của Mendel đã đặt nền móng vững chắc cho sự phát triển của di truyền học.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Phương pháp thí nghiệm của Mendel có những đặc điểm gì ?
2. Trong quá trình phát triển của di truyền học, những gì từ thời Mendel được tiếp tục sử dụng đến nay ?
3. Phân biệt lai phân tích với lai ngược.
4. Khi có hiện tượng trội không hoàn toàn và di truyền tương đương thì tỉ lệ phân li kiểu gen và kiểu hình như thế nào ?
5. Thử so sánh ý nghĩa giữa công trình của Darwin và Mendel về các mặt : số phận, quy mô, quá trình nghiên cứu và việc công bố.
6. Sự phân li giao tử có ý nghĩa gì ? Chứng minh.
7. Hiện tượng đa allele có ý nghĩa gì ?
8. Các sai lệch tỉ lệ phân li có mâu thuẫn với các quy luật không?
9. Phương pháp χ^2 được sử dụng trong những trường hợp nào ?
10. Các quy luật Mendel khác với các quy luật chung của tính di truyền như thế nào ?

CÁC BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

1. Gen xác định chiều dài lông tơ của ruồi giấm : allele trội + (dấu + chỉ tính hoang dại nói chung) và allele lặn s cho lông rất ngắn. Lai một ruồi đục hoang dại (lông dài) với ruồi cái ss. Ở F_1 có 850 cá thể thì 418 cá thể có kiểu hình dại và 432 cá thể có kiểu hình ss. Ruồi đục cha có kiểu gen như thế nào? Các cá thể F_2 do kết quả lai giữa ruồi đục F_1 (ss) với ruồi cái F_1 (+) sẽ có kiểu hình như thế nào và với tỉ lệ bao nhiêu ?

Bài giải

- Xét ruồi cha mẹ :

Tính hoang dại là trội, ruồi đực có kiểu hình hoang dại (+) có thể đồng hợp $+/+$ hay dị hợp $+/s$. Lông ngắn lặn, ruồi cái lông ngắn phải là đồng hợp tử lặn s/s .

- Xét F_1 :

Ở F_1 có 2 nhóm kiểu hình với tỉ lệ lai phân tích 1:1. Như vậy các cá thể (+) phải dị hợp tử vì chúng nhận allele + từ cha và 1 allele s từ mẹ. Các cá thể lông ngắn phải đồng hợp tử s/s và chúng phải nhận một s từ cha. Ruồi đực cha có kiểu hình hoang dại (+) phải dị hợp tử $+/s$.

- Xét thế hệ F_2 :

Ruồi cái F_1 có kiểu hình (+) là dị hợp tử $+/s$. Ruồi đực F_1 có kiểu hình (ss) là đồng hợp tử s/s . Ở F_2 tỉ lệ kiểu hình sẽ là 50% (+) và 50% (ss).

2. Ở người màu tóc hoe được xác định do allele lặn r , allele hoang dại r^+ trội quy định màu tóc nâu. Một cặp vợ chồng có hai đứa con : một trai và một gái. Cha mẹ và con trai đều tóc nâu, con gái tóc hoe. Người con trai cưới cô vợ tóc nâu, ba đứa con của họ (hai trai và một gái) đều tóc hoe. Các thành viên của gia đình trên có kiểu gen như thế nào ?

Bài giải

- Cha mẹ :

Cha mẹ đều tóc nâu (r^+), họ mang ít nhất một allele hoang dại r^+ . Con gái của họ tóc hoe phải đồng hợp tử rr . Như vậy cả cha và mẹ đều phải có mang $1r$, nên cha mẹ có kiểu gen dị hợp tử r^+/r .

- Các con F_1 :

Con gái rr . Con trai tóc nâu, nên mang ít nhất 1 allele r^+ . Người con trai này có ba cháu tóc hoe (rr) như vậy anh ta phải mang $1r$. Người con trai có kiểu gen dị hợp tử r^+/r .

- Các cháu (F_2) :

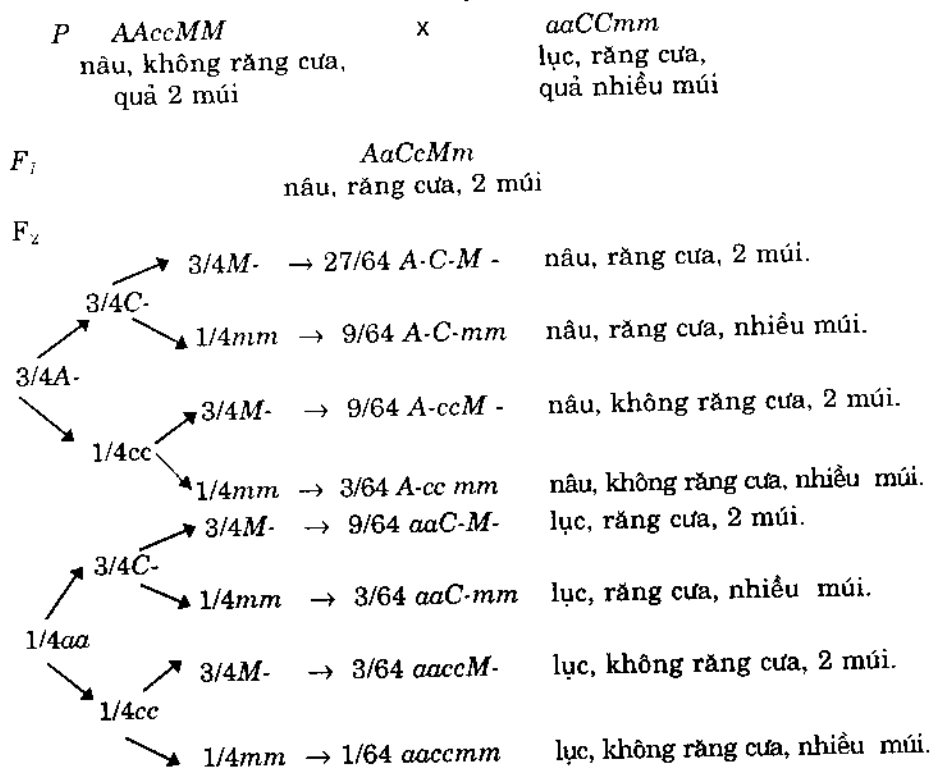
Cả ba cháu đều tóc hoe nên chúng đồng hợp tử rr . Như vậy mẹ chúng truyền cho một allele r , lại có kiểu hình tóc nâu, nên kiểu gen của bà ta là r^+/r .

3. Màu của thân cây cà chua chịu sự kiểm tra của nhiều gen: một trong số đó là allele A tạo thân màu nâu (do có sắc tố anthocyanin), allele lặn a tạo thân cây màu

lục. Về hình dạng lá thì allele C tạo lá có răng cưa, allele lặn c cho lá không răng cưa. Quả cà chua 2 múi do allele trội M , còn cây mm tạo quả nhiều múi.

Dòng cà chua thuần chủng thân nâu, lá không răng cưa, quả 2 múi được lai với dòng thuần chủng thân lục, lá răng cưa, quả nhiều múi. Các cá thể F_1 được lai với nhau. Xác định kiểu hình ở F_2 và các tỉ lệ của chúng.

Bài giải



Có thể giải bằng cách viết ra 8 loại giao tử, rồi cho gặp nhau ngẫu nhiên trên bảng Punnett.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Ở bí allele màu trắng (W) trội so với allele màu vàng (w). Xác định tỉ lệ kiểu gen và kiểu hình từ kết quả của các tổ hợp lai sau.

Cây bí dị hợp tử quả trắng được lai với cây bí quả vàng cho 200 hạt. Trong số đó 110 hạt tạo cây quả trắng, và chỉ 90 hạt tạo cây quả vàng. Sử dụng phương pháp khi - bình phương (χ^2) để xác định sai lệch trên do ngẫu nhiên hay có một nhân tố nào khác làm kết quả phức tạp thêm? Kết quả sẽ

như thế nào nếu có 2000 hạt và 1100 hạt mọc lên cây quả trắng, 900 hạt mọc lên cây có quả vàng ?

2. Nếu người đàn ông mắt nâu kết hôn với người đàn bà mắt xanh và họ có 10 đứa con đều mắt nâu, bạn có thể kết luận người đàn ông đồng hợp tử không ? Nếu người con thứ mười một có mắt nâu có thể kết luận gì về kiểu gen của người cha ?

3. Hai con mèo đuôi ngắn giao phối với nhau sinh ra 11 mèo con trong số đó có 3 không đuôi, 2 đuôi dài và 6 đuôi ngắn. Cách nào đơn giản nhất để giải thích sự di truyền chiều dài lông mèo ? Hãy viết kiểu gen.

4. Khi những con chó Mexico không có lông giao phối với chó có lông bình thường thì một nửa số chó con không lông, một nửa lông bình thường. Tuy nhiên khi 2 chó Mexico không lông giao phối với nhau, khoảng 1/3 số chó con có lông, hai phần ba số chó con không lông và một số chó con dị hình chết lúc mới sinh ra. Giải thích kết quả?

5. Ở heo, allele tạo vết trắng quanh thân trội so với allele có màu đều toàn thân. Một allele của một gen độc lập khác làm dính 2 móng guốc (dính ngón), allele này trội so với allele tạo móng guốc bình thường. Giả sử con heo có màu đều khắp đồng hợp tử về gen dính móng được giao phối với heo móng bình thường đồng hợp tử về vết trắng. F_1 sẽ có kiểu hình như thế nào? Nếu các cá thể F_1 cho giao phối tự do giữa chúng với nhau, thì tỉ lệ kiểu gen và kiểu hình sẽ như thế nào ở F_2 ?

6. Ở dưa hấu các allele màu xanh và quả ngắn trội so với các allele màu sọc dưa và quả dài. Giả sử cây dưa có quả dài màu sọc dưa được lai với cây dị hợp tử ở cả hai tính trạng. Các kiểu hình nào sẽ được tạo ra do tổ hợp lai này và với tỉ lệ bao nhiêu ?

7. Trong một số tổ hợp lai ở chó, allele trội xác định tính trạng sữa khi theo dấu vết. Ở những con chó này allele của một gen độc lập khác tạo lỗ tai thẳng đứng, allele này trội so với allele tai cụp. Giả sử người chọn giống chó muốn tạo một dòng chó thuần chủng tai cụp sữa, nhưng ông ta biết rằng các allele theo dấu vết im lặng (không sữa) và tai đứng có ở trong chủng của ông. Phải tiến hành công việc như thế nào ?

SỰ TƯƠNG TÁC GIỮA CÁC GEN VỚI NHAU VÀ VỚI MÔI TRƯỜNG

Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy có nhiều kiểu *tương tác gen* và những phức tạp trong *biểu hiện của gen* dưới ảnh hưởng của *môi trường* bên trong và ngoài cơ thể. *Kiểu gen* là một thể *thống nhất* và quan hệ chặt chẽ với *môi trường*.

Sau năm 1900, nhiều thí nghiệm kiểm chứng các quy luật Mendel ở các thực vật và động vật khác khẳng định sự đúng đắn của các quy luật Mendel, đồng thời cho thấy tác động của gen phức tạp và đa dạng hơn nhiều.

- Trong nhiều trường hợp có sự tương tác giữa các gen.
- Một gen có thể ảnh hưởng đến nhiều dấu hiệu.
- Ngược lại, nhiều gen có thể ảnh hưởng đến một dấu hiệu.
- Ngoài ra còn có những phức tạp trong biểu hiện của gen do ảnh hưởng môi trường bên trong và ngoài cơ thể.

Như vậy, sự biểu hiện kiểu hình có được do sự tương tác của nhiều gen trong cơ thể và kiểu gen là một hệ thống phức tạp có quan hệ chặt chẽ giữa các gen với nhau và với môi trường. Không có nhân tố di truyền nào *độc lập tuyệt đối* theo quan niệm như Mendel.

I. CÁC KIỂU TƯƠNG TÁC GEN

Trong nhiều trường hợp lai lưỡng tính và đa tính, tỉ lệ các loại kiểu gen vẫn đúng theo các quy luật Mendel, nhưng sự biểu hiện kiểu hình có thay đổi do tác động lẫn nhau giữa các gen. Sự tương tác giữa các gen không allele với nhau được phát hiện đầu tiên là các *sai lệch* tỉ lệ phân li kiểu hình F_2 (9 : 3 : 3 : 1) của lai lưỡng tính. Tuy các nghiên cứu về sau cho thấy tương tác gen có thể do 3 nhân tố di truyền hay nhiều hơn.

1. Tương tác bổ trợ (Complementary)

Tương tác bổ trợ là các allele của mỗi gen riêng lẻ có biểu hiện kiểu hình riêng, khi hai hoặc nhiều gen cùng hiện diện chung sẽ tạo kiểu hình

mới. Tương tác bổ trợ biểu hiện ra nhiều dạng với những tỉ lệ kiểu hình F_2 khác nhau.

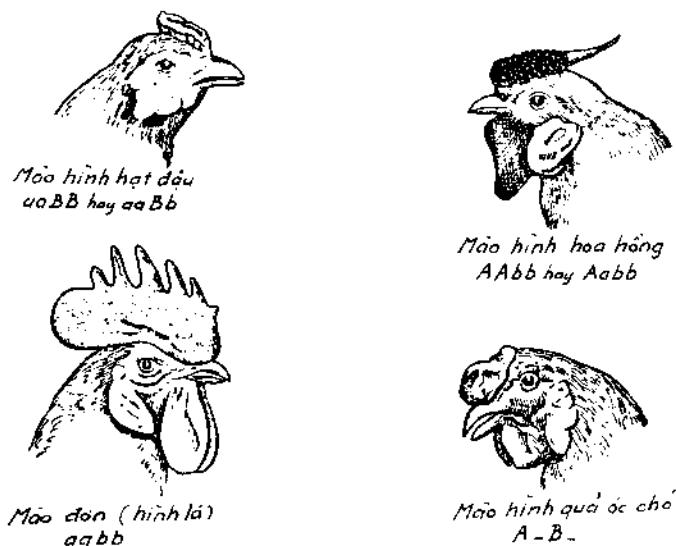
a) Tỉ lệ F_2 là 9 : 3 : 3 : 1

Sự di truyền hình dạng mỏng (mào) gà là một điển hình cho kiểu này (hình 3.1). Đây là tương tác bổ trợ không làm sai lệch tỉ lệ phân li và F_2 có biểu hiện kiểu hình tương ứng với kiểu gen sau :

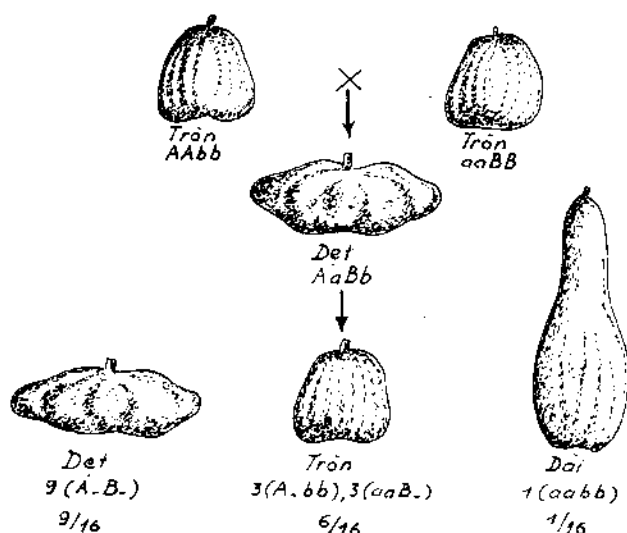
- 9 A-B- : mỏng hình quả óc chó do A và B bổ trợ cho nhau.
- 3 A-bb : mỏng hình hoa hồng do sự biểu hiện riêng của A.
- 3 aa B- : mỏng hình hạt đậu do sự biểu hiện riêng của B.
- 1 aa bb : mỏng đơn (hình lá) do tác động bổ trợ của các allele lặn.

b) Tỉ lệ F_2 là 9 : 6 : 1.

Ở bí đỏ, hai cặp allele xác định hình dạng quả : tròn, dẹt và dài. Mỗi đôi allele A- hoặc B- đứng riêng cho quả tròn. Các dạng A-B- do tương tác bổ trợ của A và B cho quả dẹt. Hai đôi allele lặn kết hợp với nhau tạo quả dài. Lai các bí quả tròn thuần chủng AAbb và aaBB với nhau cho F_1 quả dẹt AaBb và F_2 có tỉ lệ : 9 quả dẹt (9 A-B-) : 6 quả tròn (3 A-bb và 3 aaB-) : 1 quả dài (1 aabb) (hình 3.2).



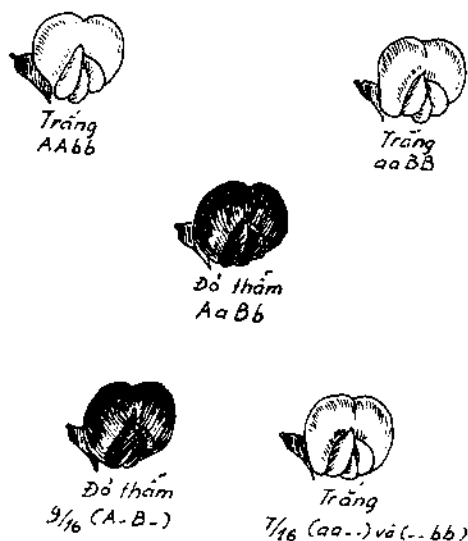
Hình 3.1. Các dạng mỏng gà



Hình 3.2. Tương tác bổ trợ ở bí đỏ

c) Tỷ lệ F_2 là 9 : 7

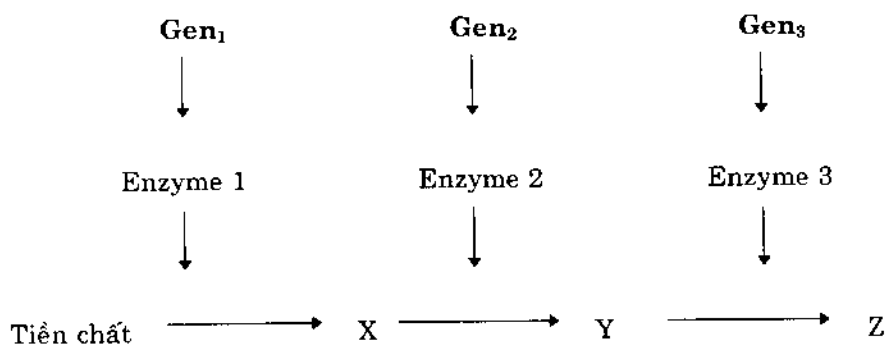
Ở đậu thơm *Lathyrus odoratus*, lai hai dạng hoa trắng với nhau, F_1 có kiểu hình đồng nhất đỏ, F_2 có tỷ lệ 9 đỏ : 7 trắng. Tương tác bổ trợ của A và B tạo nên kiểu hình hoa đỏ. Các dạng chỉ có A hoặc B hoặc aabb đều là hoa trắng.



Hình 3.3. Tương tác bổ trợ ở *Lathyrus odoratus*

Trường hợp tương tác bổ trợ tạo sắc tố đỏ ở hoa có thể nêu giả thuyết giải thích như sau. Sắc tố đỏ được tạo ra nhờ 2 yếu tố : tiền chất A và enzyme B xúc tác phản ứng biến A thành sắc tố đỏ. Các kiểu gen A-bb và aaB- đều thiếu 1 yếu tố và aabb thiếu cả 2 yếu tố nên hoa có màu trắng. Các dạng A-B- có đủ 2 yếu tố nên sắc tố đỏ được tổng hợp.

Từ nguyên tắc này có thể suy rộng ra để hiểu các kiểu tương tác gen nói chung trong chuỗi các phản ứng sinh hóa như sau :



(Enzyme 1 xúc tác phản ứng biến tiền chất thành X, enzyme 2 biến X thành Y và enzyme 3 biến Y thành Z là sản phẩm cuối).

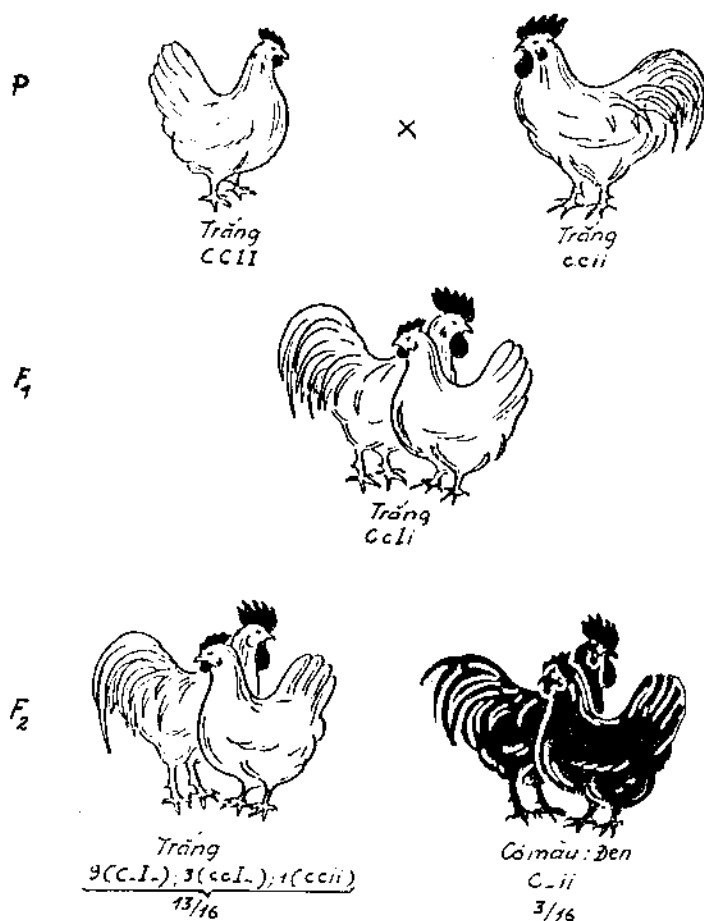
Các gen xác định cấu trúc đặc hiệu của các phân tử protein là những nhân tố nội bào quan trọng như các enzyme, hormone. Nhiều gen xác định một tính trạng thông qua xác định các protein tương ứng. Sự hỗ trợ hoặc làm gián đoạn chuỗi phản ứng cho hiệu quả tương tác gen. Ví dụ, các gen góp thêm cho đủ phản ứng thì có tác động bổ trợ, làm gián đoạn thì gây át chế.

Tỉ lệ 9 : 7 trên đây có thể giải thích cách khác là do 2 gen lặn có tác dụng át chế : aa át chế B- và bb át chế A-.

2. Tương tác át chế (Epistasis)

Khi một gen (trội hoặc lặn) làm cho gen khác không có biểu hiện kiểu hình gọi là át chế. **Át chế trội** xảy ra khi A > B (hoặc ngược lại B > A) và **át chế lặn** khi aa > B (hoặc bb > A).

a) Át chế trội với tỉ lệ 13 : 3



Hình 3.4. Tương tác át chế ở gà.

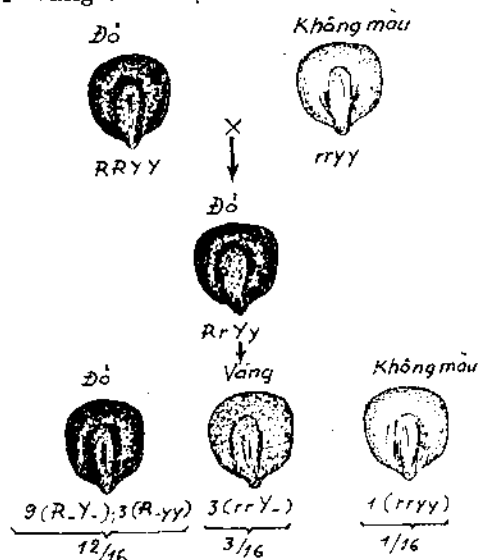
(C (Colored) có màu; I (Inhibitor) át chế; cc và ii là các allele lặn không màu)

Ở gà hai kiểu gen CCII và ccii đều xác định màu lông trắng, nhưng màu trắng ở kiểu gen CCII là do gen C (colored) tạo màu bị gen I (inhibitor) át đi, còn kiểu gen lặn ccii cho kiểu hình trắng là do gen c tạo màu ở trạng thái đồng hợp lặn. Thế hệ F₁ tất cả gà đều trắng do I át chế C. Ở F₂ có 3/16 gà đen theo kiểu gen C-ii, do gen C tạo màu đen không bị át chế.

b) Tương tác át chế trội với tỉ lệ 12 : 3 : 1

Allele trội A kìm hãm sự biểu hiện B ở locus khác. B chỉ biểu hiện ở aaB- aabb có kiểu hình khác.

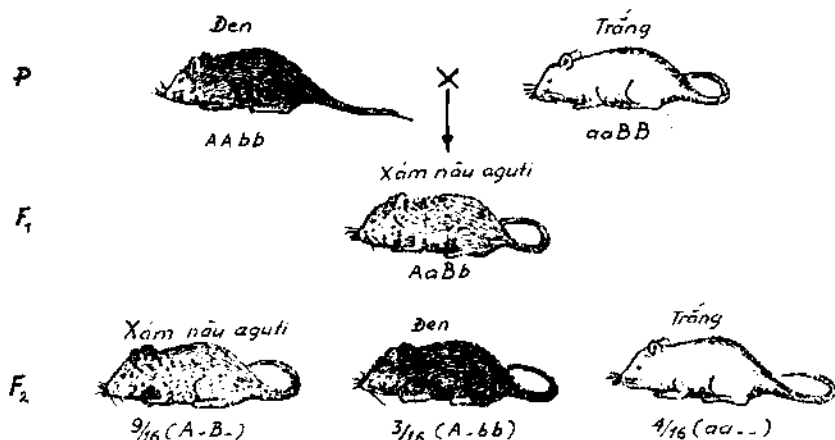
Khi lai bắp hạt đỏ kiểu gen $RRYY$ (R-đỏ (đỏ) và Y-vàng (vàng) với dạng hạt trắng $rryy$ thì bắp F_1 $RrYy$ có hạt đỏ. Bắp F_1 $RrYy$ hạt đỏ lai với nhau cho F_2 với tỉ lệ : 12 đỏ : 3 vàng : 1 trắng (hình 3.5). Trong trường hợp này R-đỏ át không cho Y-vàng biểu hiện.



Hình 3.5. Tương tác át chế trội ở hạt bắp

c) Tương tác át chế lặn (có bổ trợ), tỉ lệ F_2 là 9 : 3 : 4

Khi kiểu gen lặn aa cản trở sự biểu hiện của các allele locus B, gọi là át chế lặn đối với locus B. Một ví dụ của trường hợp này là lai chuột đen $AAbb$ với chuột trắng $aaBB$. Chuột lai F_1 $AaBb$ có màu xám nâu aguti vì sợi lông có hai đầu màu đen, đoạn giữa vàng. Các chuột aguti $AaBb$ lai với nhau cho F_2 : 9 aguti (9 $A-B-$) : 3 đen (3 $A-bb$) và 4 trắng (3 $aaB-$ và 1 $aabb$) như hình 3.6.



Hình 3.6. Tương tác át chế lặn ở chuột

Ở trường hợp này, ngoài tương tác bổ trợ tạo kiểu hình aguti, còn có át chế lặn của aa làm cho 3 aaB- có kiểu hình lông trắng.

Các trường hợp có tỉ lệ phân li ở F_2 tương tự cũng đã được phát hiện ở thực vật (củ hành, bắp v.v.).

Nhiều đột biến át chế liên quan đến những gián đoạn trong chuỗi sinh tổng hợp các chất.

3. Sự di truyền đa gen và các tính trạng số lượng

Trường hợp này có thể coi là một dạng đặc biệt của tương tác bổ trợ, có vai trò quan trọng trong thực tiễn. Năng suất của cây trồng và của gia súc, khả năng chống chịu với các hoàn cảnh bất lợi... đều thuộc kiểu di truyền này.

a) Tương tác cộng gộp

Các tính trạng trong những trường hợp này chịu sự chi phối của nhiều gen nên được gọi là sự **di truyền đa gen**. Mỗi gen riêng (thường là allele trội) đều có biểu hiện kiểu hình ở mức độ nhất định, **nhiều gen đơn** này có **tác động cộng gộp** theo một hướng. Sự phân li kiểu hình của các tính trạng này không cho các tỉ lệ **chất lượng** tương phản rõ rệt như các tỉ lệ Mendel. Các cá thể có biểu hiện kiểu hình dao động khác nhau do nhận nhiều hay ít gen, có thể xếp chúng theo mức độ biểu hiện thành một dãy liên tục nên gọi là **số lượng**.

Tính trạng được nhiều gen xác định, nên biểu hiện kiểu hình của chúng dễ bị biến đổi do tác động của môi trường và việc đánh giá kết quả rất khó, phải sử dụng các công thức toán phức tạp.

b) Tỉ lệ phân li ở F_2

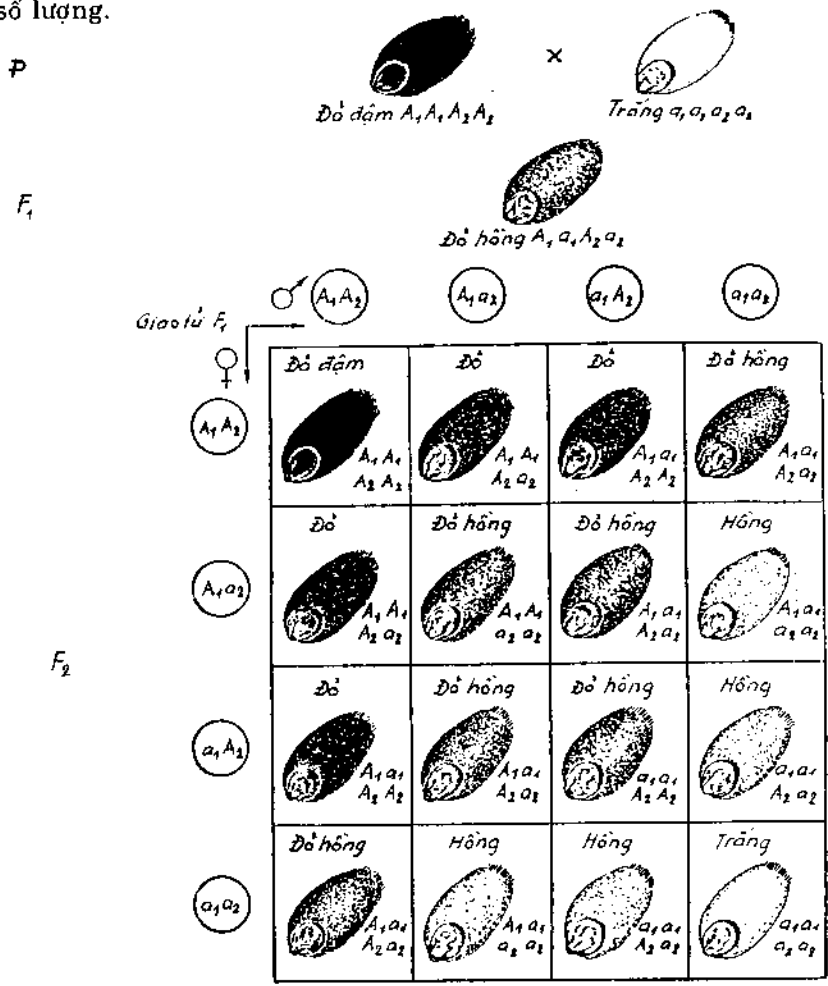
Năm 1908, nhà di truyền học Thụy Điển Nilson-Ehler đã phát hiện tỉ lệ 15 : 1 ở F_2 khi lai lúa mì hạt đỏ đậm với hạt trắng.

Thế hệ F_1 $A_1a_1A_2a_2$ có màu đỏ hồng do mang 2 allele trội A_1 và A_2 , ở F_2 giữa đỏ đậm mang 4 allele A và trắng mang 4 allele a có các mức màu trung gian đỏ (3A) đỏ hồng (2A) và hồng (1A). Sự khác nhau giữa $A_1a_1a_2a_2$ và $a_1a_1a_2a_2$ rất khó phân biệt, chưa kể ảnh hưởng của môi trường.

Cần lưu ý là các allele được kí hiệu cùng một chữ với các số nhỏ kèm theo như A_1 , A_2 , A_3 ... để chỉ cùng có tác động như nhau.

Nếu tính trạng số lượng được xác định do 3 cặp allele thì 64 tổ hợp kiểu hình F_2 sẽ có 7 nhóm kiểu hình với tỉ lệ: 1:6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1. Trường hợp cực đoan có tỉ lệ : 63 : 1. Càng có nhiều cặp gen xác định tính trạng

càng có nhiều nhóm kiểu hình và sự phân biệt giữa những cá thể có kiểu gen gần giống nhau càng khó. Điều này giải thích rõ hơn vì sao gọi là tính trạng số lượng.



Hình 3.7. Sự di truyền đa gen màu hạt lúa mì

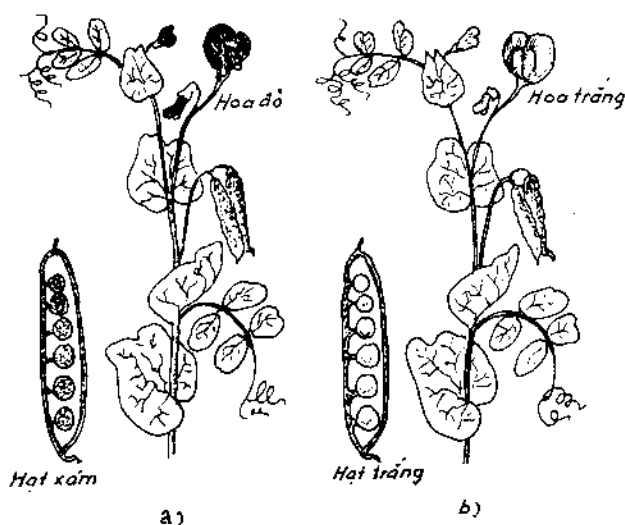
Ở người nhiều tính trạng có sự di truyền số lượng như màu da đen trắng, chiều cao... Sự di truyền màu da đen trắng có thể liên quan đến 3 cặp gen, giữa dạng đen sẫm $A_1A_1A_2A_2A_3A_3$ và dạng trắng $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$ có các màu da đen trung gian. Tỷ lệ phân li giữa da màu và da trắng là 63 : 1. Chiều cao người có thể liên quan đến 10 cặp gen, gen lùn là trội.

Chiều dài trái bắp và màu lông xám ở chuột cũng là những ví dụ về sự di truyền đa gen.

Trên thực tế, sự di truyền đa gen xác định các tính trạng số lượng phức tạp hơn nhiều và chịu ảnh hưởng đáng kể của nhiều nhân tố môi trường.

4. Tính đa hiệu của gen (*Pleiotropy*)

Ngay từ thời Mendel, ông đã nhận thấy một gen có thể tác động đến nhiều tính trạng.



Hình 3.8. Tính đa hiệu của gen

Ví dụ : Ở đậu Hà Lan *Pisum sativum*, một gen ảnh hưởng đến màu hoa và đồng thời cả màu của vỏ hạt, như hoa đỏ hạt xám còn hoa trắng thì hạt trắng (hình 3.8). Hiện tượng một gen ảnh hưởng đến nhiều tính trạng gọi là **tính đa hiệu của gen**.

Sai hỏng gen của bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm ở người gây hàng loạt triệu chứng bệnh khác (xem chương I). Khoảng 25% các bệnh di truyền sai hỏng cấu trúc tim bẩm sinh có thể dẫn đến biến dạng cơ xương (9%), hệ thần kinh trung ương bất thường (4%), sai hỏng đường tiết niệu hay thận (5%) và tiêu hóa (4%).

Trên thực tế có thể nói rằng bất kì gen nào cũng có tính đa hiệu vì mỗi gen không ít thì nhiều đều có ảnh hưởng đến gen khác. Những gen có hoạt động sớm trong quá trình phát triển cá thể sẽ có tác động nhiều hơn và lâu hơn. Các trường hợp được nêu ra chỉ là những ví dụ minh họa cho thấy rõ hiện tượng.

II. SỰ THAY ĐỔI TỈ LỆ KIỂU HÌNH Ở LAI LƯỢNG TÍNH

Đến đây có thể hệ thống lại các loại tỉ lệ kiểu hình F_2 của lai lưỡng tính để thấy rõ sự phức tạp trong biểu hiện của gen ra kiểu hình. Khi lai

lượng tính chúng ta có những tỉ lệ phân li F_2 khác nhau phụ thuộc vào tính trội lặn hoàn toàn hay tương đương, có tương tác gen hay không.

1. Tỉ lệ điển hình 9 : 3 : 3 : 1

Đây là tỉ lệ điển hình, khi 2 gen đều trội hoàn toàn. Tương tác bổ trợ không làm thay đổi tỉ lệ 9:3:3:1, khi mỗi nhóm kiểu gen A-B-, aaB-, A-bb và aabb đều có biểu hiện kiểu hình riêng.

2. Tỉ lệ 1 : 2 : 2 : 4 : 1 : 2 : 1 : 2 : 1

Khi ở 2 gen trội không hoàn toàn hoặc tương đương và không có tương tác gen thì tỉ lệ kiểu hình F_2 trùng với kiểu gen.

3. Tỉ lệ 3 : 6 : 3 : 1 : 2 : 1

Tỉ lệ có được khi chỉ một gen có allele trội hoàn toàn, còn ở gen kia, allele trội không hoàn toàn hoặc tương đương.

4. Tỉ lệ 9 : 6 : 1

Allele trội của mỗi locus có kiểu hình giống nhau, tức các kiểu gen A-bb và aaB- có cùng kiểu hình. Các cá thể A-B- sẽ có biểu hiện kiểu hình bổ trợ hoặc khác. Tỉ lệ kiểu hình 9 : 3 : 3 : 1 sẽ thành 9 : 6 : 1 gồm (9 A-B-) : 6 (3A-bb và 3 aaB-) : 1 aabb.

5. Tỉ lệ 9 : 7

Hai allele trội có tương tác bổ trợ tạo kiểu hình mới, mỗi gen trội riêng cùng kiểu hình với hai gen lặn. 9 A-B- do tác động bổ trợ tạo kiểu hình mới, còn 7 kiểu gen gồm 3 aaB-, 3 A-bb và 1 aabb sẽ có cùng kiểu hình. Có thể giải thích do át chế lặn ở 2 gen.

6. Tỉ lệ 13 : 3

Trường hợp có át chế trội, khi các cá thể 9 A-B- : 3 A-bb và 1 aabb có cùng kiểu hình, còn 3 aaB- có biểu hiện kiểu hình khác.

7. Tỉ lệ 12 : 3 : 1

Đây là hiện tượng át chế trội : các cá thể A-B- và A-bb sẽ có cùng kiểu hình và các cá thể aaB- và aabb có hai kiểu hình khác nên có tỉ lệ 12 : 3 : 1 [12 (A-B- và A-bb) : 3 aaB- : 1 aabb].

Bảng tóm tắt các loại tỉ lệ kiểu hình F_2 trong lai lưỡng tính

Đặc điểm di truyền	Kiểu gen								
	AA BB	Aa BB	AA Bb	Aa Bb	AA bb	Aa bb	aa BB	aa Bb	aa bb
Hai gen đều trội không hoàn toàn	1	2	2	4	1	2	1	2	1
Một gen trội, một gen trội không hoàn toàn	3		6		3		1	2	1
Hai gen trội hoàn toàn (tỉ lệ diễn hình)	9				3		3		1
Át chế trội	12						3		1
Át chế lặn	9				3		4		
Bổ trợ, mỗi allele trội riêng có cùng kiểu hình	9				6				1
Cộng gộp, chỉ đồng hợp lặn có kiểu hình khác	15								1
Bổ trợ, gen trội riêng cùng kiểu hình với lặn hay át chế lặn 2 gen	9				7				
Át chế trội, gen lặn có kiểu hình như trội bị át	13 (có kể vào đây 1 aabb)						3		

8. Tỉ lệ 9 : 3 : 4

Đây là át chế lặn nhưng 2 allele trội tương tác bổ trợ. Các allele B chỉ biểu hiện khi không có aa, đó là 2 loại kiểu hình từ các kiểu gen A-B- và A-bb, nên có tỉ lệ 9 : 3 : 4 [9 A-B- : 3 A-bb : 4 (3 aaB- và 1 aabb)].

9. Tỉ lệ 15 : 1

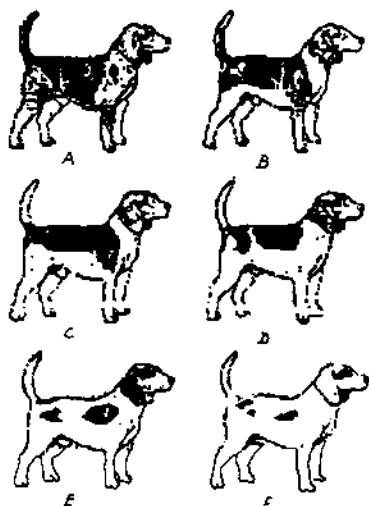
Trường hợp tương tác cộng gộp : khi các cá thể 9 A_1A_2- (A-B-), 3 $A_1-a_2a_2$ (A-bb), 3 $a_1A_1A_2-$ (aaB-) có cùng biểu hiện kiểu hình, còn $a_1a_1a_2a_2$ (aabb) có kiểu hình khác sẽ cho tỉ lệ 15 : 1.

III. NHỮNG PHỨC TẠP TRONG BIỂU HIỆN CỦA GEN

1. Gen biến đổi (*Modifier gene*)

Các gen xác định có tính trạng hay không có tính trạng được gọi là các *gen căn bản* hay *gen nền*. Gen biến đổi (*modifier gene*) là gen không có biểu hiện kiểu hình riêng nhưng ảnh hưởng đến sự biểu hiện kiểu hình của các gen căn bản khác.

Ví dụ : Ở bò, lông đều do gen trội *S*, có đốm do gen lặn *ss*. Bò có đốm hay lông đều không đốm là do các gen căn bản xác định. Nhưng ở bò có đốm, đốm ít hay nhiều là do tác động của các gen biến đổi. Số đốm ở lông chó cũng có sự biểu hiện tương tự : đốm nhiều hay ít do tác động của gen biến đổi.



Hình 3.9. Dao động số lượng đốm ở lông chó do gen biến đổi

2. Các tính trạng bị giới hạn bởi giới tính

Có những tính trạng mà gen của chúng chỉ biểu hiện ở một giới tính được gọi là *gen bị giới hạn bởi giới tính*. Ở đại gia súc có sừng có số lượng sữa và lượng mỡ trong sữa được biểu hiện ở giống cái. Các con bò đực mang các gen xác định lượng sữa và độ mỡ trong sữa mà không có

biểu hiện, nhưng các gen này được truyền cho bò cái con. Do đó trong chọn giống bò sữa phải tuyển các bò đực mang các gen tạo sữa tốt để đem lai. Ở gà trống cũng vậy, chúng mang các gen đẻ trứng nhiều hay ít, lớn hay nhỏ, nhưng không có biểu hiện.

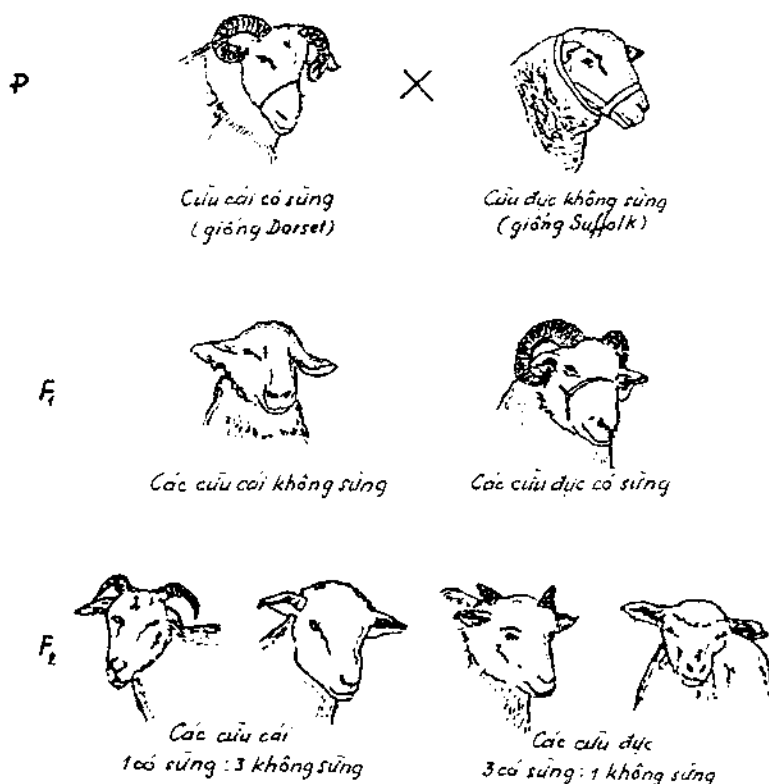
Nhiều gen ở người cũng có sự biểu hiện bị giới hạn bởi giới tính như gen tạo sữa không biểu hiện ở nam giới hay gen mọc râu hầu như không biểu hiện ở nữ giới.

3. Các tính trạng có sự biểu hiện phụ thuộc giới tính

Mặt khác, có những tính trạng mà sự biểu hiện trội hay lặn *phụ thuộc vào giới tính*. Ví dụ, ở đại gia súc có sừng, gen có sừng *H*, gen không sừng *h*. Kiểu gen *HH* sẽ tạo sừng ở cả con đực lẫn con cái, kiểu gen *hh* không có sừng ở cả 2 giới tính. Tuy nhiên kiểu gen dị hợp tử *Hh* nếu ở con đực sẽ có sừng tức allele *H* *trội*, nhưng ở con cái *Hh* lại không có sừng tức *H* lặn. Sau đây là

sơ đồ lai giữa cừu cái có sừng và cừu đực không sừng (hình 3.10).

Thế hệ P : Cừu cái đồng hợp tử HH có sừng, cừu đực đồng hợp hh không sừng. Thế hệ F₁ có kiểu gen Hh thì cừu cái không sừng, con đực có sừng. Ở thế hệ F₂ thì cừu cái có tỉ lệ 1 có sừng : 3 không sừng và cừu đực thì ngược lại là 3 có sừng : 1 không sừng.



Hình 3.10. Gen có sừng ở cừu biểu hiện phụ thuộc giới tính

Ở dê, tính trạng có râu xồm hay không cũng thuộc loại có biểu hiện phụ thuộc giới tính, con đực dị hợp tử có râu xồm, nhưng dê cái dị hợp tử không có râu xồm.

Ở người, hói đầu do gen B (baldness) xác định. Kiểu gen dị hợp tử Bb có biểu hiện trội ở đàn ông, nhưng ở nữ có biểu hiện lặn. Điều này giải thích vì sao ít có phụ nữ hói đầu.

Ngón thứ tư (áp út) của bàn tay người có thể dài hơn hay ngắn hơn ngón thứ hai (trỏ). Người ta cho rằng sự giảm chiều dài của ngón trỏ do 1 gen trội ở nam và lặn ở nữ.

Cần lưu ý : Những ảnh hưởng của giới tính được nêu trên đây không liên quan đến các nhiễm sắc thể giới tính.

4. Độ thấm (*Penetrance*)

Khái niệm *độ thấm* hay *độ thâm nhập* được nêu ra để chỉ mức độ tham gia của allele vào kiểu hình. Ví dụ, người có kiểu gen $I^A I^0$ có nhóm máu A thì I^A có độ thấm 100%, còn I^0 thì 0% vì không "thâm nhập" vào kiểu hình. Trường hợp người có nhóm máu AB thì cả I^A lẫn I^B đều có độ thấm 100%.

Nhiều gen có độ thấm khác nhau và tùy thuộc lứa tuổi. Những người mang gen epiloia, một bệnh di truyền, có người chết sớm có người sống và có thể sinh con. Các gen không thấm vẫn được truyền thụ cho đời sau như các gen có độ thấm hoàn toàn.

Bệnh Alzheimer làm rối loạn trí nhớ, mất định hướng không gian và thời gian, có biểu hiện ở người già sau 60 tuổi. Hiện nay đã xác định được bệnh do một gen trội trên nhiễm sắc thể thứ 14 của người. Đây là trường hợp đặc biệt cho thấy một gen của người có độ thấm sau 60 năm hoặc lâu hơn (ở người 80 tuổi tỉ lệ mắc bệnh này có thể đến 20%). Nhiều nhân vật nổi tiếng thế giới về già mắc bệnh Alzheimer như ngôi sao điện ảnh Rita Hayworth (hình 3.11), cựu tổng thống Mĩ R.Reagan.



Hình 3.11. Ngôi sao điện ảnh Rita Hayworth

5. Độ hiện (Expressivity)

Khái niệm **độ hiện** hay **độ biểu hiện** được dùng chỉ mức độ nhiều ít của tính trạng khi đã thấm hoàn toàn. Ví dụ, sự cảm nhận vị đắng của chất phenylthiocarbamide (PTC) hay không cảm nhận ở người do một gen xác định. Tuy nhiên, những người cảm nhận vị đắng có độ hiện khác nhau thể hiện ở chỗ : có người cảm nhận vị đắng ở nồng độ 1.300mg/l hoặc cao hơn, trong khi đó cá biệt có người cảm nhận vị đắng ở nồng độ rất thấp là 0,16 mg/l, nhiều người khác cảm nhận ở các nồng độ trung gian.

Nhiều tính trạng của người có độ hiện ổn định suốt đời như nhóm máu, màu mắt, v.v.

Cả hai khái niệm độ thấm và độ hiện được nhà di truyền học Nga Timofeev-Resopski nêu ra vào năm 1925 đánh giá mức độ thể hiện ra kiểu hình của các gen.

Ngoài ra, sự biểu hiện của kiểu gen ra kiểu hình còn phụ thuộc mức phản ứng. Những điểm trên cho thấy, việc căn cứ vào kiểu hình để xác định kiểu gen không đơn giản và dễ bị sai lệch.

IV. TÁC ĐỘNG CỦA MÔI TRƯỜNG

Kiểu gen còn chịu nhiều tác động khác nhau của môi trường bên trong và ngoài cơ thể.

1. Tác động của môi trường bên ngoài

Các yếu tố môi trường ngoài rất đa dạng, luôn có nhiều tác động khác nhau ảnh hưởng đến kiểu hình.

a) Nhiệt độ

Tác động căn bản của nhiều gen chủ yếu là kiểm soát tốc độ các phản ứng sinh hóa thông qua các enzyme là những chất được các gen xác định về mặt di truyền. Giữa nhiệt độ và tốc độ phản ứng có sự liên quan chặt chẽ. Nhiệt độ ảnh hưởng rõ đến biểu hiện kiểu hình trong nhiều trường hợp.

Ví dụ rất rõ về ảnh hưởng của nhiệt độ là sự biểu hiện tính trạng lông đen ở chóp mũi, tai và chân của giống thỏ Himalaya. Tính trạng này biểu hiện ở nhiệt độ thấp khi phát triển bộ lông.

Nhiệt độ có thể ảnh hưởng đến độ thấm và độ hiện.

b) Dinh dưỡng

Trong một số trường hợp chế độ dinh dưỡng có thể ảnh hưởng đến biểu hiện kiểu hình. Ví dụ, sự biểu hiện của mỡ vàng ở thỏ do 2 yếu tố : sự hiện diện của gen đồng hợp lặn yy và lượng thực vật xanh (xanthophyll) trong thức ăn. Nếu thiếu thực vật xanh trong thức ăn, mỡ vàng không xuất hiện.

c) Ảnh hưởng của cơ thể mẹ

Sau khi trứng đã được thụ tinh, cơ thể mẹ có thể ảnh hưởng đến sự phát triển. Ví dụ, máu người mẹ có kiểu gen rh (nhân tố rhesus âm) thì nếu đứa con thứ nhất có gen Rh⁺ sinh ra không sao, nhưng đứa con thứ hai có thể bị chết.

Ngoài ra, một số yếu tố khác như ánh sáng có thể có ảnh hưởng đối với một số gen ở thực vật. Tuy nhiên cần lưu ý là các tác động môi trường ngoài được nêu ở đây chỉ ảnh hưởng đến biểu hiện kiểu hình, đó là các thường biến không di truyền.

2. Tác động của môi trường bên trong

Quá trình phát triển cá thể trải qua nhiều bước trung gian phức tạp. Ngay trong cơ thể có nhiều tác động giữa các cấu trúc khác nhau và với kiểu gen như các tương tác : gen với gen, gen - nhiễm sắc thể, nhiễm sắc thể - nhân, nhân - tế bào chất, tế bào - mô,... Ở đây chỉ nêu vài tác động có tính chất chung tổng quát.

a) Tuổi

Nhiều tính trạng di truyền và bệnh di truyền ở người có biểu hiện trong một *độ tuổi* nhất định. Bệnh alkaptonuria (nước tiểu có homogentisic acid bị đen khi có O₂) biểu hiện ngay lúc mới sinh ra. Bệnh vảy cá (ichthyosis) biểu hiện trong 4 tháng đầu. Bệnh tiểu đường và chứng co giật Huntington biểu hiện ở nhiều độ tuổi khác nhau. Bệnh Alzheimer biểu hiện sau 60 tuổi.

b) Giới tính

Giới tính có nhiều ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen đã nêu rõ ở trên như *giới hạn sự biểu hiện* hay *tính trội, lặn phụ thuộc giới tính*. Ngoài ra, có những *gen liên kết với giới tính*. Có thể các hormone sinh dục tác động đến biểu hiện của các gen.

Như vậy, môi trường bên trong và ngoài cơ thể có nhiều ảnh hưởng phức tạp khác nhau lên sự biểu hiện kiểu hình của các gen.

LƯU Ý : Nhiều bệnh ở người như tim mạch, áp huyết,... trước đây không coi là các bệnh di truyền. Quan điểm mới hiện nay cho rằng đó là những bệnh di truyền mà biểu hiện phụ thuộc môi trường. Trên thực tế, các gen liên quan đến các bệnh này được truyền thụ trong các gia đình có bệnh.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Khái niệm **gen - tính trạng** được mở rộng. Giữa các gen có thể xảy ra nhiều kiểu tương tác khác nhau : bổ trợ, át chế, cộng gộp và đa hiệu. Các tính trạng số lượng có sự di truyền đa gen. Trong lai lưỡng tính, tỉ lệ kiểu hình F_2 có nhiều biến dạng. Sự biểu hiện của gen có thể phụ thuộc **các gen biến đổi** và **giới tính**. Môi trường bên ngoài và bên trong cơ thể có nhiều ảnh hưởng khác nhau lên sự biểu hiện kiểu hình của các tính trạng. **Kiểu hình** là kết quả của sự tương tác phức tạp giữa kiểu gen và môi trường. Tuy nhiên, dù sự biểu hiện có thể thay đổi nhưng sự truyền thụ các gen qua các thế hệ vẫn tuân theo các quy luật như quy luật di truyền Mendel.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Phân tích cho thấy kiểu gen là một thể thống nhất.
2. Nêu ví dụ về tương tác bổ trợ mà không thay đổi tỉ lệ F_2 là 9:3:3:1.
3. Át chế trội khác át chế lặn như thế nào ?
4. Thế nào là tính trạng chất lượng và số lượng ?
5. Phân biệt di truyền đa gen và đa hiệu.
6. Tại sao ở người nữ ít thấy hói đầu và không mọc râu ?
7. Độ thâm và độ hiện khác nhau như thế nào ?
8. Bệnh di truyền nào có độ thâm sau 60 tuổi ?
9. Nêu một số tính trạng của người có độ hiện ổn định suốt đời.
10. Nêu một ví dụ : nhiệt độ ảnh hưởng đến biểu hiện kiểu hình.

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

1. Màu lông của chó phụ thuộc vào ít nhất hai gen. Ở một locus, allele trội (I -) át chế các allele B tạo màu ở một locus độc lập khác. Gen I làm cho bộ lông có màu trắng, nhưng khi nó ở đồng hợp tử lặn (ii) thì locus B có màu sẽ biểu hiện ra được. Các

cá thể $iiB-$ có màu đen, các cá thể $iibb$ màu nâu. Khi những con chó trắng dị hợp tử ở cả hai gen giao phối với nhau, hãy xác định :

- Các tỉ lệ kiểu hình xuất hiện ở con lai.
- Xác suất trong số chó con trắng một cá thể đồng hợp tử hai gen.

Lời giải

a)	P	$IiBb$	$\times$	$IiBb$
		trắng		trắng
	Giao tử :	IB, Ib, iB, ib		IB, Ib, iB, ib
	F_1 :	$\left. \begin{array}{l} 9/16 \quad I-B- \\ 3/16 \quad I-bb \end{array} \right\} = 12/16 \text{ trắng}$ $3/16 \quad iiB- = 3/16 \text{ đen}$ $1/16 \quad iibb = 1/16 \text{ nâu}$		

- b) Các con lai màu trắng, nếu xét riêng allele I thì có 2 loại : $1/4 II$ và $1/2 Ii$, nên trong số chúng các kiểu gen khác nhau có tỉ lệ như sau :

Sơ đồ tạo kiểu gen	Trong tổng số F_1	Trong số F_1 trắng
$1/4 II$ gặp $\left\{ \begin{array}{l} 1/4 BB \\ 1/2 Bb \\ 1/4 bb \end{array} \right.$	$1/16 IIBB$ $2/16 IIBb$ $1/16 IIbb$	$1/12$ $2/12$ $1/12$
$1/2 Ii$ gặp $\left\{ \begin{array}{l} 1/4 BB \\ 1/2 Bb \\ 1/4 bb \end{array} \right.$	$2/16 IiBB$ $4/16 IiBb$ $2/16 Iibb$	$2/12$ $4/12$ $2/12$

Trong bảng trên, chỉ có 2 kiểu gen đồng hợp tử ở cả 2 locus là $1/12 IIBB$ và $1/12 IIbb$ tức $2/12$ hay $1/6$ trong các con lai màu trắng. Vậy chúng ta có xác suất bắt gặp kiểu gen đồng hợp tử trong số các chó lai trắng là $1/6$.

2. Màu đỏ của hạt lúa mì do kiểu gen $R-B-$, màu trắng do kiểu gen lặn đôi $rrbb$. Các kiểu gen $R-bb$ và $rRB-$ cho hạt màu nâu. Một chủng đỏ đồng hợp tử được lai với chủng trắng.

- a) Các kiểu hình dự kiến ở F_1 và F_2 như thế nào ?

b) Nếu các cá thể nâu F_2 được lai nhân tạo với nhau (lúa mì tự thụ phấn bình thường) thì các tỉ lệ của các kiểu hình và kiểu gen ở hậu thế sẽ như thế nào ?

Bài giải

a) P	RRBB	×	rrbb
	đỏ		trắng
F ₁	RrBb (đỏ)		
F ₂	9/16 R-B-	=	9/16 đỏ
	3/16 R-bb	}	6/16 nâu
	3/16 rrB-		
	1/16 rrbb	=	1/16 trắng

b) Trước hết phải xác định các tỉ lệ của các kiểu gen khác nhau trong các cá thể F₂ có màu nâu.

BẢNG 1. Sự gặp nhau của các tổ hợp gen tạo kiểu hình nâu F₂

Tổ hợp các gen	Trong số tổng F ₂	Trong số F ₂ nâu
(1/4 RR) (1/4 bb)	1/16 RRbb	1/6
(1/2 Rr) (1/4 bb)	2/16 Rrbb	2/6
(1/4 rr) (1/4 BB)	1/16 rrBB	1/6
(1/4 rr) (1/2 Bb)	2/16 rrBb	2/6
Tổng	6/16	6/6

Các tổ hợp gen với các tỉ lệ như trong bảng trên sẽ gặp nhau một cách ngẫu nhiên để tạo ra các tổ hợp lai khác nhau.

BẢNG 2. Tần số gặp nhau của các tổ hợp gen tạo nên các loại kiểu gen

	1/6 RRbb	2/6 Rrbb	1/6 rrBB	2/6 rrBb
1/6 RRbb	1/36 RRbb × RRbb (1)	2/36 Rrbb × RRbb (2)	1/36 rrBB × RRbb (3)	2/36 rrBb × RRbb (4)
2/6 Rrbb	2/36 RRbb × Rrbb (2)	4/36 Rrbb × Rrbb (5)	2/36 rrBB × Rrbb (6)	4/36 rrBb × Rrbb (7)
1/6 rrBB	1/36 RRbb × rrBB (3)	2/36 Rrbb × rrBB (6)	1/36 rrBB × rrBB (8)	2/36 rrBb × rrBB (9)
2/6 rrBb	2/36 RRbb × rrBb (4)	4/36 Rrbb × rrBb (7)	2/36 rrBB × rrBb (9)	4/36 rrBb × rrBb (10)

(Các số trong ngoặc của các ô vuông bảng 2 chỉ các loại tổ hợp lai khác nhau. Tất cả có 10 loại kiểu lai được nêu chi tiết ở bảng 3.)

Đến đây có thể xây dựng bảng tổng kết nêu rõ tất cả các tổ hợp lai có thể xảy ra, các kiểu gen tương ứng được tạo nên ở hậu thế, tỉ lệ của chúng trong con lai và tần số xuất hiện (bảng 3).

BẢNG 3 : Tổng kết các kiểu lai và kết quả

Các tổ hợp lai	Hậu thế	Các tỉ lệ kiểu gen (f)	Tần số của tổ hợp lai (m)	m.f
1) RRbb × RRbb	RRbb	100%	1/36	1/36
2) RRbb × Rrbb	RRbb	1/2	4/36	4/72
	Rrbb	1/2		4/72
3) RRbb × rrBB	RrBb	100%	2/36	2/36
4) RRbb × rrBb	RrBb	1/2	4/36	4/72
	Rrbb	1/2		4/72
5) Rrbb × Rrbb	RRbb	1/4	4/36	4/144
	Rrbb	1/2		4/72
	rrbb	1/4		4/144
6) Rrbb × rrBB	RrBb	1/2	4/36	4/72
	rrBb	1/2		4/72
7) Rrbb × rrBb	RrBb	1/4	8/36	8/144
	rrBb	1/4		8/144
	Rrbb	1/4		8/144
	rrbb	1/4		8/144
8) rrBB × rrBB	rrBB	100%	1/36	1/36
9) rrBB × rrBb	rrBB	1/2	4/36	4/72
	rrBb	1/2		4/72
10) rrBb × rrBb	rrBB	1/4	4/36	4/144
	rrBb	1/2		4/72
	rrbb	1/4		4/144

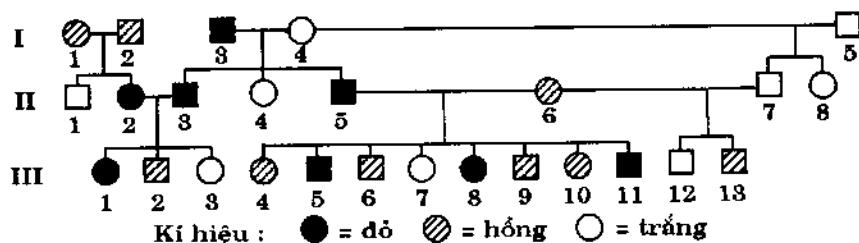
Tóm tắt các kiểu gen :

2/9 RrBb
1/9 RRbb
2/9 Rrbb
1/9 rrBB
2/9 rrBb
1/9 rrbb

Tóm tắt các kiểu hình :

2/9 R- B- = 2/9 đỏ
1/3 R -bb
= 2/3 nâu
1/3 rrB-
1/9 rrbb = 1/9 trắng

3. Sự di truyền màu của heo qua 3 thế hệ được trình bày ở sơ đồ phả hệ sau đây:



Căn cứ tỉ lệ kiểu hình nhận được do lai II-5 × II-6, bạn nghĩ gì về phương thức di truyền của tính trạng màu này ?

Bài giải

Trước hết cần ghi nhận rằng trong phả hệ có ba kiểu hình khác nhau. Điều này loại bỏ những hiện tượng gen át chế chỉ tạo hai kiểu hình như trường hợp át chế trội (13 : 3), tương tác cộng gộp hai gen trội (15 : 1) hoặc hai gen lặn biểu hiện cùng kiểu hình (9 : 7). Các hiện tượng át chế cho ba kiểu hình là : át chế trội (12 : 3 : 1), át chế lặn (9 : 3 : 4), tương tác bổ trợ của hai gen trội (9 : 6 : 1). Để giải bài toán cần nêu giả thuyết giải thích các kiểu hình khác nhau.

Trường hợp 1 :

Chúng ta hình dung hiện tượng át chế trội. Có thể viết các kiểu gen chịu trách nhiệm ba kiểu hình như sau : A-B- và A-bb = kiểu hình 1. aaB- = kiểu hình 2 và aabb = kiểu hình 3. Cần xác định kiểu hình nào tương ứng với kiểu gen trên. Chỉ một kiểu hình tương ứng với dòng thuần chủng là kiểu thứ ba. Tất cả hậu thế của lai aabb × aabb cùng có kiểu gen như cha mẹ chúng. Tổ hợp lai I- 4 × I- 5 dường như đáp ứng yêu cầu đó và chúng ta coi giả thuyết đúng với màu trắng. Các tổ hợp lai giữa các cá thể có gen A át chế trội (ví dụ AaBb × AaBb) cho 3 loại hậu thế. Kiểu lai II - 2 × II - 3 là tổ hợp lai kiểu đó. Dường như màu đỏ có kiểu gen A. Còn lại cuối cùng là màu hồng, nó phải do kiểu gen aaB-. Nếu điều này đúng thì các tổ hợp lai giữa các con hồng chỉ cho hậu thế hồng (aaB-) và trắng (aabb). Vì lai (I - 1 × I - 2) giữa hai cá thể hồng cho hậu thế trắng và đỏ (II - 1, II - 2). Như vậy, giả thuyết đầu tiên nêu ra này là sai.

Trường hợp 2 :

Thử hình dung trường hợp át chế lặn. Các kiểu gen có thể như sau : A- B- = kiểu hình 1. A-bb = kiểu hình 2. aaB- và aabb = kiểu hình 3. Giống như ở trên, chỉ lai giữa cá thể AaBb mới tạo được ba loại hậu thế từ các bố mẹ cùng kiểu hình. Màu đỏ như vậy có kiểu gen A-B- (II - 2 $\times$ II - 3). Lai giữa các cá thể trắng aabb chỉ cho cá thể trắng (I - 4 $\times$ I - 5). Màu hồng sẽ do kiểu gen A-bb. Lai giữa hồng $\times$ hồng (I - 1 $\times$ I - 2) không thể tạo hậu thế đỏ. Giả thuyết này cũng không đúng.

Trường hợp 3 :

Thử hình dung tác động 2 gen có hiệu quả bổ trợ. Các kiểu gen có thể như sau : A-B- = kiểu hình 1, A-bb và aaB- = kiểu hình 2 và aabb = kiểu hình 3. Như trong cả hai trường hợp A-B- phải đỏ và aabb phải trắng. Trong tổ hợp lai II-5 (AaBb) đỏ $\times$ II- 6 (aaBb) hồng cho ba loại hậu thế với tỉ lệ như sau :

Đỏ	A-B-	=	1/2. 3/4	=	3/8
Hồng	A-bb	=	1/2. 1/4	=	1/8
	aaB-	=	1/2. 3/4	=	3/8
Trắng	aabb	=	1/2. 1/4	=	1/8

Ta cũng có các tỉ lệ như trên nếu II - 6 là Aabb. Các dự kiến này tương ứng với số liệu do lai III - 4 và III.11.

Như vậy giả thuyết thứ ba này cho rằng có hai gen trội mà hiệu quả bổ sung là đúng, phù hợp với các kết quả thu được.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Ở bí đỏ, sự vắng mặt của màu ở quả (trắng) do một gen trội (W), có màu do allele lặn (w). Màu vàng được xác định do một gen độc lập khác (G) và màu xanh do allele lặn tương ứng (g). Khi các cây dị hợp tử của 2 gen được lai với nhau, người ta nhận được F₁ với tỉ lệ 12 cây quả trắng : 3 cây quả vàng: 1 cây quả xanh. Sẽ nhận được các tỉ lệ như thế nào khi thực hiện các tổ hợp lai sau đây :

- Wwgg $\times$ WwGG
- WwGg $\times$ cây có quả xanh
- Wwgg $\times$ wwGg
- WwGg $\times$ Wwgg

e) Khi lai 2 cây, người ta nhận được các cây con với tỉ lệ một nửa số cây có quả vàng, một nửa số cây có quả xanh. Các cây cha mẹ có kiểu gen và kiểu hình như thế nào ?

2. Ở bắp (ngô), hạt có màu khi gen trội A_1 được kết hợp với gen trội A_2 , A_2 có sự di truyền độc lập với A_1 . Đối với tất cả các tổ hợp di truyền khác, hạt không có màu. Lai giữa hai dòng thuần chủng hạt không màu cho F_1 đồng nhất có màu.

a) Các kiểu gen của các dòng cha mẹ và F_1 như thế nào ?

b) Các tỉ lệ kiểu hình F_2 sẽ như thế nào ?

c) Các kiểu gen khác nhau của các cá thể F_2 hạt trắng và tần số của chúng như thế nào ?

3. Hai cặp allele xác định màu củ hành. Hai dòng thuần chủng một đỏ, một trắng được lai với nhau ; F_1 đồng nhất đỏ ; F_2 gồm 47 cây củ trắng, 38 cây củ vàng và 109 cây củ đỏ.

a) Tỉ lệ nào gần đúng với các số liệu trên ?

b) Ở đây có kiểu tương tác gen nào ?

c) Trong một F_2 khác của cùng kiểu lai, 8 củ là lặn kép. F_2 đó gồm những kiểu gen và kiểu hình gì ?

4. Người ta biết được nhiều gen xác định màu hạt bắp : A, C và R. Cả 3 gen này đều cần để hạt có màu. Locus của một gen át chế trội đối với màu của hạt là I liên kết rất chặt với C. Các kiểu gen sau đây (đơn độc hay kết hợp) tạo hạt không màu : I-, aa-, cc- hay rr-.

a). Trong số các cá thể F_2 của một tổ hợp lai $AAIICCRR \times aaiiCCRR$, phần cây hạt có màu chiếm tỉ lệ bao nhiêu ?

b). Trong số các cá thể F_2 không màu, về mặt lí thuyết các cá thể đồng hợp tử chiếm tỉ lệ bao nhiêu ?

5. Ở củ hành, một gen (I) kìm hãm sự tạo sắc tố, thể hiện át chế trội đối với locus R. Kiểu gen iiR- tương ứng với củ đỏ và kiểu gen iirr cho củ vàng.

a) Trong một tổ hợp lai giữa hai dòng thuần chủng một trắng và một đỏ, tất cả F_1 đều củ trắng và ở F_2 nhận được tỉ lệ sau : 12 trắng, 3 đỏ và 1 vàng. Kiểu gen của các bố mẹ như thế nào ?

b) Nếu các cây hành được lai với một dòng thuần chủng trắng có kiểu gen khác với của câu a, các tỉ lệ kiểu hình nhận được ở F_1 và F_2 sẽ như thế nào ?

c) Trong số các cây hành con củ trắng F_2 của câu hỏi (a), 32 cây có kiểu gen IIRR thì số cá thể trong mỗi nhóm kiểu hình trắng, đỏ và vàng của F_2 đó là bao nhiêu ?

6. Để cho các hạt bắp có màu, cần có các allele trội của 3 gen khác nhau (A, C, R). Người ta biết một locus thứ tư có quan hệ phụ thuộc vào 3 locus kia, sự có mặt allele trội của nó (Pr) làm cho sắc tố đỏ tía (pourpre) còn allele lặn (pr) xác định màu đỏ của hạt.

a) Các tỉ lệ kiểu hình F_1 và F_2 sẽ như thế nào nếu lai dòng đỏ có kiểu gen AACRRR prpr với dòng không màu AACrrPrPr ?

b) Nếu lai các cá thể hạt đỏ của F_2 với nhau, các tỉ lệ kiểu gen và kiểu hình F_3 sẽ như thế nào ?

7. Khi lai các củ hành trắng với nhau, lai đơn tính và cùng kiểu gen người ta được các con lai với tỉ lệ 3 trắng : 1 màu. Ngược lại, một số tổ hợp lai đơn tính của các cây củ hành màu, nếu chúng có cùng kiểu gen, tạo ra 3 có màu và 1 trắng. Trắng át chế có màu. Cả hai gen trên di truyền độc lập nhau.

a) Lai một dòng củ trắng đồng hợp tử đối với 2 allele trội với một dòng lặn kép : sẽ nhận được gì ở F_1 và F_2 ?

b) Đây là kiểu tác động gì ?

c) Gọi I và C là 2 allele trội. Người ta biết rằng các củ hành có kiểu gen I-C- sẽ trở nên vàng khi có mặt của khí ammoniac còn các củ hành trắng kiểu gen cc không vàng trong những điều kiện như vậy. Lai một cây trắng có thể vàng khi có khí ammoniac với một cây trắng không có khả năng đổi màu. Người ta nhận được các cây con trắng và có màu với tỉ lệ 7/8 : 1/8. Các kiểu gen của cây cha mẹ như thế nào ?

d) Lai một cây trắng có khả năng biến màu với một cây có màu : nhận được các cây con lai có màu và trắng với tỉ lệ 3 : 5. Các kiểu gen của các cây cha mẹ ?

8. Ở chuột, ba cặp gen độc lập nhau ảnh hưởng đến màu lông. Chuột bạch có kiểu gen đồng hợp tử lặn của cả 3 cặp allele aa, bb và cc. Giả sử có 4 dòng thuần chủng chuột bạch, và lai mỗi dòng với dòng hoang dại. Trong mỗi trường hợp thế hệ F_2 được tạo ra, các kiểu gen nào của các dòng chuột bạch có thể suy ra từ số lượng của thế hệ F_2 sau đây :

F_2 của dòng	Kiểu hoang dại	Không agouti (đen)	Màu quế	Chocolate	Trắng
1	87	0	32	0	39
2	62	0	32	0	18
3	96	30	0	0	41
4	287	86	92	29	164

DI TRUYỀN HỌC NHIỄM SẮC THỂ

Tế bào là đơn vị cơ sở của sự sống. *Sự sinh sản* của tế bào cùng các cấu trúc của chúng là cơ sở của các quá trình di truyền. Từ năm 1910, những nghiên cứu của nhóm T.H. Morgan đã đưa di truyền học lên một bước phát triển mới *kết hợp với tế bào học*. Các *gen* được chứng minh là nằm trên *nhiễm sắc thể*. Sự ra đời của *học thuyết di truyền nhiễm sắc thể* đánh dấu thời kì phát triển mạnh mẽ thứ hai của di truyền học.

I. T.H.MORGAN VÀ THUYẾT DI TRUYỀN NHIỄM SẮC THỂ.

1. Các phát minh tế bào học cuối thế kỉ 19

Những người đương thời với Mendel không hiểu các quy luật di truyền của ông, một phần do chưa biết các cơ chế phân bào. Mãi đến năm 1870 cơ chế *nguyên phân* (mitosis) mới được mô tả, phân bào *giảm nhiễm* (meiosis) được tìm ra vào năm 1890. Như vậy, đến cuối thế kỉ 19 các nhà sinh học mới tìm thấy mối *tương quan đồng điệu* giữa sự biểu hiện của nhiễm sắc thể trong phân bào với sự biểu hiện của các nhân tố Mendel. Ví dụ, các nhiễm sắc thể và gen đều có cặp ở tế bào lưỡng bội ($2n$), *các cặp nhiễm sắc thể tương đồng mang các cặp allele tách nhau ra, phân li* trong chia giảm nhiễm và sự thụ tinh giữa các giao tử đã tổ hợp lại các cặp nhiễm sắc thể và các gen.

Vào khoảng năm 1902 - 1903 W.S.Sutton, Th.Bovery và một số người khác đã độc lập nghiên cứu với nhau và cùng nhận thấy *sự tương quan đồng điệu* đó. Lần đầu tiên họ nêu lên quan điểm về sự di truyền của nhiễm sắc thể, cho rằng các *gen nằm trên nhiễm sắc thể* và chúng chịu sự *phân li* như các nhiễm sắc thể.

Năm 1905, E.Wilson đã nêu lên những điểm căn bản của *thuyết nhiễm sắc thể xác định giới tính*. Việc phát hiện có sự khác nhau giữa các cá thể đực và cái ở một cặp nhiễm sắc thể đã cung cấp dữ kiện quan trọng để xây dựng học thuyết di truyền nhiễm sắc thể.

2. Sơ lược tiểu sử của T.H. Morgan (1866 - 1945)

Thomas Hunt Morgan là một nhà phôi học (embryologist), ở trường Đại học Columbia (Mĩ). Năm 24 tuổi ông nhận được bằng tiến sĩ (Ph.D.) và năm 25 tuổi được phong giáo sư (hình 4.1).

Thoạt đầu ông không tán thành các quy luật di truyền Mendel và thuyết di truyền nhiễm sắc thể. Ông dự trù kinh phí xin tiến hành thí nghiệm lai ở thỏ, nhưng không được chấp nhận vì kinh phí quá lớn. Cuối cùng ông ta đã **chọn ruồi giấm *Drosophila melanogaster*** làm đối tượng nghiên cứu và phòng thí nghiệm của ông sau đó được gọi là "**phòng thí nghiệm ruồi**" (The "Fly" room).



Hình 4.1. T.H.Morgan

Tham gia nghiên cứu với T.H. Morgan có 3 nhà di truyền học nổi tiếng là C. Bridges, A.H. Sturtevant và G. Muller. Nhóm nghiên cứu này đã chứng minh các nhân tố di truyền Mendel nằm trên nhiễm sắc thể. **Học thuyết di truyền nhiễm sắc thể** xác nhận sự đúng đắn của học thuyết về gen của Mendel, cho thấy các gen có **cơ sở vật chất**, gắn chặt với cấu trúc của tế bào. Tên tuổi Morgan gắn với Mendel, di truyền học cổ điển có lúc được gọi là **di truyền học Mendel - Morgan**. Ông nhận giải thưởng Nobel vào năm 1934.

3. Ruồi giấm *Drosophila melanogaster*

Ruồi giấm là một loại ruồi nhỏ có thân xám trắng, mắt đỏ,

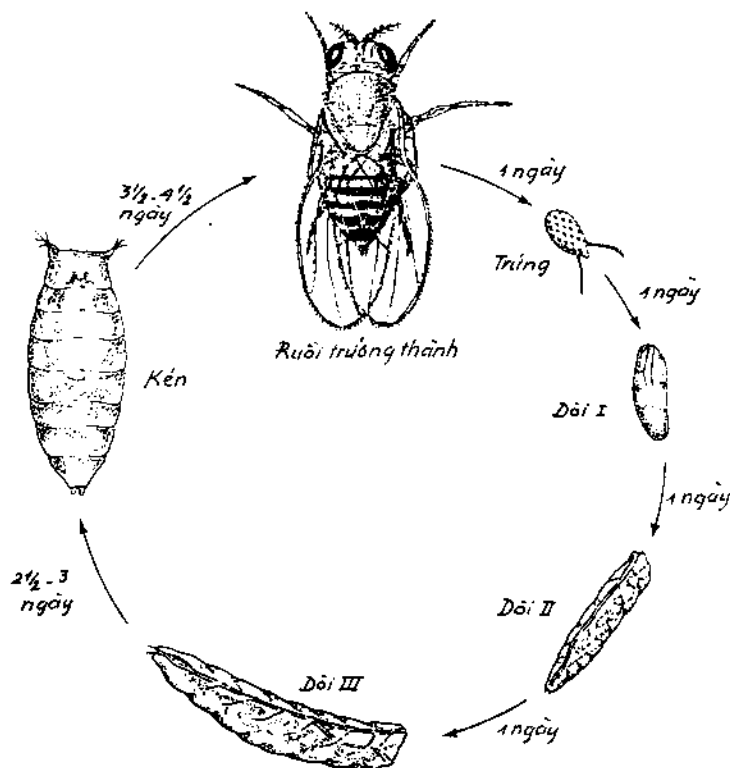
thường bu vào các trái cây chín. Nó là một đối tượng mang nhiều đặc điểm rất thuận lợi cho các nghiên cứu di truyền :

– **Chu trình sống ngắn** : Toàn bộ quá trình từ trứng nở ra dòi, rồi nhộng và ruồi trưởng thành ở 25°C chỉ có 10 ngày (hình 4.2). Từ một cặp ruồi trung bình đẻ ra khoảng 100 ruồi con.

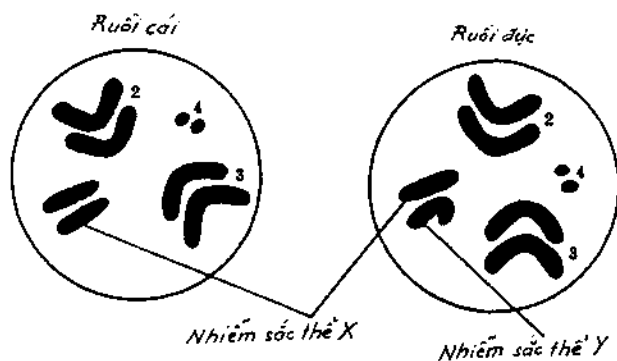
– **Các tính trạng biểu hiện rõ ràng** : Năm 1910 Morgan nhận được đột biến đầu tiên là mắt trắng, kí hiệu w (White là trắng). Cho đến nay đã nhận được ở ruồi giấm hơn 400 đột biến ảnh hưởng đến nhiều tính trạng khác nhau. Các tính trạng đầu tiên đưa vào thí nghiệm như tính trạng mắt đỏ được gọi là tính hoang dại (thường kí hiệu dấu +).

– **Để nuôi** trên môi trường nhân tạo, ít choán chỗ trong phòng thí nghiệm và dễ lai giữa chúng với nhau.

– Bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội có 8 cái gồm 6A và XX (con cái) hay XY (con đực)(hình 4.3). Ngoài ra còn có các **nhiễm sắc thể khổng lồ** để quan sát ở tế bào của tuyến nước bọt.



Hình 4.2. Ruồi giấm và chu trình sống



Hình 4.3. Bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội của ruồi giấm

Nhờ những ưu thế vừa nêu trên, các nghiên cứu ở ruồi giấm đã xây dựng nên thuyết di truyền nhiễm sắc thể và cho đến nay nó vẫn là đối tượng nghiên cứu hàng đầu của di truyền học.

4. Về kí hiệu gen

Ở *Drosophila* các kí hiệu chuyên biệt được dùng để chỉ các allele khác nhau so với allele "bình thường". Các kí hiệu này được sử dụng rộng rãi.

Đối với một allele nhất định rất thường gặp trong quần thể tự nhiên, allele đó cũng hiện diện trong các phòng thí nghiệm chuẩn, chúng được gọi là **kiểu hoang dại** (wild-type). Tất cả các allele khác đều **không hoang dại**. Kí hiệu để chỉ gen bắt nguồn từ chữ Anh của allele không hoang dại tìm thấy **đầu tiên** như đột biến màu mắt trắng (white) được kí hiệu w. Allele hoang dại tương ứng được kí hiệu w⁺ hay W (trội) hoặc đơn giản dấu + hay +^w.

Trường hợp có vài allele hoang dại phổ biến trong thiên nhiên như ở gen alcohol dehydrogenase của *Drosophila* thì kí hiệu như sau Adh^S và Adh^F (chữ phụ S phía trên từ chữ slow và F là fast movement - chỉ sự di chuyển **chậm** và **nhANH** khi điện di trên gel của enzyme alcohol dehydrogenase).

BẢNG 4.1 : So sánh hai hệ thống kí hiệu gen

Hệ thống kí hiệu	Allele biến dạng lặn (a)		Allele biến dạng trội (A)	
	Kí hiệu hoang dại	Kí hiệu allele biến đổi	Hoang dại	Không hoang dại
Bình thường / khác thường	a ⁺ (hay + ^a = +)	a (hay a ⁻)	A ⁺ (hay + ^A = +)	A (hay A ⁻)
Theo Mendel	A	a	a	A

Các allele hoang dại không phải lúc nào cũng trội. Allele cánh vênh là trội nên kí hiệu chữ hoa Cy (Curly) so với hoang dại Cy⁺.

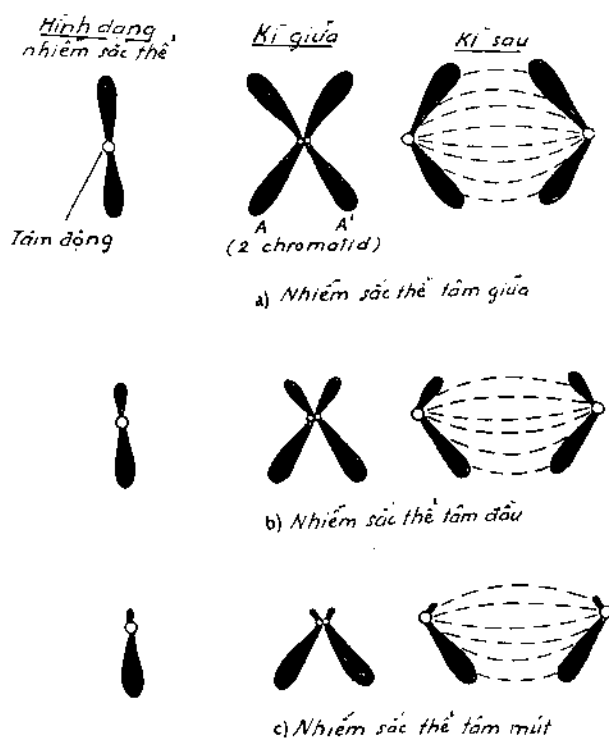
Kí hiệu allele ở ruồi cho thấy được **nguồn gốc** của chúng so với dạng hoang dại khi đưa từ thiên nhiên vào phòng thí nghiệm để nuôi. Các kí hiệu của Mendel không nói lên được nguồn gốc của allele.

II. NHIỄM SẮC THỂ

1. Hình thái nhiễm sắc thể

Khi nhuộm tế bào đang phân chia bằng một số màu base, có thể nhìn thấy dưới kính hiển vi thường các cấu trúc hình que **nhuộm màu đậm**, nên

được gọi là **nhiễm sắc thể** (chromosome = chromo - màu + some - thể, có nghĩa thể nhuộm màu). Mỗi nhiễm sắc thể có hình dạng đặc trưng, rõ nhất ở **kì giữa** (metaphase) của nguyên phân. **Tâm động** (centromere) là điểm thắt eo chia nhiễm sắc thể thành 2 vai với chiều dài khác nhau. Theo quy ước chung, vai ngắn hơn được gọi là **vai p** và **vai q** dài hơn. Dựa vào vị trí tâm động, có thể phân biệt hình thái các nhiễm sắc thể: **tâm giữa** (metacentric) khi 2 vai bằng nhau, **tâm đầu** (acrocentric) khi 2 vai không bằng nhau và **tâm mút** (telocentric) khi tâm động nằm gần cuối (hình 4.4). Trên nhiễm sắc thể có thể thấy các vệt đậm hơn, gọi là **chromomere** (vết nhiễm sắc).

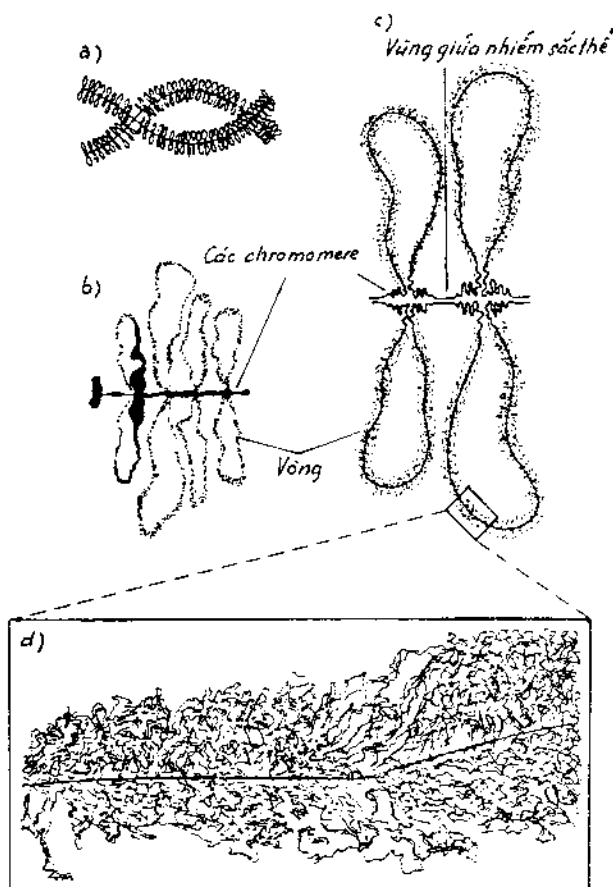


Hình 4.4. Sơ đồ các kiểu nhiễm sắc thể ở kì giữa và kì sau

Ở các tế bào dinh dưỡng (soma) mỗi nhiễm sắc thể có một cặp giống nhau về hình thái, được gọi là các **nhiễm sắc thể tương đồng hay đồng đẳng** (homologous). Bộ nhiễm sắc thể có cặp gọi là **lưỡng bội (2n)** và **đơn bội (n)** khi mỗi nhiễm sắc thể chỉ có 1 chiếc.

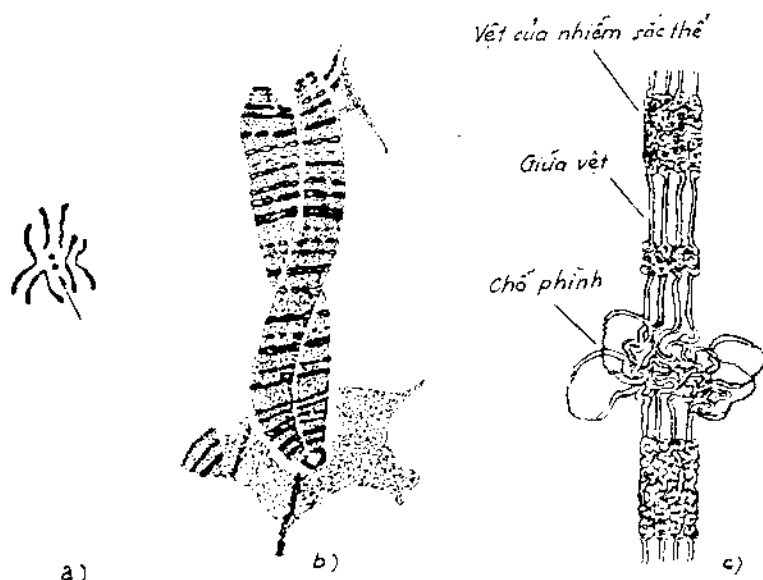
Ngoài ra, ở nhiều động vật có sự khác nhau giữa cá thể đực và cái ở một cặp **nhiễm sắc thể giới tính** (sexual).

Tế bào một số mô có các **nhiễm sắc thể khổng lồ** như ở tuyến nước bọt của ruồi giấm (hình 4.6) và **nhiễm sắc thể chổi đèn** (lambrush chromosome) ở một số tế bào trứng của một loài lưỡng cư (hình 4.5).



Hình 4.5. Nhiễm sắc thể chổi đèn ở *Triturus viridescens*

- a) Nguyên dạng ;
- b) Phóng to một đoạn của a ;
- c) Phóng to một đoạn của b ;
- d) Phóng to một đoạn của c.



Hình 4.6. Nhiễm sắc thể khổng lồ ở tuyến nước bọt của *Drosophila*

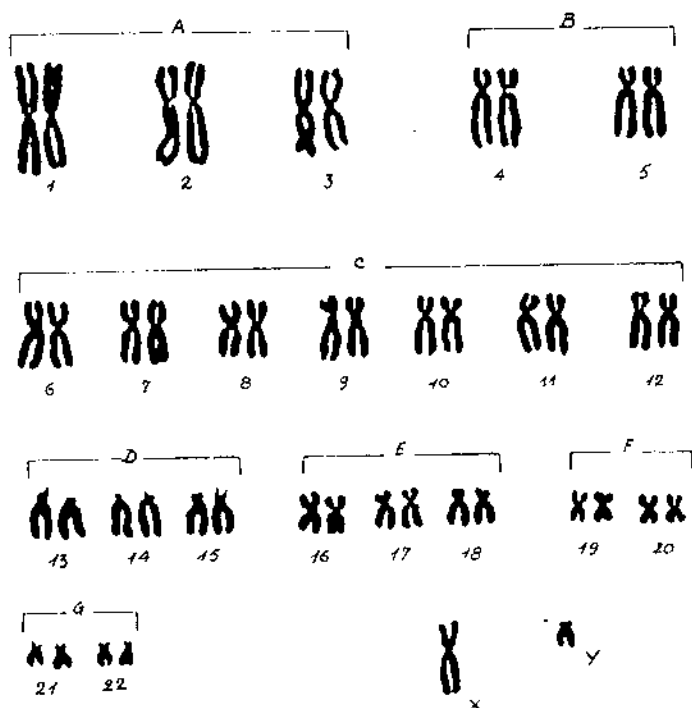
a) Nguyên dạng ; b) Phóng to chỗ mũi tên của a ; c) Phóng to một đoạn của b

2. Kiểu nhân và nhiễm sắc đồ

Tất cả các tế bào của một loài nói chung có **số lượng nhiễm sắc thể cố định đặc trưng** cho loài đó. Ví dụ, tế bào ruồi giấm *Drosophila melanogaster* có 8 nhiễm sắc thể, tế bào **bắp** có 20 nhiễm sắc thể, tế bào **người** có 46. Mỗi loại nhiễm sắc thể có hình dạng đặc trưng.

Do sự ổn định về hình thái của mỗi nhiễm sắc thể và sự cố định về số lượng nên **sự mô tả hình thái của nhiễm sắc thể** được gọi là **kiểu nhân (caryotype)** đặc trưng cho mỗi loài. Kiểu nhân có thể biểu hiện ở dạng **nhiễm sắc đồ** khi các nhiễm sắc thể được xếp theo thứ tự bắt đầu từ dài nhất đến ngắn nhất (hình 4.7).

Sau này, kĩ thuật nhuộm màu (màu Giemsa hay quinacrine) hoàn chỉnh hơn làm rõ các **vết đặc trưng (band)**, hình thái của mỗi nhiễm sắc thể được xác định chi tiết hơn (hình 4.8). Dựa vào **nhiễm sắc đồ** nhuộm màu, có thể tìm thấy các **đoạn tương đồng** trên các nhiễm sắc thể cùng loại của các loài có quan hệ họ hàng gần nhau. Ví dụ, sự so sánh nhiễm sắc đồ của người với vượn người cho thấy có mối quan hệ họ hàng rất gần và nhiễm sắc thể thứ hai của người do sự nối lại của 2 nhiễm sắc thể khác nhau ở vượn người.



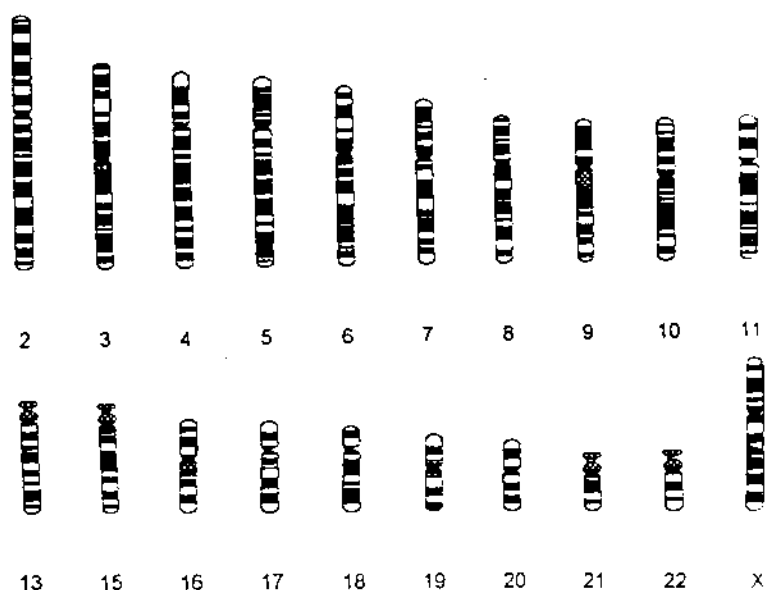
Hình 4.7. Kiểu nhân của người ở dạng nhiễm sắc đồ

Các nhiễm sắc thể được xếp theo nhóm : A(1, 2, 3) - dài, tâm giữa; B(4, 5) - dài, tâm gần giữa; C(6 - 12 và X) - trung bình, tâm gần giữa; D(13, 14, 15) - trung bình, tâm đầu; E(16, 17, 18) - ngắn trung bình, tâm giữa hoặc gần giữa; F(19, 20) - ngắn, tâm gần giữa; G(21, 22 và Y) - rất ngắn, tâm đầu.

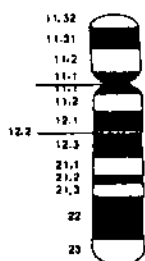
3. Chất nhiễm sắc và dị nhiễm sắc

Vào những năm 1930, khi quan sát bằng kính hiển vi quang học ở gian kì nhận thấy trên nhiễm sắc thể có vùng **nhuộm màu đậm** được gọi là **chất dị nhiễm sắc** (heterochromatine), phân biệt với phần còn lại nhuộm màu nhạt là chất nguyên nhiễm sắc (euchromatine). **Chất nguyên nhiễm sắc** là chất nhiễm sắc (chromatine) ở trạng thái dãn xoắn, còn chất dị nhiễm sắc là biểu hiện dạng cuộn xoắn cao.

DNA của chất nguyên nhiễm sắc ở trạng thái hoạt động, còn ở chất dị nhiễm sắc thì DNA không phiên mã được và thường sao chép muộn hơn.



Hình 4.8. Nhiễm sắc đồ của người



Nhiễm sắc đồ điển hình của người được mô tả theo công ước Paris. 23 cặp nhiễm sắc thể xếp theo thứ tự từ dài nhất (8 micromet) đến ngắn nhất (1 micromet), cặp XY sau cùng. Mỗi cặp được đặc trưng bởi các vệt màu phân biệt với các cặp khác. Bên trái là nhiễm sắc thể 18 được phóng đại với các chi tiết.

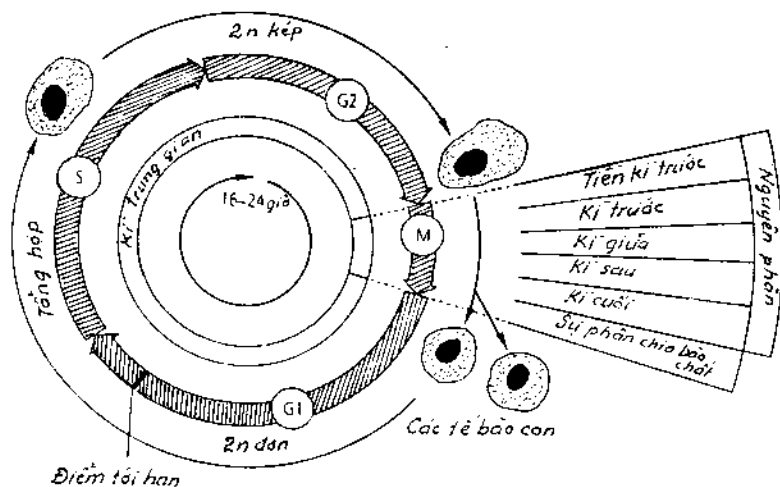
III. CHU TRÌNH TẾ BÀO VÀ PHÂN BÀO Ở EUKARYOTAE

Phân chia tế bào là đặc tính căn bản của tất cả các sinh vật. Sự sinh sản vô tính và tăng trưởng của các mô cơ thể nhờ **nguyên phân** (mitosis) là kiểu phân bào tạo ra các tế bào con có kiểu gen giống y như tế bào mẹ. Sinh sản hữu tính nhờ **giảm phân** là kiểu phân bào tạo các tế bào sinh dục hay giao tử có số nhiễm sắc thể giảm một nửa với kiểu gen đa dạng.

1. Chu trình tế bào (Cell cycle)

Các tế bào của sinh vật Eukaryotae trải qua nhiều giai đoạn nối tiếp nhau và kết thúc bằng sự phân chia tạo ra tế bào mới. Toàn bộ quá trình từ

tế bào đến tế bào thế hệ kế tiếp được gọi là **chu trình tế bào**, gồm 4 **giai đoạn** : **M**, **G₁**, **S** và **G₂**. Sự phân chia tế bào chỉ chiếm một phần của chu trình tế bào.



Hình 1.9. Sơ đồ chu trình tế bào

– **M (Mitosis)** là giai đoạn **nguyên phân**

– Giai đoạn **G₁** (Gap) kéo dài từ sau khi tế bào phân chia đến bắt đầu sao chép vật chất di truyền. Sự tích lũy vật chất nội bào đến một lúc nào đó đạt điểm tới hạn (restriction site) thì tế bào bắt đầu tổng hợp DNA.

– **S (Synthesis)** là giai đoạn **tổng hợp DNA**. Cuối giai đoạn này, số lượng DNA tăng gấp đôi và chuyển sang **G₂**.

– **G₂** là giai đoạn được nối tiếp sau S đến bắt đầu phân chia tế bào. Trong suốt giai đoạn này số lượng **DNA gấp đôi** cho đến khi tế bào phân chia.

Khoảng thời gian gồm **G₁**, **S** và **G₂** tế bào không phân chia và được gọi chung là **gián kì** hay **kì trung gian** (interphase). Chính ở kì trung gian này, tế bào thực hiện các hoạt động sống chủ yếu khác và sao chép bộ máy di truyền.

2. Nguyên phân

Sự phân bào ở sinh vật nhân thực gồm 2 quá trình : **chia nhân** (mitosis) và **chia tế bào chất** (cytokinesis). Sự chia nhân đảm bảo vừa nhân đôi chính xác, vừa phân bố đều vật chất di truyền về các tế bào con. Nguyên phân (hình 4.10, bên phải) được chia thành 4 kì.

a) Kỳ trước hay kỳ đầu (Prophase)

Các **trung thể** (centrioles) chuyển động về hai cực của nhân, các nhiễm sắc thể co lại thành sợi. Mỗi nhiễm sắc thể gồm hai sợi **chromatid** gắn nhau nhờ **tâm động** (centromere). Các **sợi vô sắc** tỏa ra từ tâm động và trung thể. **Màng nhân** và **hạch nhân** biến mất dần. Các tế bào thực vật khác với tế bào động vật là không có trung thể và thoi vô sắc.

b) Kỳ giữa hay trung kỳ (Metaphase)

Tâm động của mỗi nhiễm sắc thể đôi gắn với **thoi vô sắc** và xếp ở **mặt phẳng xích đạo** của tế bào. Kỳ giữa chấm dứt khi mỗi **tâm động** của mỗi cặp chromatid chị em bắt đầu **tách ra**.

Như vậy, **tâm động** là điểm chia cuối cùng của nhiễm sắc thể. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng, nhờ đó chất di truyền được **chia đều** và **đồng bộ** cho các tế bào con.

c) Kỳ sau hay hậu kỳ (Anaphase)

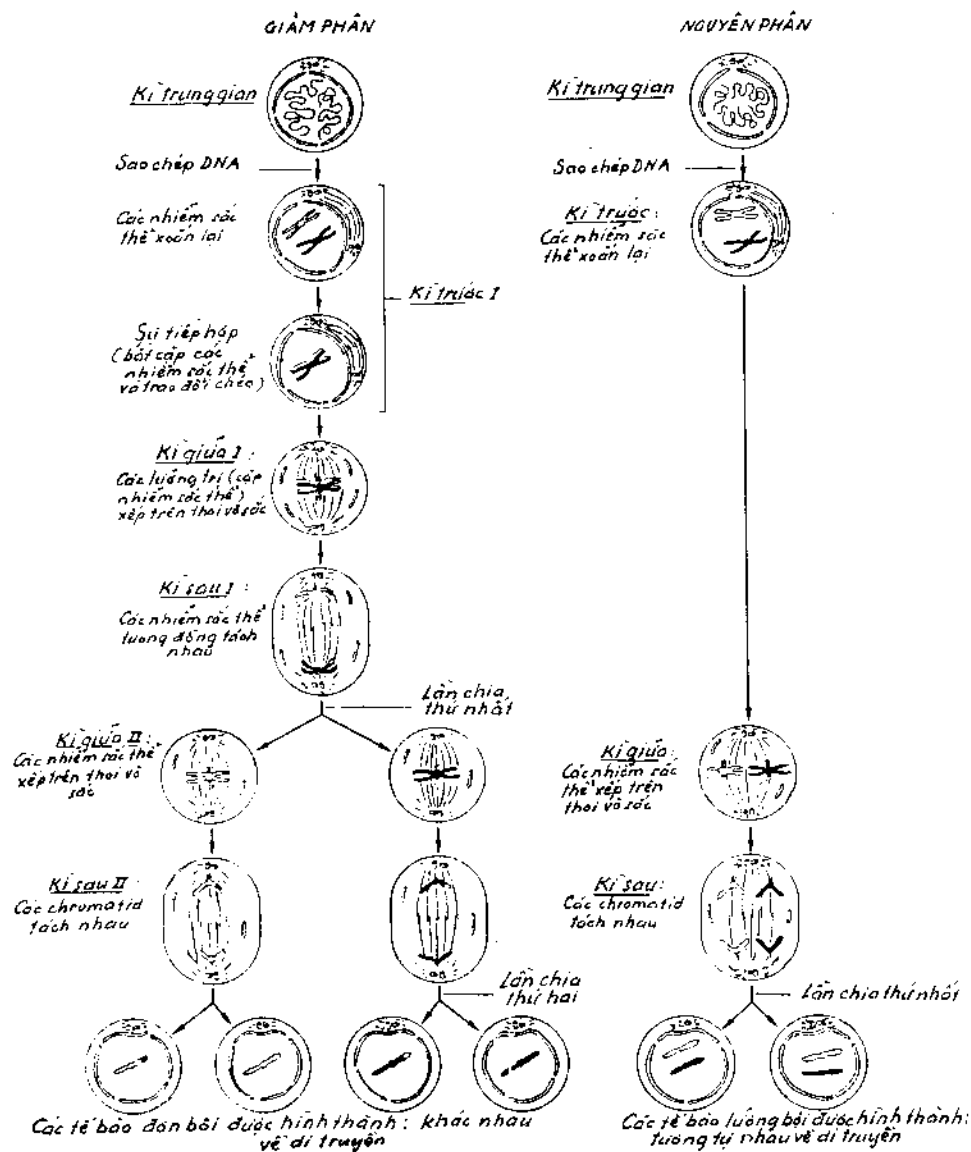
Hai nhiễm sắc thể đơn tách nhau, chuyển động mỗi cái về một cực tế bào. Các sợi vô sắc co ngắn lại kéo các nhiễm sắc thể. **Sự phân chia tế bào chất** thường bắt đầu ở kỳ này.

d) Kỳ cuối hay mặt kỳ (Telophase)

Các nhiễm sắc thể di chuyển về các cực, màng nhân và hạch nhân lại hình thành, sự chia tế bào chất thực hiện xong, các nhiễm sắc thể dần ra và mảnh dần.

Sự **phân chia tế bào chất** (cytokinesis) thường kèm theo ngay sau giảm phân. Ở tế bào động vật, sự chia tế bào chất bắt đầu **bằng nếp nhăn phân cách** (cleavage furrow) bao vòng tế bào và mọc sâu dẫn đến khi chia tế bào thành hai. Ở thực vật, **phiến tế bào** (cell plate) hình thành ở trung tâm tế bào chất và lan rộng dẫn đến cắt tế bào thành hai.

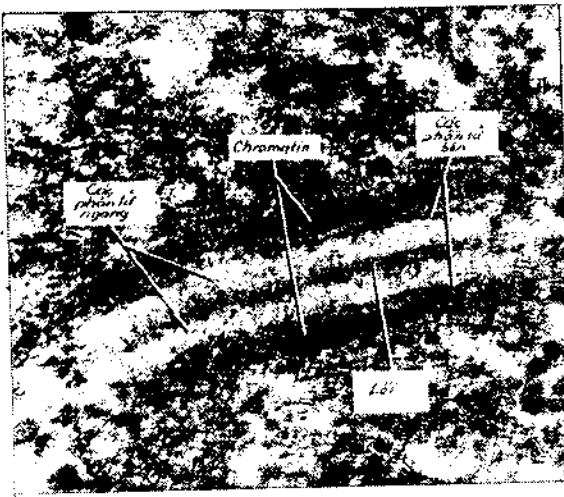
Nguyên phân tạo ra hai tế bào con có số lượng và chất lượng nhiễm sắc thể như tế bào mẹ.



Hình 4.10. Sơ đồ so sánh nguyên phân và giảm phân

3. Giảm phân (Meiosis)

Giảm phân là quá trình phân bào chuyên biệt trong đó số lượng nhiễm sắc thể giảm một nửa, nhưng đủ bộ (n), xảy ra ở **tế bào sinh dục** (hình 4.10 trái). Khi giao tử đực và cái hợp nhất trong thụ tinh thì số lượng nhiễm sắc thể $2n$ được hồi phục.



Hình 4.11. Phức hợp bất cặp

a) Kỳ trước I
(Prophase I)

Các sự kiện xảy ra giống kỳ trước của nguyên phân, chỉ khác căn bản ở chỗ các nhiễm sắc thể tương đồng cùng chuyển động với nhau và nằm kề sòng đôi nhau trong quá trình **bắt cặp** hay **tiếp hợp** (synapsis). Các chromatid là các sợi nhiễm sắc thể chị em được gắn nhẹ nhau nhờ một cặp **protein trục** (protein axe).

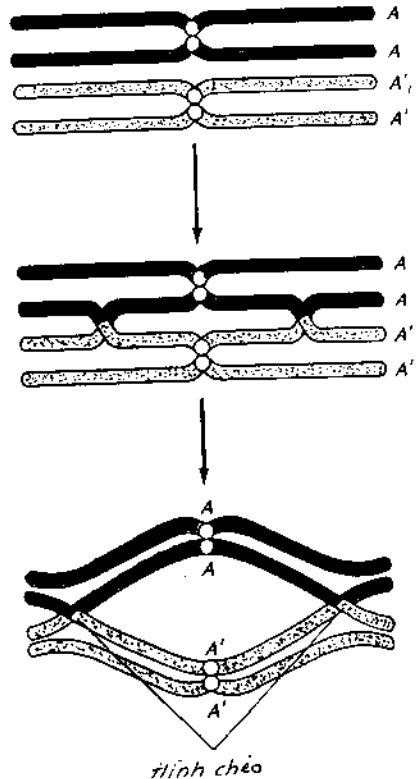
Các **protein trục** của hai nhiễm sắc thể tương đồng **nối nhau** bởi cấu protein để tạo nên **phức hợp bất cặp** (synaptonemal complex)

Bắt cặp giữa các nhiễm sắc thể tương đồng

Trao đổi đoạn giữa các chromatid

Hình thành lưỡng tri

hình chéo



Hình 4.12. Tiếp hợp các nhiễm sắc thể tương đồng và sự tạo thành hình chéo

Giảm phân trải qua 2 lần phân chia nối tiếp nhau, gọi là **giảm nhiễm I** và **II**. Lần chia thứ nhất làm giảm số lượng nhiễm sắc thể, lần chia thứ hai tách các chromatid rời nhau, thực chất là nguyên phân. Cả hai lần chia đều có thể phân thành 4 kì. Sự phân biệt rõ nhất với nguyên phân thể hiện ở **kì trước I**, nơi có nhiều diễn biến phức tạp liên quan trực tiếp đến cơ chế di truyền.

có thể nhìn thấy dưới kính hiển vi diện tử như 2 lát bánh mì kẹp thịt (sandwich) (hình 4.11). Có thể phức hợp này giúp cho sự tiếp hợp được chính xác và hiệu quả hơn. Cặp nhiễm sắc thể tương đồng lúc này thành đôi gọi là **lưỡng trị** (bivalent).

Dưới kính hiển vi thường, các nhiễm sắc thể sau khi tiếp hợp xong, bắt đầu tách ra, có thể quan sát thấy các đoạn nhiễm sắc thể đan chéo nhau gọi là hình chéo (chiasma). Các hình chéo giữa các chromatid có thể xảy ra trao đổi chéo dính nhau (hình 4.12). Cuối kì trước I, thoi vô sắc và các sợi vô sắc xuất hiện, tuy nhiên chúng chỉ di chuyển về một cực.

b) Kì giữa I (Metaphase I)

Hai nhiễm sắc thể của một cặp tương đồng gắn với cùng một sợi của thoi vô sắc trên **mặt phẳng xích đạo** của tế bào. Các tâm động không tách ra.

c) Kì sau I (Anaphase I)

Hai nhiễm sắc thể **tách đôi** (mỗi cái có chromatid) của mỗi cặp tiếp hợp chuyển động về hai cực đối nhau.

d) Kì cuối I (Telophase I)

Hai nhân mới được hình thành, mỗi cái với nửa bộ nhiễm sắc thể (n) có ở tế bào mẹ. Các nhân con với số lượng nhiễm sắc thể bằng nhau, nhưng kiểu gen không tương tự nhau (hình 4.10).

Sau kì cuối I là thời kì cực ngắn **gián kì** (interkinesis). Trong kì này không xảy ra sao chép vật chất di truyền.

Quá trình chia **giảm nhiễm II** (meiosis II) xảy ra tiếp theo, thực chất là nguyên phân và cũng có 4 kì :

e) Kì trước II (Prophase II)

Trong kì này các nhiễm sắc thể co lại cho thấy rõ số lượng đơn bội.

f) Kì giữa II (Metaphase II)

Các nhiễm sắc thể xếp trên mặt phẳng xích đạo, mỗi nhiễm sắc thể đôi gắn với sợi tách biệt của thoi vô sắc. Thường các chromatid đã tách nhau một phần.

g) Kì sau II (Anaphase II)

Các tâm động phân chia và các chromatid đẩy nhau đi về các cực.

h) Kì cuối II (Telophase II)

Bốn tế bào đơn bội có kiểu di truyền khác nhau, chứa các nhiễm sắc thể đơn được tạo thành.

Như vậy, giảm nhiễm I tạo 2 tế bào đơn bội chứa các nhiễm sắc thể đôi (có 2 chromatid). Mỗi một tế bào đó lại chia lần nữa trong giảm nhiễm II tạo ra tất cả 4 tế bào đơn bội chứa các nhiễm sắc thể đơn. Mỗi chromatid ở giảm nhiễm I sau giảm nhiễm II sẽ thành một nhiễm sắc thể đơn.

4. So sánh nguyên phân và giảm phân

Hai kiểu phân bào được xếp song song trên hình 4.10 để vừa theo dõi diễn biến của các quá trình vừa so sánh.

a) Giống nhau

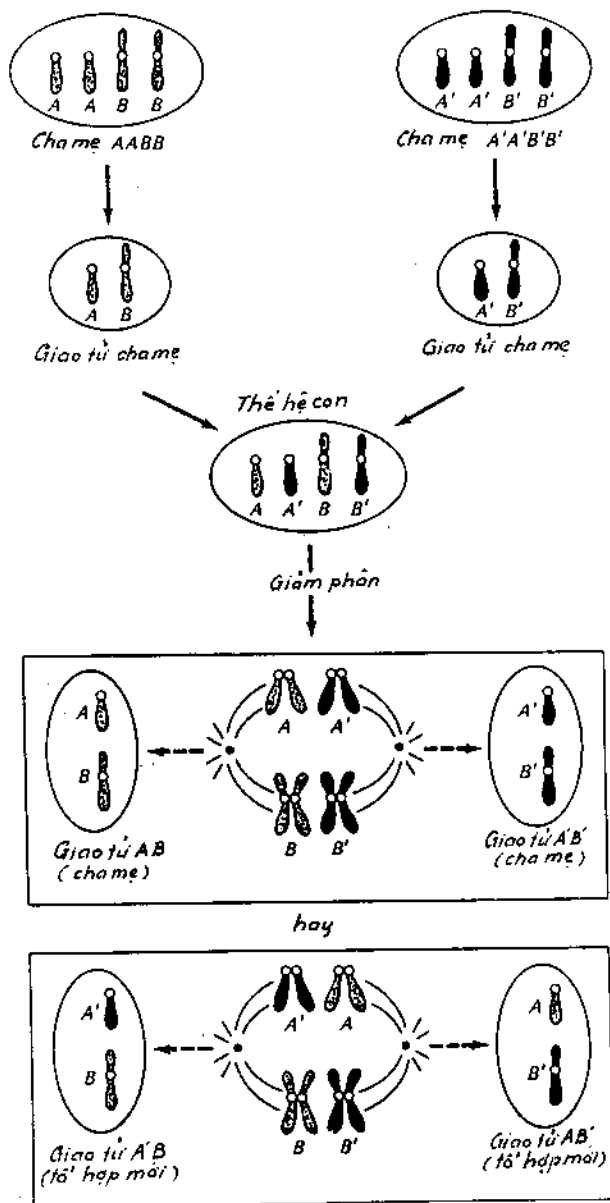
- Sao chép DNA trước khi vào phân bào.
- đều phân thành 4 kì.
- Sự phân đều mỗi loại nhiễm sắc thể về các tế bào con.
- Màng nhân và nhân con biến mất cho đến gần cuối.
- Hình thành thoi vô sắc.

b) Khác nhau

BẢNG 4.1 : So sánh các đặc tính chủ yếu của nguyên phân và giảm phân

Nguyên phân (Mitosis)	Giảm phân (Meiosis)
1. Xảy ra ở tế bào soma.	1. Xảy ra ở tế bào sinh dục.
2. Một lần phân bào : 2 tế bào con.	2. Hai lần phân bào tạo 4 tế bào con.
3. Số nhiễm sắc thể giữ nguyên : 1 tế bào $2n \rightarrow 2$ tế bào $2n$.	3. Số nhiễm sắc thể giảm một nửa: 1 tế bào $2n \rightarrow 4$ tế bào n .
4. Một lần sao chép DNA, 1 lần chia.	4. Một lần sao chép DNA, 2 lần chia.
5. Thường, các nhiễm sắc thể tương đồng không bắt cặp.	5. Các nhiễm sắc thể tương đồng bắt cặp ở kì trước I.
6. Không có trao đổi chéo.	6. Có thể có trao đổi chéo giữa các cặp nhiễm sắc thể tương đồng.
7. Tâm động chia ở kì giữa	7. Tâm động không chia ở kì giữa I, nhưng chia ở kì giữa II.

Nguyên phân (Mitosis)	Giảm phân (Meiosis)
8. Duy trì sự giống nhau : tế bào con có kiểu gen giống kiểu gen tế bào mẹ.	8. Tạo sự đa dạng trong các sản phẩm của giảm phân.
9. Tế bào chia nguyên phân có thể là lưỡng bội ($2n$) hay đơn bội (n).	9. Giảm phân luôn luôn xảy ra ở tế bào lưỡng bội ($2n$) hoặc đa bội ($> 2n$).



Hình 4.13. Giảm phân tạo ra sự đa dạng các giao tử

Sự khác nhau thể hiện ở nhiều chi tiết. Đáng lưu ý là trong kì trước I của giảm phân, các nhiễm sắc thể tương đồng **bất cặp**, rồi sau đó **đẩy nhau** ra đi về các cực. Nhờ đó, mỗi tế bào con trong giảm phân chỉ nhận 1 nhiễm sắc thể của mỗi cặp tương đồng. Sự kiện này tương đương với việc tâm động giữ 2 chromatid chị em cùng đi với nhau trong nguyên phân và khi tâm động chia thì mỗi tế bào con chỉ nhận 1 chromatid. Cơ chế thực hiện tuy có khác nhau, nhưng giống nhau ở chỗ **chia đều** một cách **đồng bộ** các nhiễm sắc thể về các tế bào con.

c) Giảm phân tạo sự đa dạng di truyền

Xét trường hợp đơn giản khi tế bào có 2 cặp nhiễm sắc thể tương đồng : AABB ở mẹ và A'A'B'B' ở cha. Cha mẹ có 2 loại giao tử AB và A'B'. Thế hệ con AA'BB' qua giảm phân sẽ tạo ra 4 loại giao tử, ngoài 2 loại AB và A'B' giống các giao tử cha mẹ, còn có thêm 2 loại mới là A'B và AB' (hình 4.13). Số tổ hợp khác nhau được tạo ra qua giảm phân là 2^n (n là số cặp nhiễm sắc thể).

IV. SỰ XÁC ĐỊNH GIỚI TÍNH (SEX DETERMINATION)

Từ lâu các nhà sinh học đã quan tâm đến vấn đề giới tính. Vì sao các cá thể của cùng một loài, cùng cha mẹ, cùng môi trường sống như nhau (cả trong cơ thể mẹ), nhưng khi sinh ra lại **có sự khác nhau nhiều giữa đực và cái** ? Sự di truyền có liên quan đến giới tính đã giúp xác định sớm nhất các gen nằm trên nhiễm sắc thể.

Khái niệm giới đực và giới cái rất quen thuộc ở người và các vật nuôi. Ở người và vật nuôi chúng ta dễ nhận thấy có 2 **giới tính đực và cái**. Thực vật cũng có giới tính, ít nhất là ở các cây có hoa đực và hoa cái. Các vi sinh vật cũng có giới tính được gọi là **kiểu bất cặp**. Đa phần các sinh vật có 2 giới tính. Một số ít động và thực vật bậc thấp có vài giới tính. Ví dụ, loài trùng roi Paramecium bursaria có 8 **giới tính** hay **kiểu bất cặp**, tất cả đều tương tự nhau về hình thái, nhưng khác nhau về sinh lí. Các tế bào của mỗi kiểu bất cặp không bất cặp nhau được, nhưng có thể trao đổi vật chất di truyền với bất kì 1 trong 7 kiểu bất cặp khác của cùng một loài.

Đa số sinh vật chỉ có 2 giới tính. Nếu 2 giới tính hiện diện trong cùng một cá thể, được gọi là **lưỡng tính** (hermaphroditic), các **thực vật đồng chu** (monoecious) khi trên một cây có hoa đực và hoa cái riêng. Ở phần lớn thực vật, các bộ phận đực và cái cùng trên một hoa. Một ít thực vật hạt kín (angiosperm) là **thực vật biệt chu** (diecious), có cây đực và cây cái riêng biệt.

Sự xác định giới tính rất phức tạp, phụ thuộc nhiều tác động khác nhau, vấn đề được trình bày ở đây chỉ nhằm vào những nét chủ yếu để hiểu các cơ chế di truyền.

1. Tỷ lệ phân li giới tính

Việc theo dõi tỉ lệ giữa số lượng các con đực và cái ở các động vật bậc cao, giữa nam và nữ ở người cho thấy tỉ lệ giới tính trung bình là **1 đực : 1 cái**. Thực tế ở người, trong mỗi gia đình tỉ lệ có dao động, tỉ lệ trên đúng theo thống kê trên số lớn. Khi sinh ra tỉ lệ trung bình là 105 - 107 người nam : 100 nữ, đến tuổi thanh niên thì tỉ lệ là 100 : 100 và ở tuổi già các cụ bà có số lượng gấp đôi. Tuy nhiên, đây là 1 **tỉ lệ ổn định hợp lí** qua nhiều thế hệ để bảo tồn nòi giống. Tỉ lệ này trùng với **tỉ lệ phân li lai đơn tính** giữa 1 cá thể **đồng hợp tử** với **dị hợp tử** :

$$AA \times Aa \longrightarrow 1 AA : 1 Aa$$

$$aa \times Aa \longrightarrow 1 aa : 1 Aa$$

Xét từ góc độ di truyền, giới tính có **sự phân li như một dấu hiệu Mendel**. Sự phân li này còn cho thấy một giới tính **đồng hợp tử**, còn giới tính kia **dị hợp tử**.

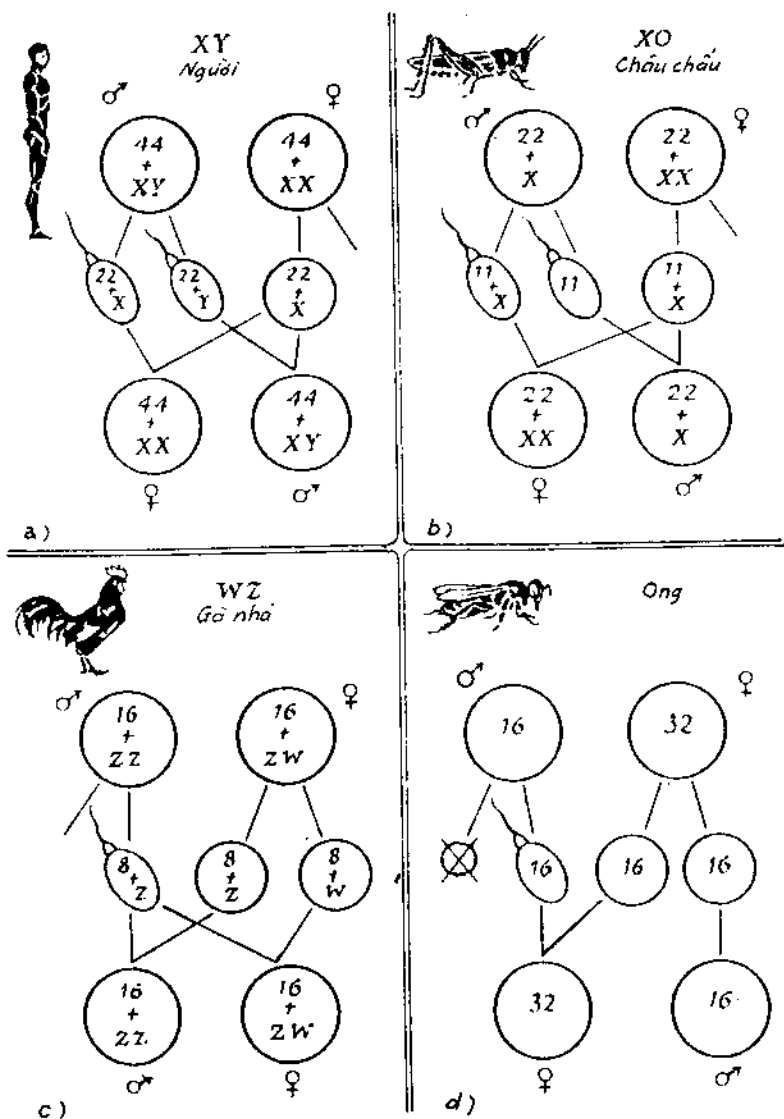
Việc phát hiện các nhiễm sắc thể giới tính X và Y (ở người và ruồi giấm) cho thấy bộ nhiễm sắc thể của các cá thể đực và cái chỉ khác nhau ở 1 cặp nhiễm sắc thể giới tính, còn các nhiễm sắc thể thường [autosome (A)] đều giống nhau. Ví dụ, bộ nhiễm sắc thể của ruồi giấm có 8 nhiễm sắc thể được thể hiện như sau :

$$\text{ruồi cái} = 6A + XX \quad \text{và} \quad \text{ruồi đực} = 6A + XY$$

Các nhà di truyền học là những người đầu tiên giải thích một cách hợp lí vì sao có tỉ lệ 1 đực : 1 cái. **Sự khác nhau lớn** giữa đực và cái **gắn liền với một cặp nhiễm sắc thể**. Sự kết hợp giữa đực và cái ($XY \times XX$) dẫn đến tỉ lệ phân chia 1 cái : 1 đực.

2. Các kiểu xác định giới tính ở động vật

Các nghiên cứu về sau cho thấy sự xác định giới tính của sinh giới cũng phức tạp và đa dạng. Sau đây là một số kiểu xác định giới tính chủ yếu.



Hình 4.14. Các hệ thống xác định giới tính chủ yếu ở động vật

a) Cá thể đực dị giao tử: kiểu XX - XY và XX - XO

Nhiều loài gồm người và các động vật có vú khác có vú khác có cơ chế xác định giới tính XX - XY. Ở các sinh vật này các **nhiễm sắc thể thường giống nhau** ở các cá thể đực và cái, nhưng **con đực** có cặp nhiễm sắc thể giới tính XY, còn ở **con cái** là XX. Các **con đực** khi tạo thành giao tử thì một nửa giao tử mang nhiễm sắc thể X, còn nửa kia mang nhiễm sắc thể Y nên được gọi là **giới tính dị giao tử** (hình 4.14a). Ví dụ: người nam tạo 2 loại giao tử: (22A +

X) và $(22A + Y)$. Giới tính cái khi tạo thành giao tử chỉ có 1 loại duy nhất mang X nên được gọi là **giới tính đồng giao tử**.

Cào cào, châu chấu, gián, và một số côn trùng có kiểu xác định giới tính XX - XO. *Con cái* chứa 2 nhiễm sắc thể XX, còn *con đực* chỉ chứa 1 nhiễm sắc thể X, nên viết là XO. Kiểu này cũng tương tự XX - XY, chỉ khác ở chỗ *con đực dị giao tử* tạo thành 2 loại giao tử : 1 loại mang X, còn loại kia không có X (hình 4.14b).

b) Cá thể cái dị giao tử : kiểu ZZ - ZW

Ở chim, một số loài cá và một số côn trùng gồm cả bướm, *con mái có giới tính dị giao tử* (hình 4.14c). Để tránh sự nhầm lẫn khi kí hiệu, các nhiễm sắc thể giới tính ở các loài này được dùng chữ Z và W. Các *chim trống* (gà trống) là ZZ, còn các *chim mái* (gà mái) là ZW.

c) Đơn bội - Lương bội

Con ong đực được phát triển *trình sinh* (không có sự thụ tinh giữa các giao tử) từ trứng không thụ tinh và có bộ nhiễm sắc thể đơn bội. Trong kiểu xác định giới tính này *không có nhiễm sắc thể giới tính*, nó đặc trưng ở các côn trùng bộ Hymenoptera gồm các loài ong và kiến. Số lượng cá thể của đàn và thức ăn cho ấu trùng sẽ xác định con cái sẽ trở thành ong thợ bất thụ hay ong chúa hữu thụ chuyên sinh sản. Tỷ lệ giới tính của đàn ong được xác định do ong chúa. Phần lớn trứng được thụ tinh trở thành ong thợ, một số trứng không được thụ tinh thành ong đực. Thường ong chúa chỉ thụ tinh một lần trong cả đời.

Sự xác định giới tính ở các loài này liên quan đến bộ nhiễm sắc thể đơn bội hay lưỡng bội. Các *cá thể cái* phát triển từ trứng thụ tinh nên có bộ nhiễm sắc thể *lưỡng bội*. Còn các *con đực* thì phát triển từ trứng không được thụ tinh nên có bộ nhiễm sắc thể đơn bội (hình 4,14d.).

d) Giới tính do sự cân bằng di truyền

Ở ruồi giấm, sự hiện diện của *nhiễm sắc thể Y* rất quan trọng cho sự *hữu thụ* của ruồi đực, nhưng nó không có vai trò trong xác định giới tính. Trên thực tế, các nhân tố xác định *tính đực* của ruồi giấm nằm trên tất cả các nhiễm sắc thể thường trong trạng thái "đối trọng" với các nhân tố xác định tính cái trên nhiễm sắc thể X. Nếu bộ đơn bội của nhiễm sắc thể thường mang các nhân tố xác định tính đực có giá trị bằng 1, thì mỗi nhiễm sắc thể X mang các nhân tố xác định *tính cái* có giá trị $1\frac{1}{2}$. Quy ước A đại diện bộ nhiễm sắc thể đơn bội thường. Ở con đực bình thường (AAXY), tỷ lệ các nhân tố xác định đực : cái là $2 : 1\frac{1}{2}$ { cụ thể $(A=1 + A=1) : (X=1\frac{1}{2} +$

$Y=0$) nên sự cân bằng lệch về đực. Ruồi cái bình thường (AAXX) có tỉ lệ $2 : 3$ $\{(A=1 + A=1) : (X = 1 \frac{1}{2} + X=1 \frac{1}{2})\}$ lệch về phía tính cái.

Một số trường hợp bất thường xác định giả thuyết cân bằng di truyền nêu trên : ruồi XXY là cái, còn XO là đực.

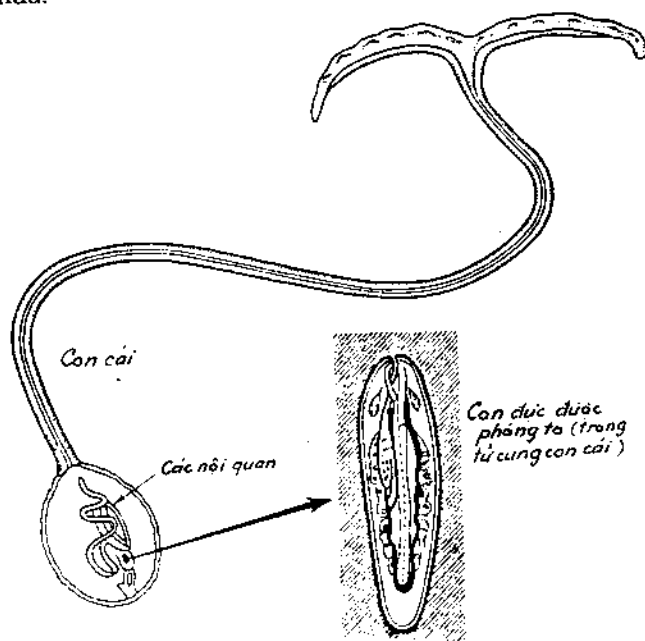
So sánh sự khác nhau giữa nhiễm sắc thể Y của người với ruồi giấm, củng cố thêm giả thuyết về sự cân bằng di truyền trong cơ chế nhiễm sắc thể giới tính ở ruồi giấm.

BẢNG 4.2 Sự xác định giới tính do nhiễm sắc thể ở người và *Drosophila*

Loài	Nhiễm sắc thể giới tính			
	XX	XY	XXY	XO
Người	Nữ	Nam	Nam	Nữ
Ruồi giấm <i>Drosophila</i>	Cái	Đực	Cái	Đực

e) Giới tính đực xác định do môi trường

Đây là cơ chế xác định giới tính hiếm hoi ở loài giun biển *Bonellia viridis*. Các ấu trùng xuất hiện sau khi được thụ tinh sống tự do một thời gian rồi bám xuống đáy thành **con cái**, hoặc bám vào với con cái rồi chui vào tử cung thành **con đực** và thụ tinh (hình 4.15). Cả đực và cái đều có kiểu gen như nhau.



Hình 4.15. Sự khác nhau giữa đực và cái ở *Bonellia viridis*

3. Giới tính ở thực vật

Phần lớn thực vật có hoa đơn tính là **đồng chu** (monoecious) và như vậy không có nhiễm sắc thể giới tính. Tuy nhiên ở các **biệt chu** (diecious), các cây cái mang hoa cái chỉ chứa noãn và các cây đực chỉ mang hoa đực chứa túi phấn hoa. Một số cây biệt chu có cặp nhiễm sắc thể giới tính.

BẢNG 4.3 : Kiểu nhiễm sắc thể giới tính ở một số loài cây biệt chu

Loài	Số nhiễm sắc thể	Nhiễm sắc thể giới tính	
		Cái	Đực
<i>Canabis sativa</i> (cây gai dầu)	20	XX	XY
<i>Humulus lupulus</i> (houblon)	20	XX	XY
<i>Rumex angiocarpus</i>	14	XX	XY
<i>Melandrium album</i>	22	XX	XY

Một số **cây biệt chu** chưa biết rõ cặp nhiễm sắc thể giới tính, có thể khác nhau về hình thái khó ghi nhận. Các cây biệt chu khác có cặp nhiễm sắc thể giới tính nhưng sự xác định giới tính **phức tạp hơn** nhiều so với kiểu XX - XY.

4. Sự xác định giới tính do đơn gen

a) Các nhân tố bổ sung xác định giới tính (*Complementary sex factors*)

Ít nhất có 2 loài của bộ Côn trùng Hymenoptera có các **cá thể đực đồng hợp tử ở một gen** hoặc ở trạng thái **đơn bội**. Điều này được xác nhận ở *Habrobracon juglandis* và gần đây ở ong. Gen này của *Habrobracon* (còn gọi là *Bracon*) có ít nhất 9 allele giới tính được kí hiệu $S^a, S^b, S^d, \dots S^i$. Tất cả các **cá thể cái** đều **dị hợp tử** như $S^a S^b, S^a S^c, S^d S^f, \dots$. Nếu cá thể đồng hợp tử ở bất kì allele nào như $S^a S^a, S^c S^c, \dots$ chúng được phát triển thành giống **đực lưỡng bội** (thường bất thụ). Các cá thể đực đơn bội chỉ mang một allele như $S^a, S^c, S^g, \dots$. Sự xác định giới tính được minh họa bằng ví dụ sau :

P	$S^a S^b$ Cái lưỡng bội		×	S^a Đực đơn bội	
Giao tử	S^a	S^b		S^a	
F_1	S^a	$S^a S^a$		$S^a S^b$	S^b
	Đực đơn bội	Đực lưỡng bội		Cái lưỡng bội	Đực đơn bội

Trong thế hệ lưỡng bội tỉ lệ sẽ là : $1S^a S^a$ đực : $1S^a S^b$ cái

Trong thế hệ đơn bội tỉ lệ sẽ là $1S^a$ đực : $1S^b$ đực

b) Gen "transformer" của ruồi giấm

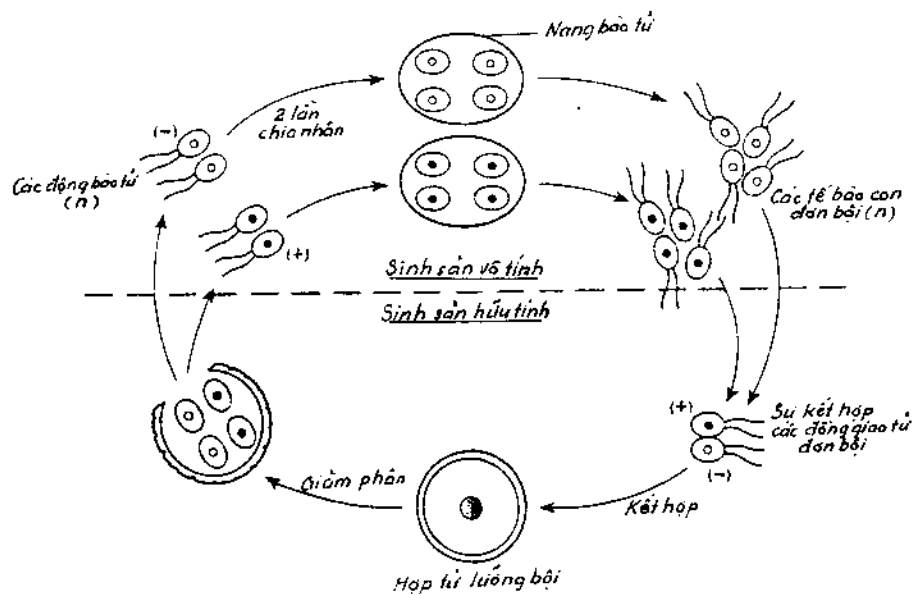
Trên nhiễm sắc thể số 3 của ruồi giấm *Drosophila* có gen lặn (*tra*), ở trạng thái đồng hợp, biến ruồi cái lưỡng bội thành ruồi đực bất thụ. Các cá thể X/X , tra/tra có hình thái bề ngoài và bên trong giống ruồi đực bình thường. Sự hiện diện của gen này có thể xem như làm thay đổi giới tính nên được gọi là gen "transformer" (gen "chuyển đổi" theo nghĩa tiếng Anh).

Sự phát hiện ra gen này có ý nghĩa quan trọng, nó cho thấy cơ chế xác định giới tính phức tạp do nhiều gen của bộ gen, sự thay đổi 1 gen có thể làm mất hiệu quả của hệ thống.

c) "Kiểu bất cặp" (Mating type) ở vi sinh vật

Sự xác định giới tính ở các loài vi tảo như *Chlamydomonas reinhardtii*, vi nấm như *Neurospora crassa* và nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, do một gen có hai allele. Ở các loài này, các tế bào đơn bội có thể sinh sản vô tính một thời gian dài, nhưng không kết hợp nhau được để tạo thành hợp tử. Giới tính của các vi sinh vật không giống với sinh vật bậc cao nên được gọi là "kiểu bất cặp" (Mating type). Vi tảo *Chlamydomonas reinhardtii* có kiểu bất cặp mt (+) và mt (-) (hình 4.16), các tế bào đơn bội gồm 2 loại : mt (+) và mt (-), tế bào đơn bội của mỗi loại không kết hợp với nhau. Sự kết hợp 2 tế bào khác kiểu bất cặp mt (+) với mt (-) tạo ra hợp tử. Hợp tử qua giảm phân cho tỉ lệ phân li của một gen là 2 tế bào mt (+) : 2 tế bào mt (-).

Kiểu bất cặp ở *Neurospora crassa* kí hiệu A và a, còn ở *Saccharomyces cerevisiae* là α và a, đều là 2 allele của 1 gen kiểu bất cặp.



Hình 4.16. Chu trình sống của vi tảo *Chlamydomonas reinhardtii*

5. Tầm quan trọng của giới tính

Từ xa xưa loài người đã quan tâm đến giới tính với nhiều truyền thuyết khác nhau. Trong thập niên cuối, vấn đề giới tính trở nên sôi động, những phát hiện mới làm thay đổi nhiều quan niệm trước đây về sự xác định giới tính ở người như : các gen xác định nam và nữ, nhiễm sắc thể X bất hoạt. Một số trường hợp có sự thay đổi giới tính trong quá trình phát triển cá thể. Ngày nay, trong các cuộc thi thể thao Olympic quốc tế đã tiến hành thử nghiệm nhiễm sắc thể giới tính.

Vì sao có giới tính ?

Khi có giới tính, cá thể cái chịu nhiều bất lợi :

- Phải có thêm cá thể đực mới sinh sản được.
- Phải tiêu tốn nhiều năng lượng cho hình thành tế bào trứng và hoạt động sinh dục.
- Phải nuôi con và kèm theo các cơ chế săn sóc, bảo vệ con.

Phía con đực cũng phải có các cơ chế hấp dẫn con khác giới và hao phí nhiều giao tử trong hoạt động sinh dục. Thường thì *giống đực lãng phí* (ví dụ, ở người mỗi lần phóng tinh có hàng trăm triệu tinh trùng), còn *giống cái tiết kiệm* (người nữ chỉ vài trăm trứng trong cả đời).

Dù có 2 hay nhiều giới tính, giới tính có cùng trong 1 cá thể hay ở các cá thể khác nhau, điều đó không quan trọng. Tầm quan trọng của giới tính ở chỗ nó là cơ chế tạo nên *sự đa dạng di truyền* của phần lớn các quần thể tự nhiên. Sự sinh sản hữu tính đã cung cấp sự đa dạng di truyền to lớn đến mức không có hai cá thể hoàn toàn giống nhau cho chọn lọc tự nhiên sàng lọc, giữ lại những cá thể thích nghi hơn. Nhiều cơ chế phụ được tạo ra ở nhiều loài có *thụ tinh chéo* để sản sinh ra nhiều tổ hợp di truyền hơn. Sinh sản hữu tính làm cho tốc độ *tiến hoá nhanh hơn*. Một trong *những hướng tiến hóa chính* của sinh giới là hoàn thiện cơ chế sinh sản hữu tính.

V. SỰ DI TRUYỀN LIÊN KẾT VỚI GIỚI TÍNH

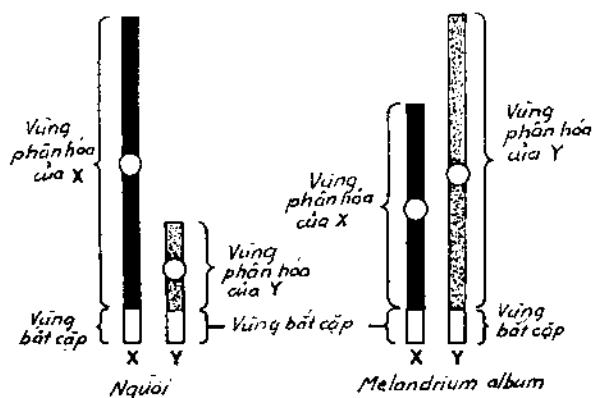
Các *gen nằm trên nhiễm sắc thể giới tính* sẽ có sự di truyền khác hơn so với các gen nằm trên nhiễm sắc thể thường. Sự di truyền của các gen này được gọi là *sự di truyền liên kết với giới tính*. Sự di truyền này có nhiều kiểu khác nhau phụ thuộc vị trí gen ở đoạn nào của nhiễm sắc thể giới tính.

1. Sự phân hóa di truyền các đoạn của X và Y

Các nhiễm sắc thể giới tính có thể phân ra thành các phần khác nhau. Các đoạn khác nhau này có thể phát hiện khi nghiên cứu giảm phân ở cá thể đực. Khi tiếp hợp, các đoạn mà nhiễm sắc thể X và Y bắt cặp với nhau được coi là **tương đồng** hay **đoạn bắt cặp**. Các gen trên đoạn này có sự di truyền như nhau ở cả nhiễm sắc thể X và Y (hình 4.17) và như trên nhiễm sắc thể thường.

Phần còn lại của nhiễm sắc thể X không bắt cặp với Y là **đoạn chuyên hóa của X**. Các gen ở đoạn này sẽ có **sự di truyền liên kết với X**.

Phần còn lại của nhiễm sắc thể Y không thể bắt cặp với X là **đoạn chuyên hóa của Y**, sẽ có **sự di truyền liên kết với Y**.



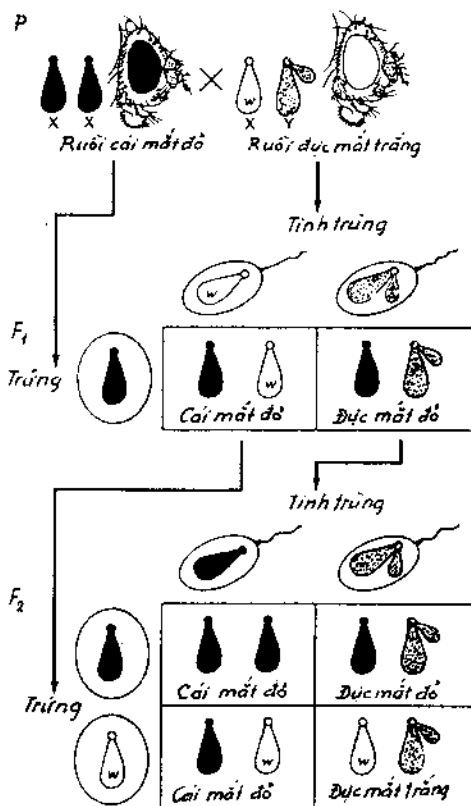
Hình 4.17. Sự phân hóa di truyền các đoạn của X và Y

2. Các gen liên kết với nhiễm sắc thể giới tính X

Các gen liên kết với X là những gen đầu tiên được xác định nằm trên nhiễm sắc thể. Nhiễm sắc thể X ở người là nhiễm sắc thể đầu tiên được xác định vị trí nhiều gen của các bệnh đặc hiệu.

a) Lai thuận nghịch

Trong các thí nghiệm đầu tiên của mình, T.H. Morgan đã lấy tính trạng lặn mắt trắng w (white) để theo dõi khi lai. Lấy ruồi cái **mắt đỏ** hoang dại lai với ruồi đực **mắt trắng** sẽ có kết quả như hình 4.18.



Hình 4.18. Ruồi cái mắt đỏ lai với ruồi đực mắt trắng

Tỉ lệ phân li trong trường hợp này không khác lắm so với quy luật Mendel : thế hệ F_1 đồng nhất mắt đỏ và F_2 là 3 mắt đỏ : 1 mắt trắng (chỉ ruồi đực).

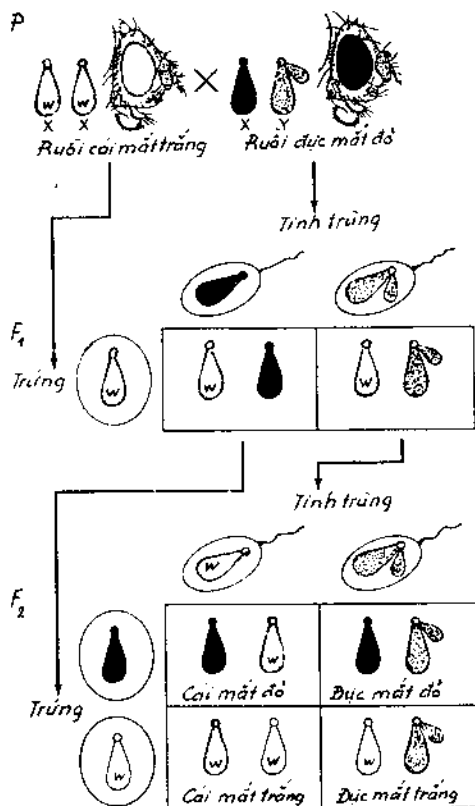
Nếu lai ruồi *cái mắt trắng* với ruồi *đực mắt đỏ* kết quả thu được khác hẳn :

Ở thế hệ thứ nhất F_1 có *sự di truyền chéo* : dấu hiệu mắt trắng của mẹ truyền cho ruồi đực con, còn mắt đỏ của cha truyền cho ruồi cái con.

Tỉ lệ phân li ở F_2 là 1 cái mắt đỏ : 1 cái mắt trắng : 1 đực mắt đỏ : 1 đực mắt trắng.

Các kết quả lai được giải thích như ghi chú trên sơ đồ lai, khi cho rằng ruồi cái có 2 nhiễm sắc thể giới tính XX, ruồi đực XY và trên Y không có allele tương đồng.

Như vậy đối với các gen nằm trên nhiễm sắc thể giới tính, chọn được hay cái mang dấu hiệu nào để theo dõi khi lai là có ý nghĩa.

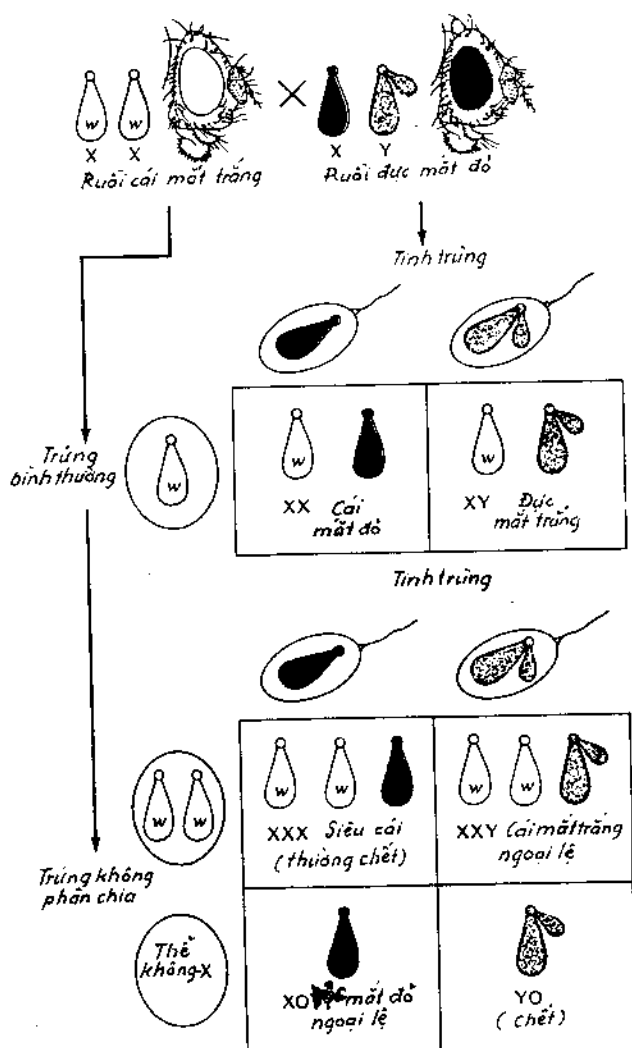


Hình 4.19. Ruồi cái mắt trắng lai với ruồi đực mắt đỏ

b) Sự không chia li của cặp nhiễm sắc thể XX

Calvin Bridges đã phát hiện trường hợp ngoại lệ trong kết quả lai giữa ruồi cái mắt trắng ($X^w X^w$) và ruồi đực mắt đỏ $X^{w+} Y$: khoảng 2000 ruồi F_1 có 1 cái mắt trắng và 1 đực mắt đỏ. Các ruồi đực mắt đỏ bất thụ. Sơ đồ lai như hình 4.20.

Quan sát tế bào học cho thấy ruồi cái có cặp nhiễm sắc thể XX cùng đi với nhau, do *không chia li* (non-disjunction) trong giảm phân, nên ruồi cái có kiểu gen $X^w X^w Y$ biểu hiện mắt trắng, còn ruồi đực có $X^{w+} O$ nên mắt đỏ. Thí nghiệm kiểm chứng thu được kết quả đúng dự đoán, xác nhận thêm gen liên kết với nhiễm sắc thể giới tính X. Chính kết quả này của Bridges cho thấy giới tính ở ruồi được xác định không do nhiễm sắc thể Y, mà do X. Thường 2X là ruồi cái, 1X ruồi đực.



Hình 4.20. Sự không chia li nhiễm sắc thể X

c) Các gen liên kết với giới tính

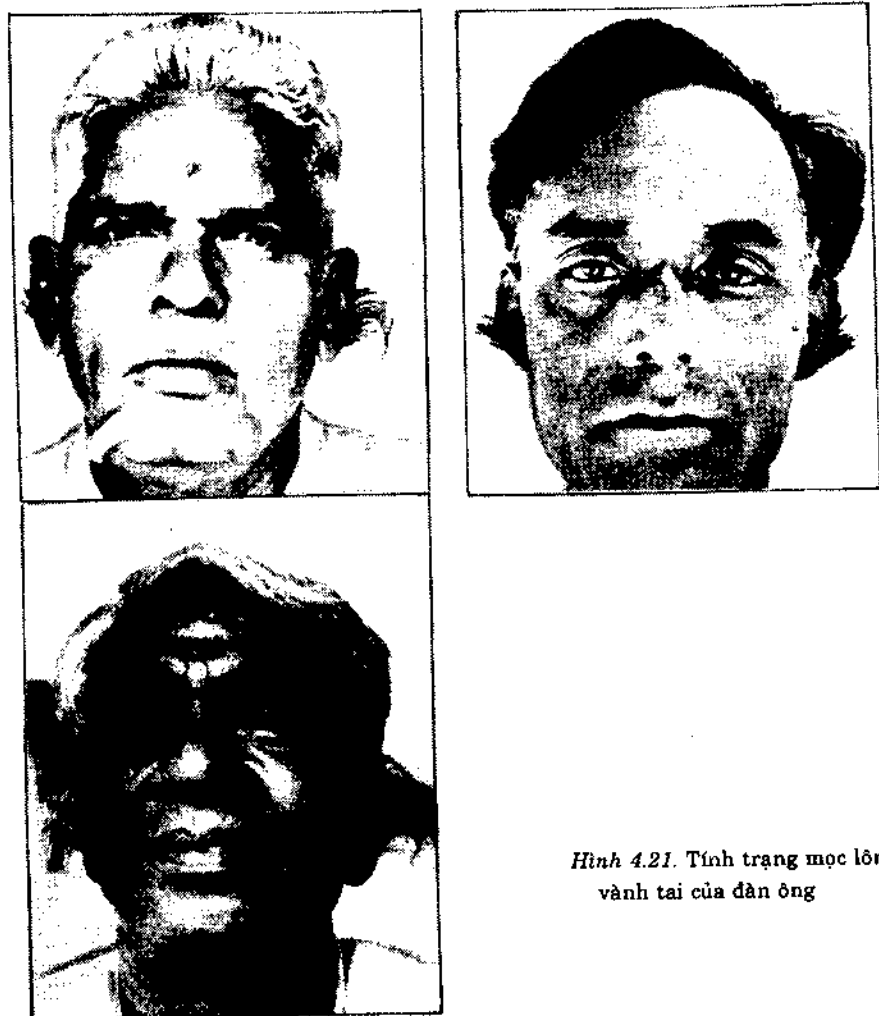
Một số bệnh di truyền ở người như máu không đông (hemophilia) hay mù màu do các gen nằm trên nhiễm sắc thể giới tính. Sự di truyền chéo thể hiện rõ: ông ngoại bị bệnh truyền gen mầm bệnh cho mẹ, mẹ truyền bệnh cho con trai.

Cho đến nay, có ít nhất 50 bệnh và 200 dấu hiệu di truyền gắn với nhiễm sắc thể X của người đã được biết.

Sự di truyền màu lông ở mèo có sự liên kết với nhiễm sắc thể giới tính X, nên mèo tam thể chỉ có ở mèo cái.

3. Các gen liên kết với nhiễm sắc thể giới tính Y

Thường nhiễm sắc thể Y chứa ít gen, nhưng nếu có thì được truyền theo dòng đực. Ở người, chưa có ví dụ chắc chắn nào về sự truyền đạt tính trạng theo dòng đực, trong đó tính trạng mọc lông ở vành tai (hình 4.21) được coi là có nhiều khả năng liên kết với Y. Tuy nhiên, ở người (và nhiều loài khác), sự hiện diện của nhiễm sắc thể Y và đoạn gen trên đó xác định tính nam. Đoạn này nằm ở vùng chuyên hóa của nhiễm sắc thể Y.



Hình 4.21. Tính trạng mọc lông ở vành tai của đàn ông

Ở loài cá *Lebistes*, nhiễm sắc thể Y mang gen được gọi là *maculatus* (tính đục) xác định các đốm sắc tố trên lưng. Kiểu hình này được truyền *từ cá cha cho cá con đục* và cá cái không có biểu hiện của tính trạng này. Đây có lẽ là ví dụ rất rõ về sự di truyền liên kết với nhiễm sắc thể Y.

4. Các gen liên kết với cả X và Y

Các gen nằm trên *đoạn tương đồng* sẽ có sự di truyền liên kết cả với X lẫn Y. Ví dụ : gen *bb* (bobbed) liên kết với giới tính ở *Drosophila*. Nếu lai ruồi cái $X^{bb} X^{bb}$ với ruồi đục hoang dại $X^+ Y^+$, tất cả thế hệ F_1 đều kiểu hình dại $X^+ X^{bb}$ và $X^{bb} Y^+$. Kết quả này giống với khi lai với các gen nằm trên nhiễm sắc thể thường. Nhưng sự liên kết cả X và Y được phát hiện ở F_2 , cho thấy tính trạng gắn với giới tính :

Giới tính	Kiểu hình	Kiểu gen dự kiến
Đực	Hoang dại	$X^+ Y^+$ và $X^{bb} Y^+$
Cái	1/2 bobbed	$X^{bb} X^{bb}$
	1/2 hoang dại	$X^+ X^{bb}$

Sự phối hợp giữa nghiên cứu tái tổ hợp của di truyền học và sinh học phân tử chứng minh có các đoạn tương đồng ở người, chúng có thể bắt cặp và trao đổi vật chất di truyền.

Sự di truyền của đoạn tương đồng trên X và Y được gọi là sự di truyền giả nhiễm sắc thể thường (pseudoautosomal inheritance).

5. Gen nam giới và gen nữ giới ở người

a) Gen xác định nam giới

Nhờ phát hiện các trường hợp ngoại lệ hiếm có, không tuân theo nguyên tắc XX là nữ và XY là nam, mà *gen nam tính* SRY (sex determining region Y) được phát hiện năm 1990. Đã tìm thấy ở người nam bình thường có XX nhưng bất thụ có SRY trên một trong 2 nhiễm sắc thể X và nữ bình thường mang XY nhưng mất SRY trên nhiễm sắc thể Y.

Gen SRY còn gọi là *nhân tố xác định tinh hoàn* (testis determining factor – TDF), nằm trên 1 đoạn nhỏ của vai ngắn nhiễm sắc thể Y ở người. Có giả thuyết cho rằng gen này (hay một nhóm gen liên kết chặt với nhau) của TDF sản sinh ra protein gắn DNA hoạt hóa một hay nhiều gen khác (có thể nằm trên nhiễm sắc thể khác nhau) trong hệ thống các nhân tố hoạt hóa các gen điều khiển sự phát triển của tinh hoàn. Khi thiếu sự hiện diện

của TDF, mô sinh dục sẽ phát triển bình thường thành noãn hoàng. TDF có tính bảo tồn cao ở các động vật có vú, tức chúng có nhiều điểm giống nhau giữa các loài.

b) Gen xác định nữ giới

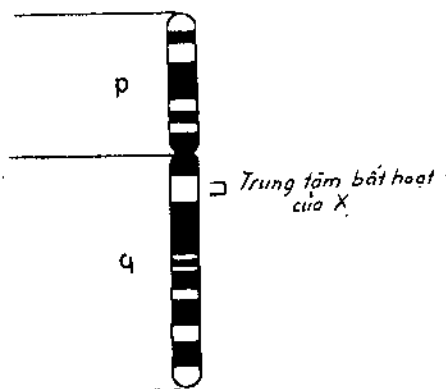
Gen nữ giới DSS (dosage sensitive sex reversal) được phát hiện năm 1994 do G. Carmerino (Ý). Việc nghiên cứu 8 người nam (XY) nhưng có cơ quan sinh dục nữ thay vì bình thường là nam. Sự bất thường này rất hiếm (1/20.000 người) được đặc trưng bởi sự lặp lại của một đoạn vai ngắn nhiễm sắc thể X. Sự cố nhiễm sắc thể này không liên quan đến giảm phân. Những người mang gen này bất thụ.

Tám người bệnh này có gen SRY trên nhiễm sắc thể Y. Ba người có Y bình thường và một có X với vai ngắn gấp đôi, còn 5 người có 1 X nguyên trạng và một Y có vai ngắn của X ghép thêm vào. Trong hai trường hợp có sự hiện diện của 2 đoạn vai ngắn của X. Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy đoạn vai ngắn của X gắn vào càng dài, giới tính càng lệch về tạo phái nữ. Gen DSS đã được tách ra.

6. Nhiễm sắc thể X bất hoạt ở người

Trong phôi người, một nhiễm sắc thể X bất nguồn từ mẹ hay cha trong mỗi tế bào soma sẽ **bất hoạt ngẫu nhiên**. Tất cả thể hệ tế bào con đều được truyền nhiễm sắc thể X bất hoạt. Thường thì nhiễm sắc thể X có cấu trúc không bình thường bất hoạt, trừ một số ngoại lệ liên quan đến các đột biến liên kết giới tính.

Khi nhuộm màu nhân tế bào soma của người nữ, nhiễm sắc thể X bất hoạt thể hiện ở dạng thể tròn, được gọi là thể Barr. Trung tâm bất hoạt nằm ở vai dài q, gần tâm động.



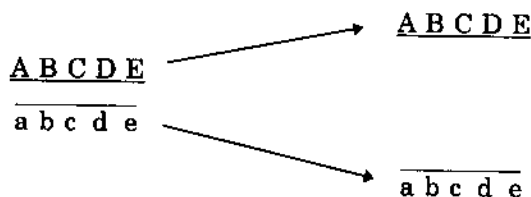
Hình 4.22. Nhiễm sắc thể X

VI. SỰ DI TRUYỀN LIÊN KẾT

Số lượng nhiễm sắc thể thì ít, nhưng số gen rất nhiều nên **mỗi nhiễm sắc thể mang nhiều gen**. Khi 2 hay nhiều gen nằm trên một nhiễm sắc thể,

chúng sẽ **cùng di truyền** với nhau gọi là **sự di truyền liên kết**. Các gen có thể liên kết với nhau trên nhiễm sắc thể thường hay nhiễm sắc thể giới tính.

Các gen liên kết có xu hướng cùng di chuyển với nhau trong quá trình hình thành giao tử. Khi đó có sự di truyền liên kết **nhiều gen phân li như một gen**. Ví dụ, cá thể mang 5 gen dị hợp tử nhưng lại có sự phân li khi lai phân tích với tỉ lệ 1 : 1.



Đường gạch ngang chỉ nhiệm sắc thể

Khi có sự di truyền liên kết, cách viết kiểu gen có khác : cá thể ABCDE/ abcde tạo ra các giao tử ABCDE và abcde. Các kí hiệu gạch / hay – chỉ nhiễm sắc thể.

Nếu có hai cặp allele Aa và Bb liên kết với nhau được viết như sau :

AB hoặc AB hoặc AB/ab hay ABab.
ab ab

Ví dụ : $AB/ab \times ab/ab.$

Giao tử : AB, ab (kiểu cha mẹ)
và Ab, aB (do tái tổ hợp).

$F_1 : AB/ab,$	$ab/ab,$	$aB/ab,$	$Ab/ab.$
$> \frac{1}{4}$	$> \frac{1}{4}$	$< \frac{1}{4}$	$< \frac{1}{4}$

1. Liên kết hoàn toàn

Ruồi giấm có các cặp gen sau :

- Thân xám b⁺ hoặc + ; thân đen b (black).
- Cánh thường vg⁺ (+) ; cánh cut vg (vestigial).

Lai các ruồi giấm đồng hợp thân đen cánh thường với thân xám cánh cut

P	$\frac{b \text{ vg}^+}{b \text{ vg}^+}$	x	$\frac{b^+ \text{ vg}}{b^+ \text{ vg}}$
	Thân đen Cánh thường		Thân xám Cánh cụt

Giao tử $b \text{ vg}^+$ và $b^+ \text{ vg}$

F₁ $\frac{b \text{ vg}^+}{b^+ \text{ vg}}$

Ruồi đực F₁ bình thường được đem lai phân tích, cho tỉ lệ phân li :

$$1 \frac{b^+}{b \text{ vg}} : 1 \frac{+ \text{vg}}{b \text{ vg}}$$

Tỉ lệ phân li này **giống với lai đơn tính**. Hai gen b và vg cùng đi chung với nhau **như một gen**.

Một hiện tượng khác thường (cho đến nay chưa rõ cơ chế) là ở **ruồi giấm đực** không thấy xảy ra tái tổ hợp di truyền, nên có sự **liên kết hoàn toàn** của các gen trên một nhiễm sắc thể.

2. Liên kết không hoàn toàn

Nếu ở F₁ của thí nghiệm trên lấy ruồi cái đem lai phân tích, kết quả thu được như sau :

P	♀	$\frac{b \text{ vg}^+}{b^+ \text{ vg}}$	x	♂	$\frac{b \text{ vg}}{b \text{ vg}}$
		Thân xám Cánh thường			Thân đen Cánh cụt

F₁ : Bốn loại kiểu hình xuất hiện với tỉ lệ như sau :

$\frac{b \text{ vg}^+}{b \text{ vg}}$	$\frac{b^+ \text{ vg}}{b \text{ vg}}$	$\frac{b \text{ vg}}{b \text{ vg}}$	$\frac{b^+ \text{ vg}^+}{b \text{ vg}}$
Thân đen	Thân xám	Thân đen	Thân xám
Cánh thường	Cánh cụt	Cánh cụt	Cánh thường
41,5%	41,5%	8,5%	8,5%

3. Các nhóm liên kết gen (*Gene linkage*)

Các gen *cùng di truyền* với nhau được xếp vào nhóm gọi là *nhóm liên kết gen*. Kết quả thí nghiệm cho thấy số nhóm liên kết gen *tối đa bằng số cặp nhiễm sắc thể*. Ví dụ :

– Người có số nhiễm sắc thể $2n = 46$, số nhóm liên kết gen tối đa là $n = 23$.

– Ruồi giấm *Drosophila* có $2n = 8$, số nhóm liên kết gen tối đa là $n = 4$ *tương ứng với 4 cặp nhiễm sắc thể tương đồng*.

– Bắp (*Zea mais*) có 20 nhiễm sắc thể, có $n = 10$ nhóm liên kết gen.

Điều này cũng chứng minh là gen nằm trên nhiễm sắc thể.

VII. TÁI TỔ HỢP VÀ TRAO ĐỔI CHÉO

1. Tái tổ hợp

Khi các gen *liên kết không hoàn toàn*, xuất hiện các giao tử dạng mới không giống của cha mẹ, có sự *sắp xếp lại các gen*. Hiện tượng này được gọi là *tái tổ hợp* (recombination) và các dạng mới xuất hiện (như b vg và + +) gọi là *dạng tái tổ hợp* (recombinant). Để đánh giá *mức độ liên kết*, nhóm Morgan nêu thêm khái niệm *tần số tái tổ hợp*. Đó là *số phần trăm cá thể tái tổ hợp* so với tổng cá thể trong thí nghiệm. Ví dụ, trong thí nghiệm lai ruồi nói trên, có tất cả 1000 cá thể thì 170 cá thể dạng tái tổ hợp, tức 17% (1% là đơn vị đo tái tổ hợp). Tần số này được tính theo công thức :

$$\frac{\text{Số cá thể tái tổ hợp}}{\text{Tổng số cá thể}} \times 100 = \% \text{ tái tổ hợp.}$$

Nhiều thí nghiệm cho thấy tần số tái tổ hợp giữa 2 gen là một số tương đối ổn định từ lần lai này qua lần lai khác và không phụ thuộc sự sắp xếp, như 2 allele trội cùng phía trên 1 nhiễm sắc thể (gọi là vị trí *cis*) AB/ab hay chéo nhau trên 2 nhiễm sắc thể (*trans*) Ab/aB.

$$\begin{array}{ccc} \underline{Ab} & \text{hoặc} & \underline{AB} \\ aB & & ab \end{array}$$

Tuy nhiên, tần số tái tổ hợp giữa các cặp gen khác nhau thì thay đổi đáng kể.

Trong thời gian đầu nghiên cứu tái tổ hợp, Morgan muốn ghi kí hiệu thể nào đó để dễ nhận dạng các kết quả lai và ông giao nhiệm vụ này cho Alfred Sturtevant, lúc đó đang là sinh viên đại học. Trong một đêm,

Sturtevant đã tìm ra phương pháp mô tả mối quan hệ liên kết gen, đến nay vẫn được sử dụng.

Ví dụ, trong lai phân tích giữa 2 gen *pr* (purple – mắt đỏ thẫm) và *vg*, sẽ nhận được :

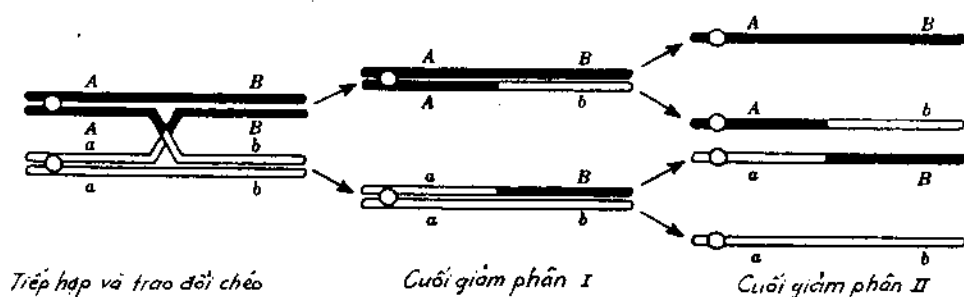
<i>pr vg</i> / <i>pr vg</i>	165	} Kiểu cha mẹ (không tái tổ hợp)
+ + / <i>pr vg</i>	191	
<i>pr</i> + / <i>pr vg</i>	23	} Kiểu tái tổ hợp
+ <i>vg</i> / <i>pr vg</i>	<u>21</u>	
	400	

Trong thí nghiệm này, tổng số giao tử cái là 400, trong đó có 44 dạng tái tổ hợp (11%). Sturtevant cho rằng, có thể dùng số phần trăm tái tổ hợp đó để định lượng khoảng cách theo đường thẳng giữa 2 gen trên *bản đồ di truyền* hay còn gọi là *bản đồ liên kết gen*.

2. Trao đổi chéo

Hiện tượng tái tổ hợp có được nhờ quá trình trao đổi chéo (crossing - over). Trong đó, *hai nhiễm sắc thể tương đồng hoán vị nhau hay đổi chéo nhau* ở những điểm nhất định.

Trong giảm phân, mỗi nhiễm sắc thể đôi có 2 chromatid chị em tương tự như nhau. Các nhiễm sắc thể tương đồng bắt cặp hay tiếp hợp với nhau và *trao đổi chéo* xảy ra giữa các *chromatid không chị em*. Sơ đồ sau mô tả sự trao đổi chéo giữa 2 gen A và B, giữa chromatid 2 và 3.



Hình 4.23. Trao đổi chéo giữa các chromatid

Các nhiễm sắc thể từ các chromatid 1 và 4 không có trao đổi chéo nên chúng được gọi là *kiểu cha mẹ* (parental) và các giao tử nhận chúng cũng được

gọi là các giao tử kiểu cha mẹ. Còn ở hai chromatid khác có xảy ra trao đổi chéo nên gọi là **kiểu tái tổ hợp** và **giao tử tái tổ hợp**.

Có hai cách sắp xếp các allele trên các nhiễm sắc thể :

– Vị trí **cis** hay **kết nối** (couplage) khi hai allele trội cùng nằm trên một nhiễm sắc thể, còn hai allele lặn trên cái kia.

Cha mẹ : Vị trí **cis** : AB / ab.

Các giao tử : – Cha mẹ : AB và ab.

– Tái tổ hợp : Ab và aB.

– Vị trí **trans** hay **đẩy nhau** (repulsion) khi mỗi nhiễm sắc thể mang một allele trội và một allele lặn.

Cha mẹ : Vị trí **trans** : Ab/aB.

Các giao tử : – Cha mẹ : Ab và aB.

– Trao đổi chéo : AB và ab.

Trao đổi chéo được **kí hiệu** bằng 2 đường chéo nằm giữa 2 đoạn nhiễm sắc thể mà 2 đầu là 2 gen :

$$\begin{array}{cc} A & B \\ \hline & x \\ \hline a & b \end{array}$$

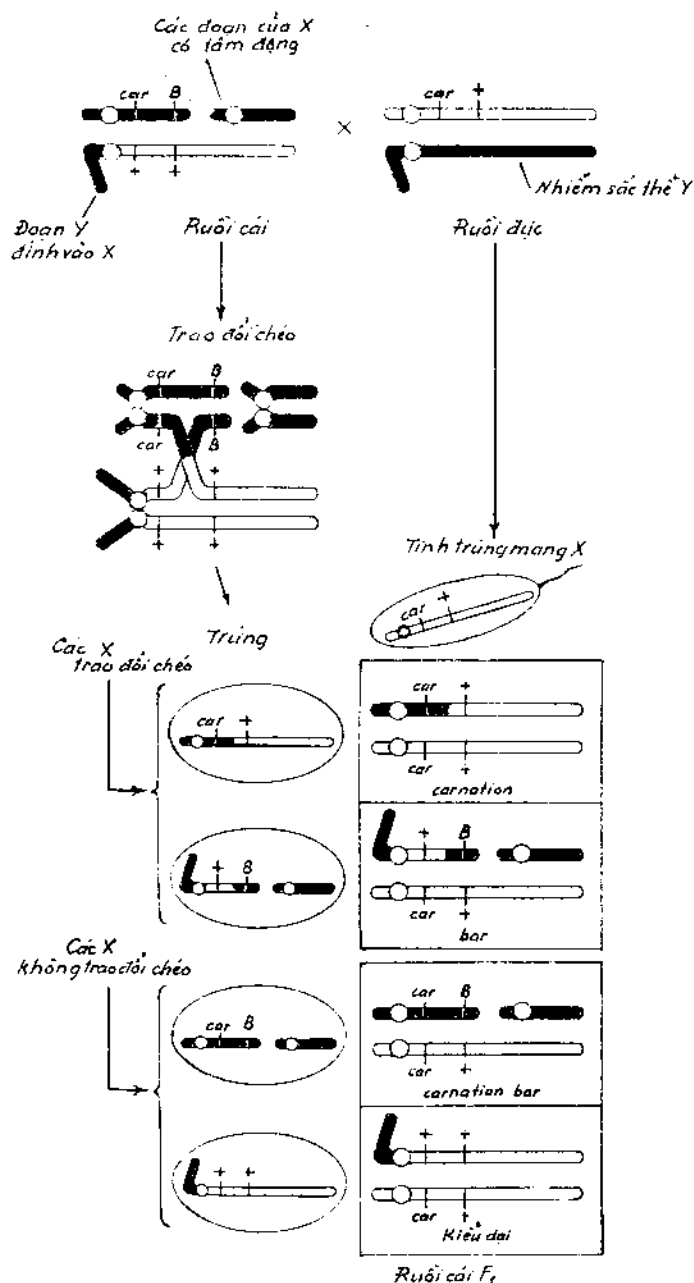
3. Cơ sở tế bào học của tái tổ hợp

Các thí nghiệm chứng minh cơ sở tế bào học của tái tổ hợp di truyền được thực hiện vào năm 1931 do C.Stern ở *Drosophila melanogaster* và Creighton cùng McClintock ở ngô. Cả hai thí nghiệm đều dùng "**đấu chuẩn**" về hình dạng trên 1 trong 2 nhiễm sắc thể tương đồng, có thể **nhìn thấy** khi quan sát tế bào học.

Hai nhiễm sắc thể tương đồng, được phân biệt với nhau về hình thái này, mang các allele tương ứng khác nhau về mặt di truyền của một số cặp gen. Tái tổ hợp di truyền sẽ tạo ra **các kiểu hình độc đáo** kèm theo các **thay đổi tế bào học** để quan sát và dự đoán được.

Stern đã dùng nhiễm sắc thể X, mà một đầu mút có dính một đoạn nhiễm sắc thể Y, có hình dạng như cù nèo (hình 4.24). Các nhiễm sắc thể X khác có độ dài tương tự với tâm động. Hai cặp gen được dùng là *carnation* (*car*, lặn, mắt đỏ nhạt) – hoang dại + (trội, đỏ) và *Bar* (*B*, trội, mắt hình thỏi) – hoang dại + (hình dạng mắt bình thường). Ruồi cái mẹ dị hợp tử ở cả 2 gen, có kiểu hình mắt đỏ bình thường dạng thỏi (*car*⁺ *B*) lai với ruồi đực mắt đỏ

nhạt dạng thường ($car +$). Thế hệ con F_1 nhận được 4 loại kiểu hình tương ứng với các dấu hiệu hình thái trên nhiễm sắc thể : ngoài 2 kiểu có ở cha mẹ còn có 2 kiểu hình tái tổ hợp là mắt đỏ nhạt hình thoi ($car B$) và mắt đỏ dạng thường ($car++$).



Hình 4.24. Sự trao đổi các đoạn nhiễm sắc thể tạo các dạng tái tổ hợp

Có thể nói, các thể tái tổ hợp là sản phẩm của giảm phân, do sự trao đổi chéo giữa các đoạn nhiễm sắc thể tương đồng.

4. Tần số các hình chéo (*Chiasma*)

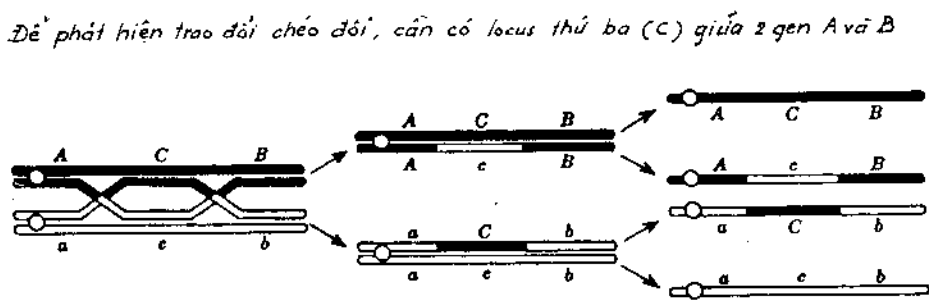
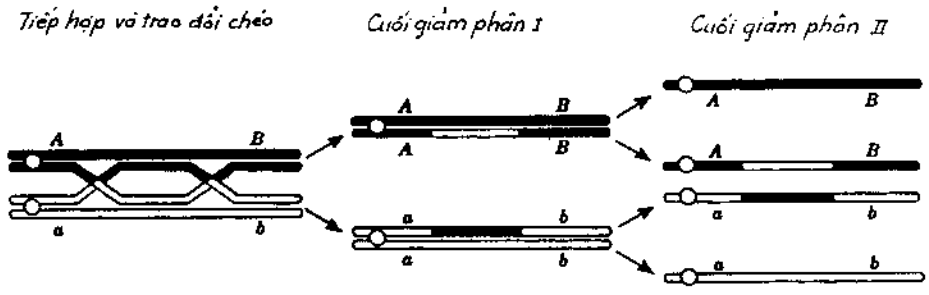
Một cặp nhiễm sắc thể tương đồng bất cặp có 4 chromatid nên gọi là **bộ bốn** (tetrade). Thường mỗi bộ bốn có ít nhất một **hình chéo** (xem hình 4.24). Các nhiễm sắc thể càng dài càng có nhiều hình chéo, biểu hiện nhìn thấy của trao đổi chéo.

Khi một hình chéo xảy ra giữa hai gen đánh dấu, chỉ một nửa sản phẩm của chia giảm nhiễm là tái tổ hợp (4 chromatid chỉ có 2 cái có tái tổ hợp). Tần số tương đối của các hình chéo bằng gấp đôi tần số tương đối của các sản phẩm tái tổ hợp :

$$\begin{aligned} \% \text{ hình chéo} &= 2 \times \% \text{ các chromatid cấu trúc lại} \\ \text{hay } \% \text{ các chromatid cấu trúc lại} &= 1/2 \text{ số } \% \text{ của hình chéo.} \end{aligned}$$

Ví dụ : Nếu trong 30% các bộ bốn (tetrades) có một hình chéo giữa các gen A và B thì kiểu gen AB/ab cho ra là 15% các giao tử tái tổ hợp (Ab và aB) và 85% các giao tử cha mẹ (AB và ab). Ngược lại, nếu biết 15% giao tử tái tổ hợp, tần số hình chéo sẽ là $15\% \times 2 = 30\%$.

5. Đa trao đổi chéo (*Multiple crossing - over*)



Hình 4.25. Đa trao đổi chéo

Trao đổi chéo giữa hai chromatid có thể xảy ra nhiều hơn một lần tức 2, 3, 4 lần, ... (hình 4.25). Nếu hai trao đổi chéo xảy ra trên cùng hai chromatid ở đoạn giữa hai gen đánh dấu thì sản phẩm cuối cùng đều có kiểu cha mẹ (tức không phát hiện được). Kiểu trao đổi chéo này chỉ có thể phát hiện được khi sử dụng thêm một gen đánh dấu thứ ba nằm giữa A và B.

Nếu xác suất trao đổi chéo giữa A và C và giữa C và B tương ứng với x và y thì xác suất xảy ra trao đổi chéo đôi bằng xy (tích của hai xác suất).

Ví dụ : Biết một cá thể ABC/abc, nếu A và B có tần số tái tổ hợp 20% và nếu B và C tái tổ hợp trong 10% trường hợp thì tần số trao đổi chéo đôi bằng 2% ($0,2 \times 0,1 = 0,02$).

LƯU Ý : Hai khái niệm *trao đổi chéo* và *hoán vị gen không đồng nghĩa*. Trao đổi chéo xảy ra giữa 2 gen với *số lần lẻ* thì mới có hoán vị gen. Trao đổi chéo có thể đồng nghĩa với *hoán vị đoạn nhiễm sắc thể*.

6. Nhiều (*Interference*) và trùng hợp (*Coincidence*)

Thường thì hình chéo ở một chỗ làm giảm xác suất hình chéo thứ hai gần kề nó. Đó là hiện tượng nhiễu. Để đánh giá kết quả, người ta dùng hệ số trùng hợp (coefficient of coincidence).

$$= \frac{\% \text{ trao đổi chéo đôi quan sát được}}{\% \text{ trao đổi chéo đôi theo lí thuyết.}}$$

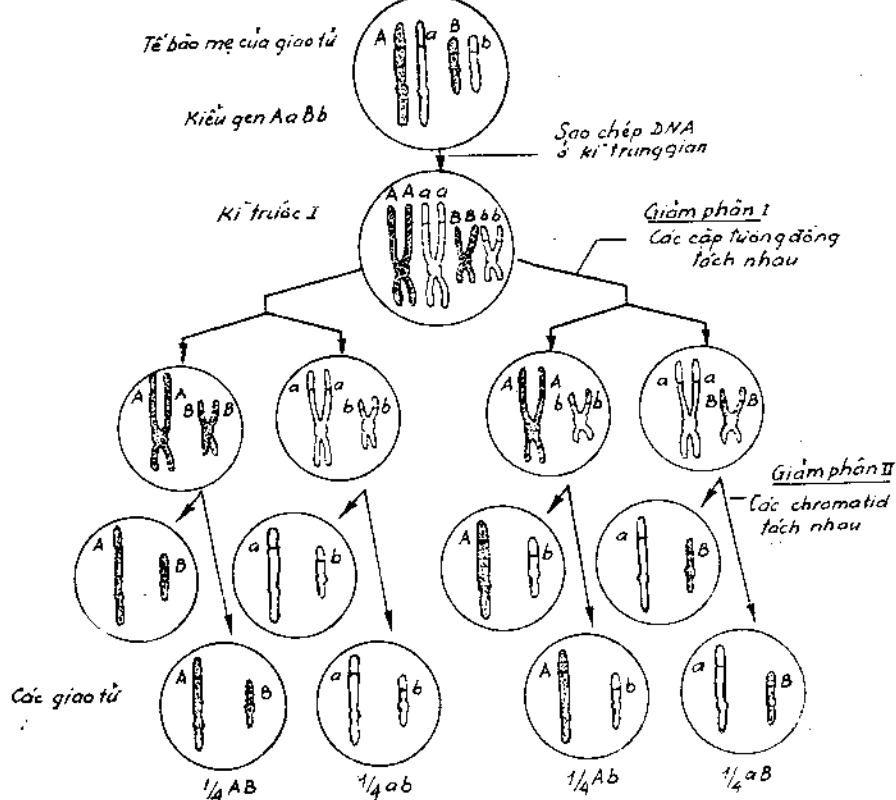
Sự trùng hợp + Nhiều = 1.

Ví dụ : Biết khoảng cách A – B và B – C = 20, nếu không có nhiễu thì tần số trao đổi chéo đôi theo lí thuyết là $0,1 \times 0,2 = 0,02$ hay 2%. Giả sử quan sát được tần số trao đổi chéo là 1,6%. Sự trùng hợp = $1,6 / 2,0 = 0,8$.

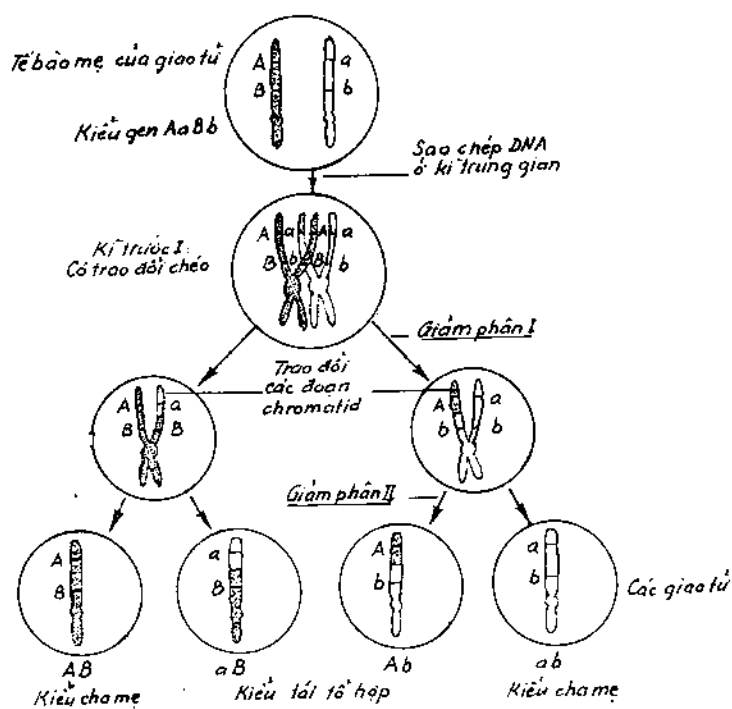
Điều này cho thấy trao đổi chéo đôi chỉ xảy ra có 80% và sự nhiễu = $1,0 - 0,8 = 0,2$ hay 20%.

7. Tương quan đồng hành giữa gen và nhiễm sắc thể

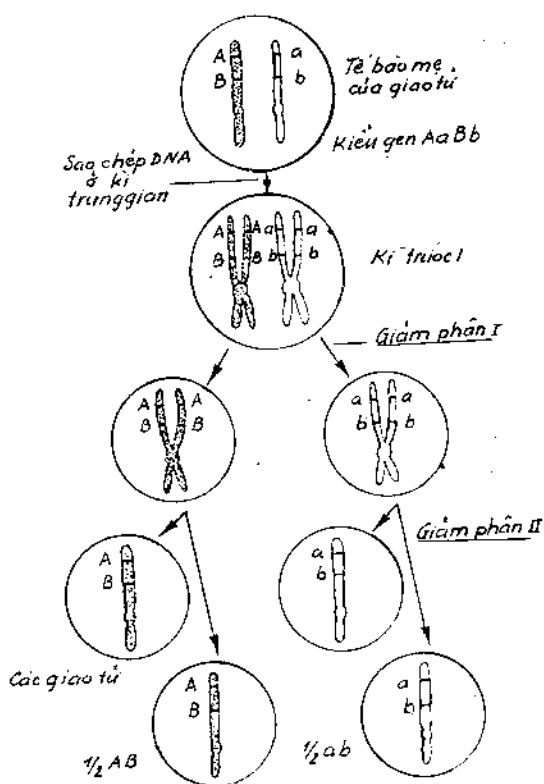
Đến đây, có thể hệ thống lại sự di truyền của các gen trong trường hợp nào thì đúng với các quy luật Mendel và khi nào có sự liên kết gen. Trong cả hai trường hợp, các cơ chế di truyền đều gắn chặt với các nhiễm sắc thể và hoạt động của chúng trong giảm phân. Khi 2 gen A và B nằm trên 2 cặp nhiễm sắc thể khác nhau thì chúng có sự tổ hợp tự do theo Mendel (hình 4.26). Nếu chúng ở trên 1 nhiễm sắc thể, sẽ có sự di truyền liên kết hoàn toàn (hình 4.28) hay không hoàn toàn khi có trao đổi chéo (hình 4.27).



Hình 4.26. Hai cặp allele trên các nhiễm sắc thể khác nhau



Hình 4.27. Liên kết có trao đổi chéo



Hình 4.28. Liên kết không có trao đổi chéo

Như vậy, quy luật tổ hợp tự do của Mendel chỉ đúng khi các gen nằm trên các cặp **nhễm sắc thể thường** khác nhau. Ở mỗi loài, số cặp tính trạng **tối đa** trong lai đa tính **bằng số nhóm liên kết gen (n)**.

Di truyền học Morgan không mâu thuẫn với di truyền học Mendel, mà chỉ rõ giới hạn đúng của quy luật Mendel.

VIII. XÁC ĐỊNH VỊ TRÍ GEN VÀ BẢN ĐỒ DI TRUYỀN

1. Khái niệm locus

Gen được chứng minh nằm trên nhiễm sắc thể và chiếm một vị trí xác định. Khái niệm **locus** được nêu ra để chỉ **vị trí của gen** trên nhiễm sắc thể. Như vậy **các allele** của một gen sẽ có cùng một vị trí trên nhiễm sắc thể. Ở các sinh vật lưỡng bội (2n) mỗi nhiễm sắc thể tương đồng chỉ mang một allele và mỗi tế bào chỉ mang 2 allele của mỗi gen. Nếu hai allele này khác nhau, cá thể dị hợp tử có thể mang kiểu hình trội hoặc trung gian, nhưng trong hậu thế không có kiểu hình tái tổ hợp.

2. Xác định vị trí gen

Morgan cho rằng những gen *đứng gần* nhau thì *liên kết chặt*, còn các gen *đứng xa* nhau *liên kết yếu*. Những gen đứng gần nhau liên kết chặt nên ít xảy ra trao đổi chéo, tần số tái tổ hợp nhỏ, còn các gen đứng xa nhau thì mức liên kết yếu nên tần số tái tổ hợp lớn hơn. Nếu cho rằng các phần của nhiễm sắc thể có khả năng trao đổi chéo như nhau thì *tần số tái tổ hợp* phản ánh *khoảng cách tương đối* giữa các gen và *tỉ lệ nghịch* với *mức liên kết gen*.

Số phần trăm tái tổ hợp được dùng làm số đo khoảng cách giữa hai gen trên bản đồ di truyền. 1 đơn vị bản đồ được coi là đơn vị đo khoảng cách giữa 2 cặp gen khi trong 100 sản phẩm của giảm phân có 1 dạng tái tổ hợp. Cụ thể, 1% tái tổ hợp = 1 đơn vị bản đồ. Đơn vị này được gọi là *centimorgan* (*c.M*) để đánh dấu công lao của Thomas Hunt Morgan.

Morgan cũng giả thiết rằng các gen xếp trên nhiễm sắc thể theo đường thẳng. Thực nghiệm đã chứng minh điều đó. Ví dụ : 3 gen liên kết với nhau là b (thân đen), vg (cánh cụt) và C (curved - cánh vênh) có tần số tái tổ hợp như sau :

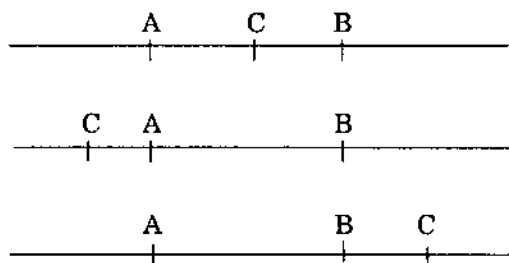
$$\begin{array}{lcl}
 b - vg = 17\% & \begin{array}{c} b \quad \xrightarrow{17\%} \quad vg \quad \xrightarrow{8\%} \quad C \\ \xleftarrow{25\%} \quad \quad \quad \xrightarrow{\quad} \end{array} \\
 vg - C = 8\% \\
 b - C = 25\%
 \end{array}$$

Như vậy, biết được tần số tái tổ hợp giữa các gen có thể *xác định vị trí* của chúng trên nhiễm sắc thể.

Muốn xác định vị trí của một gen bất kì nào đều phải tiến hành lai và qua hai bước lớn :

– Căn cứ tỉ lệ phân li để *xác định nhóm liên kết gen*.

– Dựa vào tần số tái tổ hợp so với 2 gen khác để xếp vị trí trên nhiễm sắc thể. Ví dụ : Xác định vị trí của gen C so với 2 gen A và B trên nhiễm sắc thể. Gen C có thể nằm giữa A và B, hoặc phía ngoài A hoặc phía ngoài B.



Nếu :

– C nằm giữa AB ta sẽ có : $AC + CB = AB$

– C nằm ngoài phía A ta sẽ có : $CB - CA = AB$ ($CB > CA$).

– C nằm ngoài phía B ta sẽ có : $CA - CB = AB$ ($CA > CB$).

So sánh cụ thể tần số tái tổ hợp giữa C – A, C – B và A – B xác định được vị trí của C.

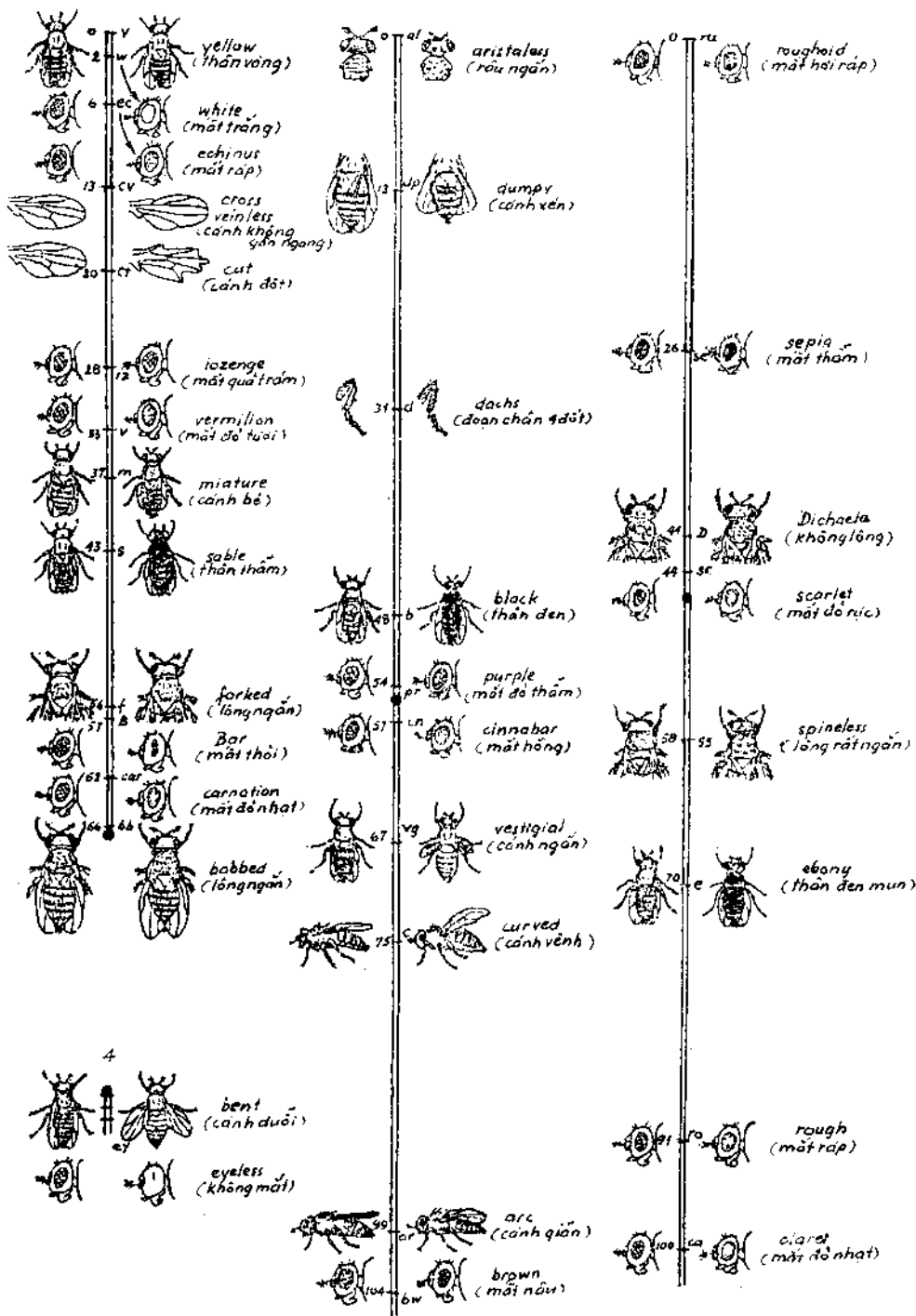
3. Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể và bản đồ di truyền tế bào

Nhờ xác định được vị trí gen, các *bản đồ di truyền nhiễm sắc thể* của nhiều đối tượng như ruồi giấm *Drosophila melanogaster* (hình 4.29), cà chua, bắp ... đã được xây dựng.

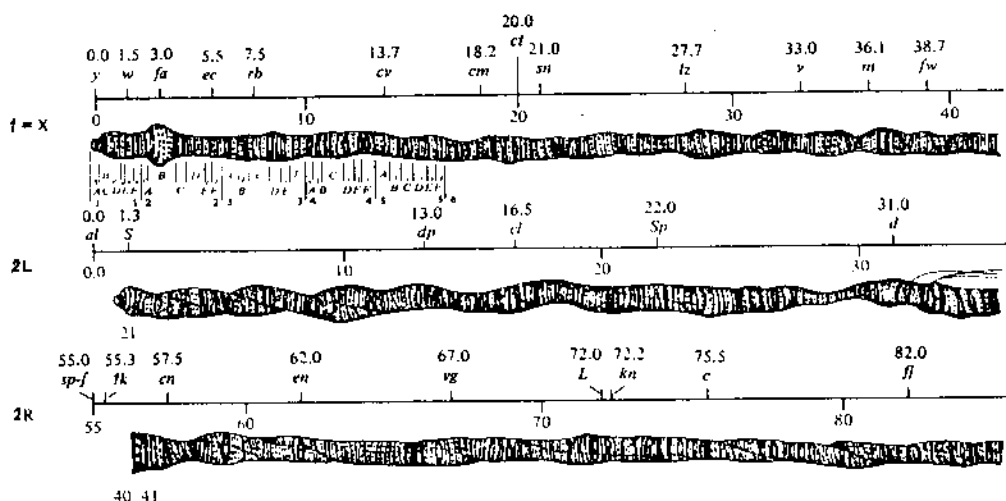
Bộ gen ruồi giấm chia thành *bốn nhóm*, phù hợp với *bốn đôi nhiễm sắc thể*. Trên hình chỉ ghi các đột biến chính so với kiểu hình dại. Chú ý là các gen liên quan đến kiểu hình mắt, cánh, màu thân... có thể phân bố ở các nhiễm sắc thể khác nhau. Tần số tái tổ hợp trong mỗi lần lai không quá 50%, nhưng khoảng cách trên bản đồ vượt số đó, do các tần số tái tổ hợp của từng cặp gen được cộng lại.

Năm 1934, *nhiễm sắc thể khổng lồ* ở tuyến nước bọt ruồi giấm được phát hiện. Quan sát kính hiển vi thường có thể nhìn thấy các *vết nhuộm màu đặc trưng* (khoảng 5000 vết) của nhiễm sắc thể khổng lồ sau khi nhuộm. Nhiều dạng đột biến, thường là đột biến nhiễm sắc thể gây những biến đổi hình thái quan sát rõ rệt trên nhiễm sắc thể khổng lồ. Điều này được sử dụng để lập *bản đồ di truyền tế bào* (cytogenetic map) (hình 4.30), mà không theo tần số tái tổ hợp do lai.

Sự đối chiếu giữa *bản đồ di truyền nhiễm sắc thể* và lập *bản đồ di truyền tế bào* cho thấy có sự *giống nhau về trình tự sắp xếp gen* theo đường thẳng, tuy khoảng cách có khác nhau. Điều này khẳng định thêm rằng gen nằm trên nhiễm sắc thể.



Hình 4.29. Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể (các gen chính) của *Drosophila*



Hình 4.30. Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể khổng lồ ở tuyến nước bọt của *Drosophila*

IX. SỰ ĐA DẠNG CỦA CÁC CƠ CHẾ DI TRUYỀN

Các nghiên cứu của Mendel và Morgan được tiến hành và xác nhận sự đúng đắn của các quy luật di truyền ở các sinh vật bậc cao mà trong chu trình sống có giảm phân. Đậu *Pisum sativum* và ruồi giấm *Drosophila* có chu trình sống phần lớn là **lưỡng bội**. Một xu hướng tiến hóa của sinh giới là **lưỡng bội hóa**. Tuy nhiên chiếm phần lớn sinh khối trên Trái Đất lại là các loài **nấm** và **tảo**. Chúng có chu trình sống với các **dạng đơn bội chiếm ưu thế**.

Các **cơ chế di truyền** liên quan chặt chẽ với **sinh sản** mà trong đó hoạt động của các nhiễm sắc thể giữ vai trò chủ yếu. Thế giới sinh vật rất đa dạng với hàng triệu loài, mà mỗi loài có những đặc điểm sinh sản riêng và kèm theo đó là sự đa dạng di truyền của sinh giới.

1. Sinh sản vô tính

Sinh sản vô tính là kiểu sinh sản từ một tế bào hay nhóm tế bào mẹ chỉ qua nguyên phân để tạo ra các cơ thể con. Kiểu sinh sản này giữ nguyên các đặc tính di truyền của cá thể mẹ ban đầu ở cơ thể con. Nguyên phân là cơ sở của sự **tăng trưởng** ở các sinh vật đa bào và **sinh sản vô tính ở các sinh vật nói chung**. Sinh sản vô tính có ở cả sinh vật đơn bội và lưỡng bội, là cơ chế ổn định bộ gen qua nhiều thế hệ.

Sự tăng số lượng tế bào của sinh vật đa bào nhờ nguyên phân. Ở người, hợp tử sau nhiều lần chia nguyên phân hình thành nên cơ thể gồm nhiều tỉ

tế bào. Nhờ đó, trừ tế bào sinh dục, các tế bào của cơ thể đều có bộ nhiễm sắc thể như nhau, tương ứng có lượng thông tin di truyền giống nhau.

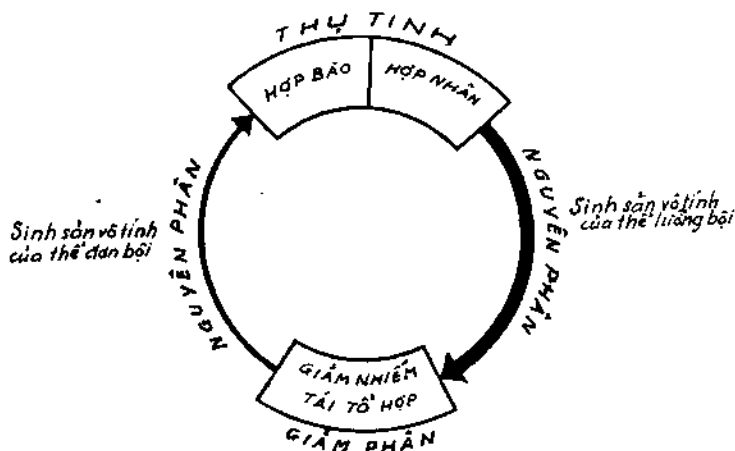
Sinh sản vô tính được ứng dụng rộng rãi trong nhân giống và nuôi cấy mô tế bào thực vật và động vật.

2. Sinh sản hữu tính

Sinh sản hữu tính là kiểu sinh sản trong đó có *sự kết hợp* các tế bào sinh dục của hai cá thể khác nhau. Sinh sản hữu tính tạo sự đa dạng di truyền làm nguồn nguyên liệu cho tiến hóa. Một trong những xu hướng tiến hóa của sinh giới là sinh sản hữu tính. Sự đa dạng của các kiểu sinh sản hữu tính thể hiện một phần ở các kiểu xác định giới tính đã được nêu ở phần giới tính. Sự tiến hóa đã tạo nhiều cơ chế để *duy trì sự đa dạng*.

3. Chu trình sống hay vòng đời

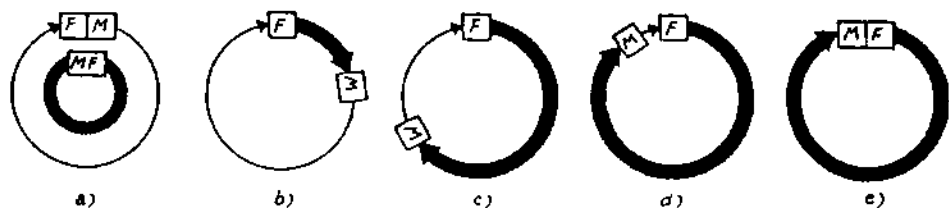
Nhiều sinh vật có sự thay đổi thể hệ đơn bội và lưỡng bội nối tiếp nhau thành chu kì gọi là *chu trình sống* (hình 4.31). Vòng đời điển hình của *Eukaryotae* gồm : thụ tinh có hợp tế bào chất và hợp nhân ; sinh sản vô tính của tế bào $2n$ nhờ nguyên phân ; giảm phân có giảm nhiễm và tái tổ hợp ; các tế bào (n) sinh sản vô tính hoặc kết hợp với nhau (thụ tinh.)



Hình 4.31. Chu trình sống hay vòng đời

Những thay đổi trong chu trình sống liên quan chặt chẽ với sự thay đổi nhiễm sắc thể, có cơ sở vật chất là các gen. Điều đó dẫn đến sự đa dạng các cơ chế di truyền liên quan đến đặc điểm sinh sản của các loài.

Sự đa dạng các chu trình sống ở các nhóm phân loại khác nhau có thể do thời gian kéo dài khác nhau của các pha đơn bội và lưỡng bội (hình 4.32).



Hình 4.32. Chu trình sống của các nhóm sinh vật chủ yếu

Các kí hiệu : M - giảm phân ; F - thụ tinh ; đường gạch mỏng - đơn bội n ;
đường gạch dày - lưỡng bội 2n.

a) Các Eukaryotae đơn bào (vi tảo, vi nấm) ; b) Rêu ;

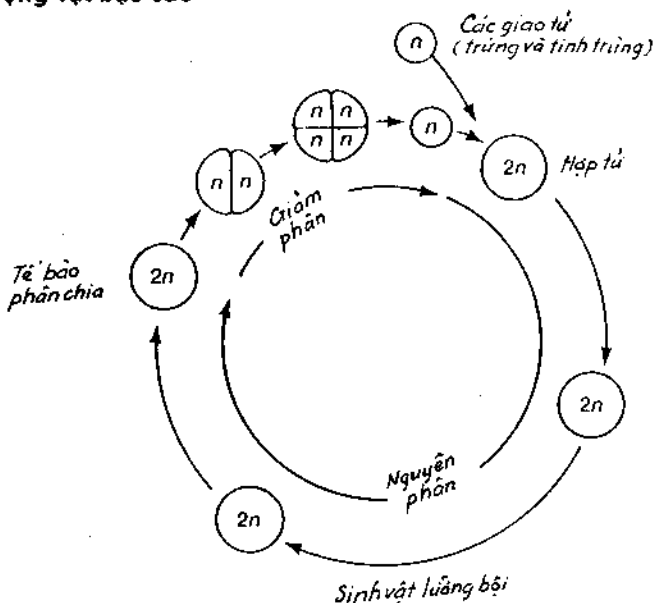
c) Dương xỉ ; d) Thực vật bậc cao ; e) Động vật bậc cao

Sau đây, chúng ta tìm hiểu về các nhóm chính thường gặp trong các nghiên cứu di truyền.

a) Các Eukaryotae đơn bào

Trong các phần trước chu trình sống của vi tảo (*Chlamydomonas reinhardi* - h.4.16) đã được mô tả. Điểm đặc biệt là các giai đoạn đơn bội và lưỡng bội có thể tồn tại một thời gian dài.

b) Các động vật bậc cao



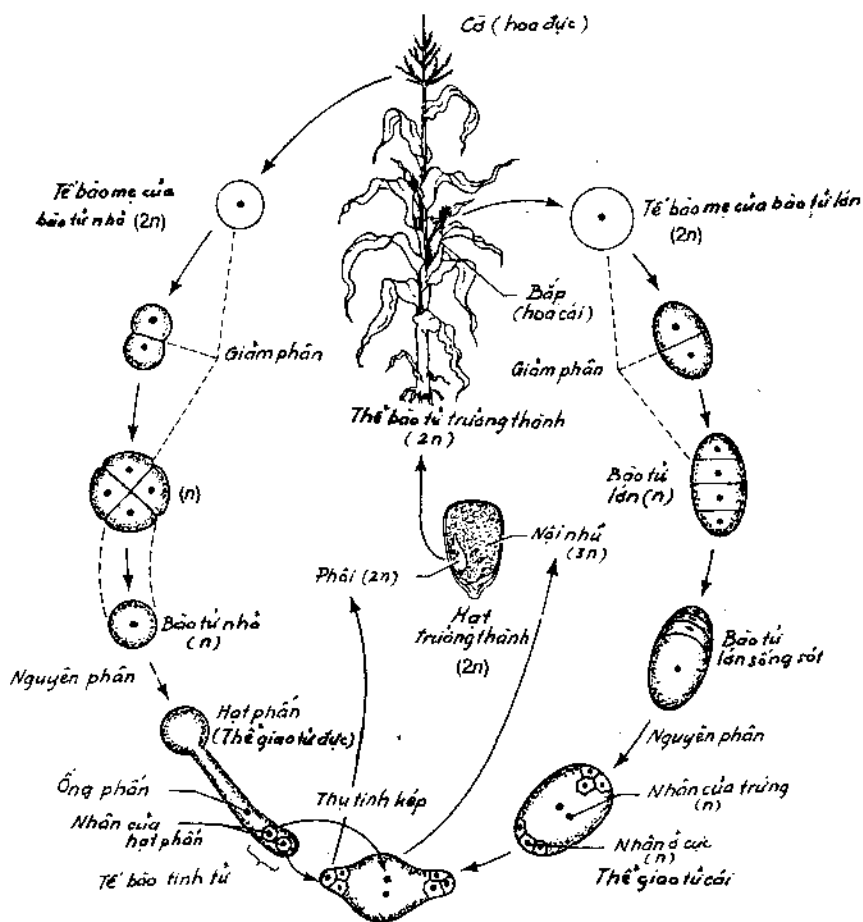
Hình 4.33. Chu trình sống điển hình của động vật bậc cao

Cơ thể các động vật bậc cao là lưỡng bội. Trong quá trình sinh sản, phân bào giảm nhiễm tạo các giao tử đơn bội, mà sự hợp nhất của chúng tạo thành hợp tử. Các giao tử là những tế bào đơn bội được chuyên hóa cho sinh sản hữu tính. Ở con đực, quá trình *sinh tinh* (spermatogenesis) tạo ra 4 tế bào *tinh tử* từ mỗi tế bào đơn bội. Ở con cái, quá trình *sinh trứng* (oogenesis) chỉ sinh sản ra một tế bào trứng trưởng thành, các *thể phân cực* không có hoạt động chức năng (hình 4.33).

c) Chu trình sống của thực vật bậc cao

Chu trình sống của cây bắp được coi là điển hình ở thực vật bậc cao (hình 4.34). Phân bào giảm nhiễm ở thực vật tạo ra các tế bào đơn bội được gọi là bào tử (spores) giai đoạn I, mà chúng thường phân chia nguyên nhiễm tạo cây đa bào đơn bội (giai đoạn II). Lập tức các thực vật đơn bội này sản sinh ra các giao tử (giai đoạn III) bằng chia nguyên nhiễm. Hai giao tử khác nhau hợp nhất tạo hợp tử lưỡng bội (giai đoạn IV), rồi từ hợp tử phát triển thành cây đa bào lưỡng bội (giai đoạn V) và như vậy chu trình khép kín. Phần lớn các thực vật đa bào có cả 5 giai đoạn trong chu trình sống của chúng. Nhưng tầm quan trọng tương đối của các giai đoạn thì dao động đáng kể. Nói chung, giai đoạn đơn bội chiếm ưu thế ở thực vật bậc thấp và giai đoạn lưỡng bội chiếm ưu thế ở các thực vật bậc cao.

Khả năng các giao tử được sản sinh ra do một cây, kết hợp với nhau tạo thế hệ con có sức sống và hữu thụ là đặc tính chung của nhiều họ cây có hoa. Các hoa hoàn chỉnh của một số thực vật đồng chu mở ra cho đến khi hạt phấn chín và tự thụ phấn. Tự thụ phấn là bắt buộc ở đại mạch (*Hordeum vulgare*), đậu, đậu nành, thuốc lá, cà chua, lúa mì, lúa nước và nhiều cây trồng khác. Ở một số loài khác, tự thụ phấn và thụ phấn chéo xảy ra với các mức dao động khác nhau. Ví dụ : cây bông vải và bo bo (*Sorgum*) thường hơn 10% thụ phấn chéo. Trong khi đó, một số thực vật đồng chu có sự phát triển các cơ chế di truyền ngăn trở sự tự thụ phấn, tức ngăn trở sự tạo thành hợp tử của các giao tử giống nhau về kiểu gen, gây nên thụ phấn chéo bắt buộc. Sự tự bất dung hợp (self - incompatibility) ở các loài đồng chu là cơ chế tăng cường thụ phấn chéo.



Hình 4.34. Chu trình sống của cây bắp (ngô)

TÓM TẮT CHƯƠNG

Học thuyết di truyền nhiễm sắc thể là bước phát triển tiếp theo của di truyền học có sự **kết hợp với tế bào học**. Sự phát triển của giai đoạn này gắn liền với **nhóm Morgan** và ruồi giấm (M) *Drosophila* (D).

Các **nhiễm sắc thể**, có hình dạng và số lượng ổn định, hình thành **kiểu nhân** đặc trưng cho mỗi loài. Trong chu trình tế bào, **nguyên phân** chỉ xảy ra trong thời gian ngắn sau khi DNA đã được sao chép. Nguyên phân xảy ra ở tế bào đơn bội và lưỡng bội, nó tạo ra các tế bào con có kiểu gen giống tế bào mẹ. **Giảm phân** chỉ xảy ra ở tế bào lưỡng bội, nó tạo ra các tế bào con đơn bội với sự đa dạng di truyền.

Có nhiều kiểu *xác định giới tính* liên quan đến các *nhịễm sắc thể giới tính*. Sự di truyền *liên kết với giới tính* là các nghiên cứu đầu tiên của di truyền học *nhịễm sắc thể*.

Gen được chứng minh *nằm trên nhịễm sắc thể* và *xếp theo đường thẳng*. Các gen nằm cùng một *nhịễm sắc thể* có sự di truyền liên kết hoàn toàn và không hoàn toàn, chúng tạo thành *nhóm liên kết gen*. Giữa các *nhịễm sắc thể tương đồng* có thể xảy ra *trao đổi chéo* dẫn đến *tái tổ hợp* các gen. Trao đổi chéo có thể đơn hoặc đa. Các hình chéo trong giảm phân là biểu hiện thấy được của trao đổi chéo. Dựa vào tần số tái tổ hợp ổn định giữa các gen, xây dựng các *bản đồ di truyền nhịễm sắc thể*. Sự kết hợp giữa quan sát *nhịễm sắc thể khổng lồ* với các biến đổi di truyền đã giúp xây dựng *bản đồ di truyền tế bào*.

Các nhóm sinh vật khác nhau có sự *đa dạng* về các *cơ chế di truyền* phụ thuộc vào các kiểu sinh sản và *chu trình sống*.

Học thuyết di truyền *nhịễm sắc thể* củng cố *học thuyết về gen của Mendel*, nó cụ thể hóa thêm và chỉ rõ giới hạn của các quy luật phân li độc lập của Mendel.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Ruồi giấm có những ưu điểm nào trong nghiên cứu di truyền ?
2. DNA sao chép lúc nào và có ý nghĩa gì trong chu trình tế bào ?
3. Kỳ nào của giảm phân có những sự kiện đặc biệt quan trọng đối với các cơ chế di truyền ?
4. Vì sao nhiều sinh vật có tỉ lệ giới tính 1 : 1 ?
5. Có những kiểu xác định giới tính nào ?
6. Phân tích sự giống nhau và khác nhau trong cơ chế xác định giới tính của *nhịễm sắc thể Y* ở người và ở *Drosophila*.
7. Nêu vài ví dụ về gen xác định giới tính.
8. Vì sao ở người có một số rất ít ngoại lệ là nam XX và nữ XY ?
9. Các gen liên kết cả với X và Y là gen gì ?
10. Sự di truyền liên kết giới tính có đặc điểm gì ?
11. Do đâu xuất hiện các dạng tái tổ hợp ?
12. Vì sao hình chéo là biểu hiện thấy được của trao đổi chéo ?
13. Vì sao tần số tái tổ hợp được dùng để xác định khoảng cách tương đối giữa 2 gen ?

14. Bản đồ nhiễm sắc thể và di truyền tế bào có ý nghĩa gì ?
15. Hãy chứng minh : trao đổi chéo xảy ra giữa 4 chromatid.
16. Vì sao một hướng tiến hóa là hoàn thiện sinh sản hữu tính ?
17. Chu trình sống có ý nghĩa như thế nào đối với các cơ chế di truyền?
18. Di truyền học Morgan bổ sung cho di truyền học Mendel như thế nào?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

1. Ở thỏ allele trội tạo màu đốm trên thân và allele lặn tạo màu đều. Allele trội của một gen khác tạo lông ngắn, và allele lặn tạo lông dài. Các thỏ dị hợp tử cả hai tính trạng được giao phối với các thỏ đồng hợp tử lặn. Kết quả lai thu được như sau : 96 đốm, lông ngắn ; 14 đều, lông ngắn ; 10 đốm, lông dài ; 80 đều, lông dài.

Điều gì chứng minh có liên kết gen trong tổ hợp lai này ? Xác định số phần trăm tái tổ hợp và khoảng cách giữa các gen.

Bài giải

– Các gen liên kết với nhau vì tỉ lệ phân li không trùng với tỉ lệ 1 : 1 : 1 : 1 (tỉ lệ của phép lai phân tích 2 cặp tính trạng khi các gen phân li độc lập với nhau).

– Số % tái tổ hợp là :

$$\frac{(14 + 10)}{200} \times 100 = 12\%$$

– Khoảng cách giữa các gen là 12 centimorgan (c.M).

2. Các khoảng cách di truyền giữa 6 gen của nhóm liên kết thứ hai của tằm tơ *Bombyx mori* được trình bày trên bảng sau. Xây dựng bản đồ di truyền của nhóm liên kết này.

	Gr	Rc	S	Y	P	oa
Gr	—	25	1	19	7	20
Rc	25	—	26	6	32	5
S	1	26	—	20	6	21
Y	19	6	20	—	26	1
P	7	32	6	26	—	27
oa	20	5	21	1	27	—

Bài giải

– *Giai đoạn 1* : Trong bài toán này, việc chọn điểm bắt đầu ít quan trọng, chúng ta có thể bắt đầu việc chọn 3 gen đầu tiên trên bảng. Khoảng cách $Gr - Rc = 25$ và $Gr - S = 1$. Các vị trí tương ứng của 3 gen này có thể như sau :

a. $\frac{S <1> Gr \text{ ----- } 25 \text{ ----- } Rc}{}$

b. $\frac{Gr <1> S \text{ ----- } 24 \text{ ----- } Rc}{}$

Số liệu trên bảng cho thấy $S - Rc$ là 26 đơn vị. Vị trí a đúng. Gr nằm giữa S và Rc .

– *Giai đoạn 2* : Khoảng cách $Gr - Y = 19$ đơn vị, có 2 khả năng :

c. $\frac{S \quad Gr \quad \quad \quad Y \quad \quad \quad Rc}{<1> \text{-----} 19 \text{-----} <- 6 \text{-----}>}$

hay

d. $\frac{Y \quad \quad \quad S \quad Gr \quad \quad \quad Rc}{<- 18 \text{-----}> <1> \text{-----} 25 \text{-----}>}$

Số liệu trên bảng cho thấy $Y - Rc = 6$, nên vị trí c đúng.

– *Giai đoạn 3* : Suy luận tương tự $P - Gr = 7$ đơn vị và nằm bên trái Gr vì khoảng cách $P - Y$ (26), bằng tổng các khoảng cách $P - Gr$ (7) + $Gr - Y$ (19). oa nằm kế Y (1 đơn vị) và ở giữa Y và Rc . Kết quả chung là :

$\frac{P \quad \quad \quad S \quad Gr \quad \quad \quad Y \quad oa \quad \quad \quad Rc}{<- 6 \text{-----}> <1> \text{-----} 19 \text{-----}> <1> <- 5 \text{-----}>}$

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Ở người, sự có mặt của kháng thể Rh trên bề mặt hồng cầu (Rh^+) do gen trội R , không có kháng thể (Rh^-) do allele lặn r ở trạng thái đồng hợp tử. Sự có mặt của allele trội E làm cho hồng cầu có dạng bầu dục, còn allele lặn e ở trạng thái đồng hợp tử làm các hồng cầu có dạng tròn bình thường. Cả hai gen nói trên đều nằm trên một nhiễm sắc thể thường cách nhau khoảng 20

đơn vị. Một người có hồng cầu bầu dục, có mẹ đồng hợp tử Rh^+ hồng cầu bình thường và cha Rh^- dị hợp tử về biến dạng hồng cầu, kết hôn với người đàn bà Rh^- hồng cầu bình thường.

- Xác suất để đứa con đầu tiên là Rh^- , hồng cầu bầu dục là bao nhiêu ?
- Nếu đứa con đầu tiên là Rh^+ thì xác suất để có hồng cầu bầu dục là bao nhiêu ?

2. Ở bắp, gen trội C tạo màu nội nhũ còn allele lặn c của nó không tạo màu. Một gen trội Sh khác tạo hạt đầy đặn còn allele lặn sh của nó làm hạt nhăn nheo. Gen trội Wx thứ ba tạo tinh bột tẻ, còn allele lặn wx của nó tạo tinh bột nếp. Một cây đồng hợp tử bất nguồn từ hạt không màu, đầy đặn, tinh bột nếp được lai với một cây đồng hợp tử từ hạt có màu, nhăn nheo, tinh bột tẻ bình thường. Thế hệ F_1 được đem lai phân tích với một dòng hạt không màu, nhăn và bột nếp. Thế hệ con lai gồm : 113 không màu, nhăn, bột tẻ ; 4 có màu, đầy đặn, bột tẻ ; 2708 không màu, đầy đặn, bột nếp ; 626 không màu, đầy đặn, bột tẻ ; 2 không màu, nhăn, bột nếp ; 116 có màu, đầy đặn, bột nếp ; 2538 có màu, nhăn, bột tẻ ; 601 có màu, nhăn, bột nếp.

- Xây dựng bản đồ của vùng nhiễm sắc thể này. Làm tròn số phần trăm để chỉ có một số sau dấu phẩy.
- Giao thoa (nhiều) ở vùng này là bao nhiêu ?

3. Ở gà mái (ZW) có 2 gen lặn liên kết với giới tính : một sl làm lông mọc nhanh, còn cái kia s cho màu lông vàng. Các allele trội của chúng tương ứng là (Sl) làm lông mọc chậm và (S) cho màu lông bạc. Các con mái của chủng "Silver Penciled Rock" có lông bạc và mọc chậm đã được lai với những con trống của chủng "Brown Leghorn" có bộ lông vàng và mọc nhanh. Bản dưới đây kê kết quả tiếp theo của F_2 .

	chậm, bạc	nhanh, bạc	chậm, vàng	nhanh, vàng
Trống	94	40	7	127
Mái	117	28	7	156

- Xác định kiểu gen và kiểu hình của F_1 .
- Các gen đã gắn nhau như thế nào ở các con trống F_1 ?
- Hãy tính tổng tái tổ hợp giữa các locus trên ở các con trống.

4. Ở tằm tơ, màu vàng đậm của huyết tương (hemolymph) do tác động của gen trội Y nằm ở locus 25,6 (kể từ đầu mút nhiễm sắc thể). Một đột biến trội khác Rc nằm cách Y 6,2 đơn vị, xác định màu rỉ của kén. Giữa hai locus này, ở locus 26,7 có một gen lặn oa gây những đốm trong mờ trên da của tằm con. Rc và oa cách nhau 5,1 đơn vị. Một con đồng hợp tử đối với huyết tương vàng, da đốm và có kén màu bình thường, được lai với cá thể có kiểu gen $Y^+ oa^+ Rc / Y^+ oa^+ Rc$ có kén màu rỉ. Các cá thể đực của F_1 tiếp theo được đem lai phân tích tạo ra 3000 hậu thế F_2 . Giả định rằng sự trùng hợp (coincider) là 10%.

a) Hãy dự đoán số cá thể của các nhóm kiểu hình khác nhau trong các con lai (làm tròn thành số chẵn).

b) Về xác suất, phải có bao nhiêu con lai nữa để có thể quan sát một hậu thế trong mỗi một nhóm có tái tổ hợp đôi ?

PHẦN II

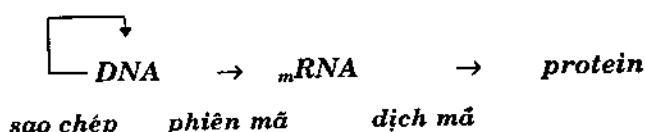
CƠ SỞ PHÂN TỬ CỦA TÍNH DI TRUYỀN

Đến những năm 1940, di truyền học cổ điển được coi là "*di truyền học hình thức*" (formal genetics), vì chỉ căn cứ vào các kết quả lai hay quan sát tế bào học mà suy đoán về các gen. Gen có bản chất hóa học như thế nào ? Nó thực hiện chức năng sinh hóa ra sao ? Đó là những vấn đề còn bỏ ngỏ.

Năm 1941, G.Beadle và E.Tatum nghiên cứu các *đột biến sinh hóa* ở nấm mốc *Neurospora crassa* và nêu *giả thuyết 1 gen - 1 enzyme* cho thấy : gen xác định tính trạng thông qua việc kiểm soát các enzyme, chất xúc tác các phản ứng sinh hóa. Tiếp theo, các *đối tượng vi sinh vật* bắt đầu được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu di truyền, tạo bước phát triển mới.

Nhiều nhà vật lí học chuyển sang nghiên cứu sinh học đã đưa thêm tư duy chính xác vào sinh học. Các tiến bộ kĩ thuật hóa học đã cung cấp nhiều phương tiện hữu hiệu để chiết tách, tinh sạch, đo đếm các đại phân tử sinh học. Tính di truyền học được nghiên cứu về mặt hóa - lí.

Sau chiến tranh thế giới thứ hai, các nghiên cứu sinh học phát triển rất mạnh dẫn đến những phát minh lớn vào đầu những năm 50 như : xác nhận vai trò di truyền của DNA (1952), mô hình cấu trúc DNA của Watson-Crick (1953), xác định trình tự các amino acid của protein đầu tiên là insulin (Sanger, 1954). *Học thuyết* hay *giáo lí trung tâm* (central dogma) của sinh học phân tử ra đời :



Các phát minh quan trọng này đã tạo nên một cuộc *cách mạng* thật sự trong sinh học dẫn đến hình thành lĩnh vực mới là *sinh học phân tử*, mà di truyền học phân tử là nội dung căn bản.

BẢN CHẤT CỦA VẬT CHẤT DI TRUYỀN

Sau khi tìm hiểu về gen và cơ sở nhiễm sắc thể của tính di truyền, chương này đi sâu vào các phân tử của vật chất di truyền là **DNA**, chất ki diệu nhất trong thiên nhiên, xuất phát điểm của mọi biểu hiện sống. Cấu trúc của phân tử DNA thích hợp cho việc **chứa** và **truyền đạt thông tin**, tự **sao chép** chính xác, có khả năng **biến dị** và **sửa sai**.

I. DNA LÀ CHẤT DI TRUYỀN

Vào năm 1868, vài năm sau khi Mendel công bố các quy luật di truyền, **Friedrich Miescher**, nhà sinh hóa học người Thụy Điển, phát hiện trong nhân tế bào bạch cầu một chất không phải protein và gọi là **nuclein** (từ chữ **nucleus** – nhân). Về sau thấy chất này có **tính acid** nên được gọi là **nucleic acid**. Nucleic acid có hai loại là desoxyribonucleic acid gọi tắt là DNA và ribonucleic acid (RNA). Chất mà ông Miescher tìm ra là DNA.

Năm 1914, nhà hóa học Đức R. Feulgen tìm ra phương pháp nhuộm màu đặc hiệu đối với DNA và mười năm sau cho thấy DNA của nhân giới hạn trong các nhiễm sắc thể. Nhiều sự kiện gián tiếp cho thấy DNA là chất di truyền, nhưng trong một thời gian dài quan niệm protein là chất di truyền vẫn ngự trị. Các nhiễm sắc thể đều có chứa DNA lẫn protein, hơn nữa lúc đó cho rằng các protein mới có đủ sự phức tạp hóa học cần thiết để chứa thông tin di truyền. Mãi đến năm 1944, vai trò mang thông tin di truyền của DNA mới được chứng minh lần đầu tiên và đến năm 1952 mới được công nhận sau nhiều tranh cãi.

1. Các chứng minh gián tiếp

Nhiều số liệu cho thấy có sự liên quan chặt chẽ giữa DNA và chất di truyền.

Thứ nhất, DNA có trong tế bào của tất cả các vi sinh vật, thực vật, động vật; chỉ giới hạn **trong nhân** và là thành phần chủ yếu của nhiễm sắc thể – một cấu trúc tế bào mang nhiều gen xếp theo đường thẳng.

Thứ hai, tất cả các tế bào dinh dưỡng (tế bào soma) của bất kì một loại sinh vật nào đều chứa **một lượng DNA rất ổn định** không phụ thuộc vào sự phân hóa chức năng hay trạng thái trao đổi chất. Ngược lại số lượng RNA biến đổi tùy theo trạng thái sinh lí của tế bào.

Thứ ba, **số lượng DNA** tăng theo **số bội thể** của tế bào : ở tế bào sinh dục đơn bội (n) số lượng DNA là 1 thì tế bào sinh dưỡng lưỡng bội ($2n$ nhiễm sắc thể) có số lượng DNA gấp đôi.

Thứ tư, tia tử ngoại (uv) có hiệu quả gây đột biến cao nhất ở bước sóng 260nm (nanomét); đây chính là bước sóng mà **DNA hấp thụ tia tử ngoại** nhiều nhất.

Tuy nhiên trong các số liệu trên, thành phần cấu tạo của nhiễm sắc thể ngoài DNA, còn có các protein. Do đó cần có các **chứng minh trực tiếp** mới khẳng định được vai trò vật chất di truyền của DNA. Các thí nghiệm này được tiến hành với các vi sinh vật *Procaryotae* có bộ gen là DNA trần không có protein.

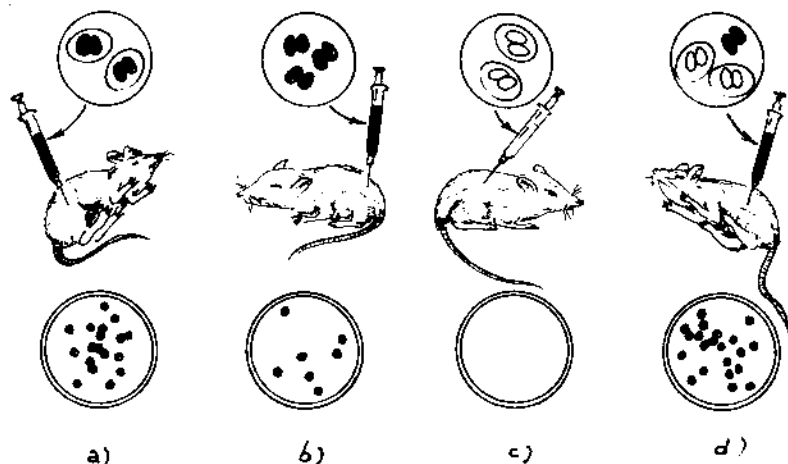
2. Biến nạp : truyền thông tin di truyền nhờ DNA

Hiện tượng biến nạp (transformation) được Griffith phát hiện ở vi khuẩn *Diplococcus pneumoniae* (nay gọi là *Streptococcus pneumoniae* – phế cầu khuẩn gây sưng phổi ở động vật có vú) vào năm 1928. Vi khuẩn này có 2 dạng khác nhau :

– Dạng S_{III} , gây bệnh có vỏ bao tế bào (capsule) bằng polysaccharid cản trở bạch cầu phá vỡ tế bào. Dạng này tạo khuẩn lạc láng (Smooth-láng) trên môi trường agar.

– Dạng R_{II} , không gây bệnh, không có vỏ bao, tạo khuẩn lạc nhăn (Rough-nhăn).

Thí nghiệm được tiến hành như mô tả trên hình 5.1.



Hình 5.1. Thí nghiệm biến nạp ở chuột

- Tiêm vi khuẩn S sống gây bệnh cho chuột → chuột chết.
- Tiêm vi khuẩn R sống không gây bệnh → chuột sống.
- Tiêm vi khuẩn S bị đun chết cho chuột → chuột sống.
- Hỗn hợp vi khuẩn S bị đun chết trộn với vi khuẩn R sống đem tiêm cho chuột → chuột chết. Trong xác chuột chết có vi khuẩn S và R.

Hiện tượng trên cho thấy vi khuẩn S không thể tự sống lại được sau khi bị đun chết, nhưng các tế bào chết này đã truyền tính gây bệnh cho tế bào R. Hiện tượng này được gọi là **biến nạp** (*transformation* có nghĩa *biến đổi*).

Năm 1944, T.Avery, McLeod và McCarty đã tiến hành thí nghiệm xác định rõ **tác nhân gây biến nạp**. Nếu các tế bào S bị xử lý bằng **protease** (enzyme phân hủy protein) hoặc **RNA-ase** (enzyme phân hủy RNA) hoạt tính biến nạp vẫn còn, chứng tỏ protein và RNA không phải là tác nhân gây biến nạp. Nhưng nếu tế bào S chết bị xử lý bằng **DNA-ase** (enzyme chỉ phân hủy đặc hiệu DNA) thì hoạt tính biến nạp không còn nữa, chứng tỏ **DNA là nhân tố biến nạp**. Kết quả thí nghiệm có thể tóm tắt như sau :

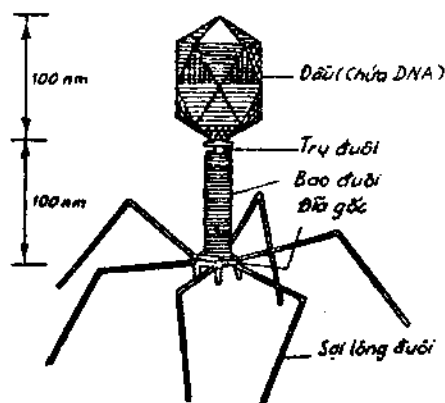
DNA của S + các tế bào R sống $\rightarrow$ chuột $\rightarrow$ chuột chết (có R + S)

Kết luận : Hiện tượng biến nạp là một chứng minh sinh hóa xác nhận rằng **DNA mang tín hiệu di truyền**.

Thời đó, vai trò của DNA vẫn chưa được công nhận, vì cho rằng trong các thí nghiệm vẫn còn một ít protein.

Các thí nghiệm về sau cho thấy có thể thực hiện biến nạp không chỉ với tính trạng gây bệnh, mà còn nhiều tính trạng khác như tính đề kháng thuốc hay tổng hợp các chất khác nhau. Biến nạp có thể thực hiện ở nhiều loại vi khuẩn khác nhau. Ngày nay có thể thực hiện được biến nạp ở sinh vật *Eucaryotae* như nấm men, tế bào thực vật, tế bào chuột và cả tế bào người, thậm chí có thể thực hiện biến nạp giữa các loài khác nhau rất xa trong hệ thống phân loại. Do đó, biến nạp được coi như **phương tiện chung** (universel) để **chuyển gen giữa các sinh vật** khác nhau.

3. Sự xâm nhập của DNA virus vào vi khuẩn

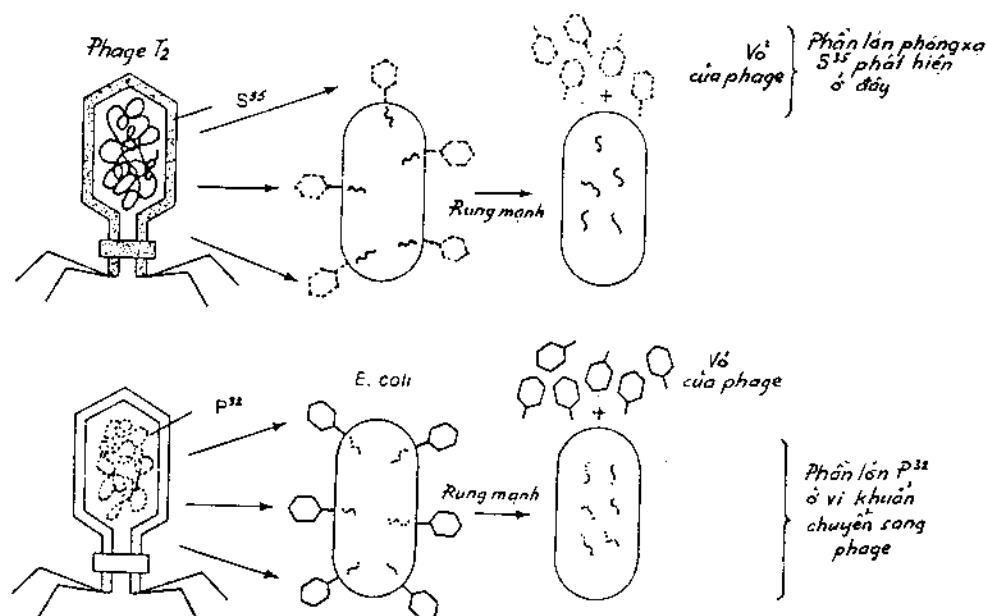


Hình 5.2. Bacteriophage T₂

Năm 1952, A.Hershey và M.Chase đã tiến hành thí nghiệm với **bacteriophage T₂** (virus của vi khuẩn được gọi là bacteriophage – thực khuẩn thể hay gọi tắt là **phage**) xâm nhập vi khuẩn *Escherichia coli* (*E.coli*).

Phage T₂ có cấu tạo đơn giản gồm vỏ protein bên ngoài và ruột DNA bên trong (hình 5.2). Khi cho phage T₂ vào vi khuẩn, chúng gắn lên bề mặt bên ngoài, một phần

chất nào đó xâm nhập vào vi khuẩn và sau 20 phút tế bào vi khuẩn bị tan ra phóng thích nhiều phage mới.



Hình 5.3. Vật chất di truyền của phage là DNA

Thí nghiệm của A.Hershey và M.Chase nhằm xác định xem phage nhiễm vi khuẩn đã bơm chất nào vào tế bào vi khuẩn : chỉ DNA, chỉ protein hay cả hai. Vì DNA chứa nhiều phosphor nhưng không có sulfur (lưu huỳnh) còn protein chứa sulfur nhưng không chứa phosphor, nên có thể phân biệt giữa DNA và protein nhờ các đồng vị phóng xạ P và S. Phage được nuôi trên vi khuẩn đã mọc trên môi trường chứa các đồng vị phóng xạ P³² và đồng vị phóng xạ S³⁵. S³⁵ xâm nhập vào protein và P³² vào DNA của phage. Phage nhiễm phóng xạ này được tách ra, đem nhiễm vào các vi khuẩn không phóng xạ (hình 5.3). Cho phage nhiễm trong một khoảng thời gian đủ để bám vào vách tế bào vi khuẩn và bơm chất nào đó vào trong tế bào, rồi dung dịch được lắc mạnh và li tâm để tách rời tế bào vi khuẩn khỏi phần phage bám bên ngoài vách tế bào. Phân tích phần nằm ngoài vi khuẩn cho thấy nó chứa nhiều S³⁵ (80%) nhưng rất ít P³², chứng tỏ phần lớn protein vỏ của phage nằm ngoài tế bào vi khuẩn. Phân tích phần trong tế bào vi khuẩn thấy chúng chứa nhiều P³² (70%) nhưng rất ít S³⁵, chứng tỏ DNA được bơm vào trong tế bào. Thí nghiệm này chứng minh trực tiếp rằng DNA của phage T₂ đã xâm nhập vào tế bào vi khuẩn và sinh sản tạo ra thế hệ phage mới mang tính di truyền có khả năng tiếp tục nhiễm các vi khuẩn khác.

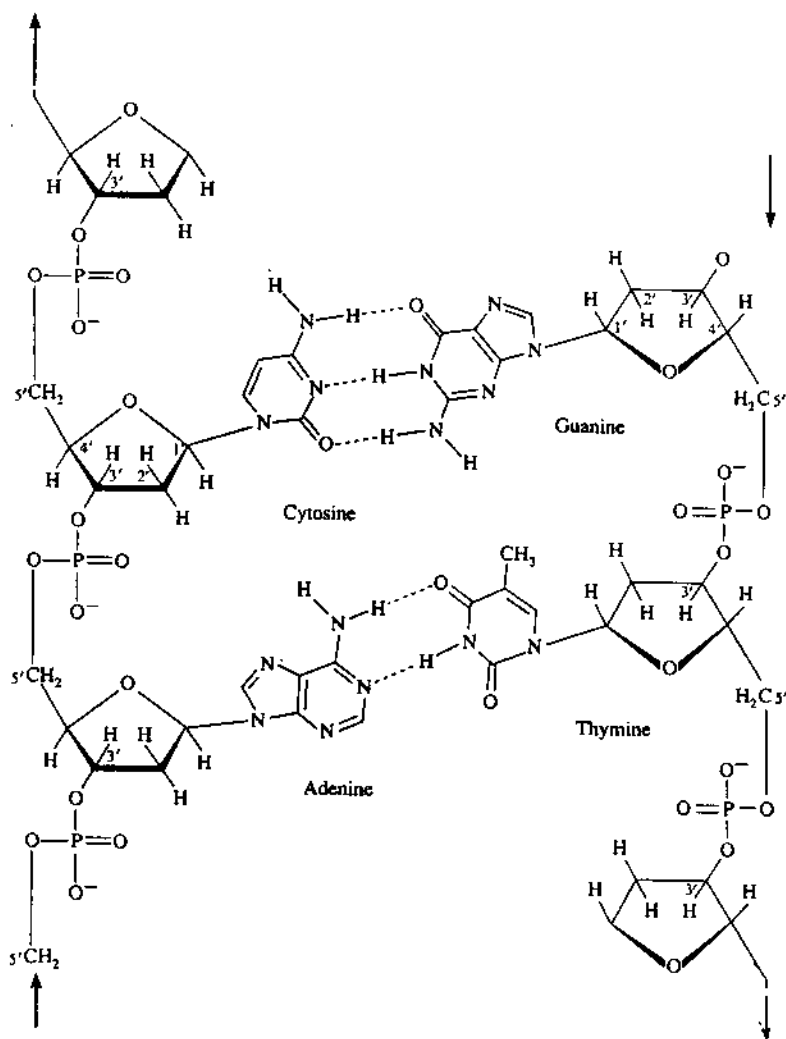
Kết luận : Vật chất di truyền của phage T₂ là DNA.

Sau thí nghiệm này, vào năm 1952 nhiều cuộc tranh cãi sôi nổi đã diễn ra về vai trò của DNA là vật chất di truyền. Các số liệu thu được tiếp theo đã khẳng định điều đó.

II. THÀNH PHẦN VÀ CẤU TRÚC HÓA HỌC CỦA DNA

1. Thành phần hóa học

Desoxyribonucleic acid là một chất trùng hợp (polimer) - một *polynucleotide*. Nó được tạo nên do sự nối liền nhiều đơn phân (monomer)



Hình 5.4. Các base căn bản của nucleic acid bất cặp bổ sung

A bắt cặp với T bằng 2 liên kết hydro và G - C bằng 3 liên kết hydro.

Mỗi mạch có 1 đầu 5' P, đầu kia 3'OH. Hai mạch đối song song.

cùng kiểu là các **nucleotide**. Kết quả phân tích hóa học của DNA ở những sinh vật khác nhau cho thấy sự giống nhau đặc biệt giữa các đơn chất hợp thành DNA. Thành phần hóa học của DNA gồm có gốc phosphoric acid, đường 5-desoxyribose và các nitrogenous base. Nitrogenous base ở DNA gồm hai purine là adenine (A) và guanine (G) và hai pyrimidine là cytosine (C) và thymine (T) (hình 5.4) ; ở RNA còn có uracil (U) thay cho thymine (T). Đường pentose (5C) desoxyribose gắn với nitrogenous base ở vị trí C_1 sẽ tạo nên **nucleoside**. Nucleoside được gắn thêm nhóm phosphate vào C_5 của đường pentose thành **nucleotide**. Tính đặc hiệu của nucleotide do base, nên khi nói đến nucleic acid, base thường được dùng thay cho nucleotide. Cách gọi thường dùng là **cặp base**, kí hiệu **bp** (base pair) hay **kb** (kilobase - 1000 cặp base).

Vào những năm 1930 Carpersson phát hiện phân tử DNA rất lớn, lớn hơn cả phân tử protein. Hiện nay những phân tử DNA nhỏ nhất cũng chứa vài nghìn nucleotide, còn những phân tử lớn nhất tách được dài hơn cả triệu cặp nucleotide.

Tất cả sinh vật đều có **chung một cấu trúc DNA**. Tính đặc trưng của DNA của một loài chỉ biểu hiện ở trình tự **sắp xếp các nucleotide** dọc theo chiều dài và số lượng của chúng.

2. Mô hình xoắn kép DNA của Watson - Crick

Việc xác định cấu trúc không gian của một phân tử phức tạp và quan trọng như DNA đã hấp dẫn nhiều nhà khoa học. Vào năm 1950, hầu như chưa ai biết gì về sự sắp xếp không gian của các nguyên tử trong phân tử DNA và dĩ nhiên cũng chưa hiểu bằng cách nào nó chứa thông tin cho quá trình sao chép và kiểm soát các hoạt động của tế bào. Vào thời gian này, một số nhà nghiên cứu bắt đầu sử dụng kĩ thuật phân tích dùng **tán xạ tia X** (X-ray diffraction analysis) đối với DNA. Nổi bật nhất trong số đó là Rosalind Franklin và Maurice Wilkins ở London, họ đã thu nhận những kết quả rõ nhất. Lúc này Francis Crick cũng vừa nêu ra phương pháp toán học giải thích kết quả của tán xạ tia X đối với các cấu trúc xoắn của protein và dùng nó giải thích các hình ảnh do Franklin và Wilkins thu được.

Người ta nhận thấy không những DNA từ các nguồn khác nhau cho các đặc tính phân tích tán xạ giống nhau, mà những đặc tính tán xạ đó còn không phụ thuộc vào các sợi DNA được tách riêng ra hoặc ở trạng thái tự nhiên (intact) như khi nằm trong đầu tinh trùng hay trong phage. Những tính chất căn bản thu được như sau :

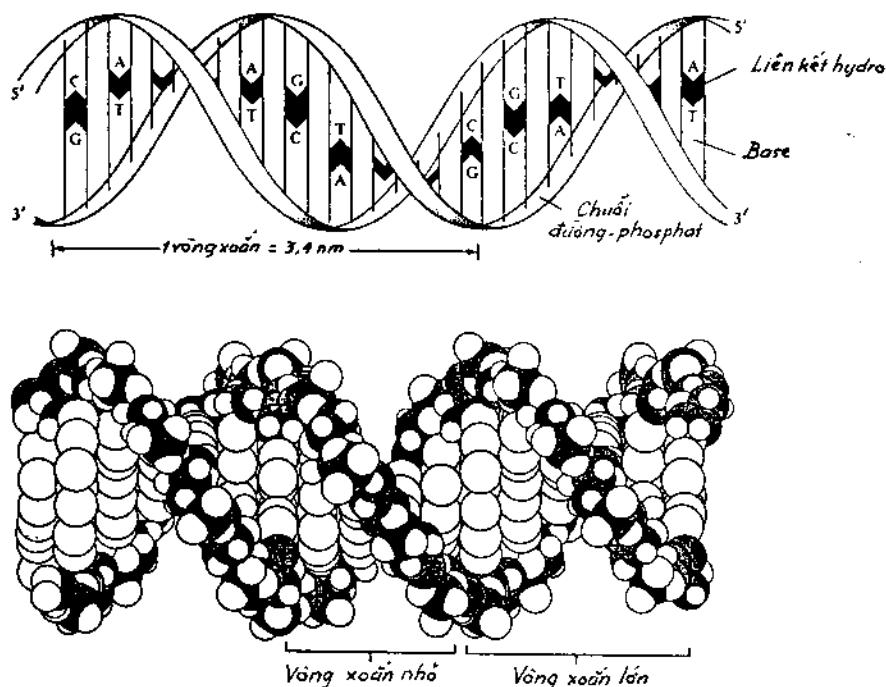
- Các base purine và pyrimidine có cấu trúc phẳng, mặt phẳng của chúng xếp vuông góc với trục dài của mạch polynucleotide và chúng chống cái

này lên cái kia như một cột gồm những viên gạch chồng lên nhau, khoảng cách trung tâm của hai mặt phẳng kề nhau là $3,4 \text{ \AA}$.

– Mạch polynucleotide không duỗi thẳng mà xoắn thành lò xo quanh trục giữa, mỗi bước xoắn của lò xo dài $34 \text{ \AA}$.

– Số liệu tính toán cũng cho thấy DNA có nhiều hơn một mạch polynucleotide.

Vào năm 1951, F.Crick mới 35 tuổi, bắt đầu quan tâm đến DNA. Thực ra từ năm 1946, sau khi đọc sách "*Sự sống là gì ?*" (What is a life ?) theo quan điểm của nhà vật lý học lý thuyết nổi tiếng E.Schrödinger (được giải Nobel), Crick đã chuyển sang nghiên cứu sinh học. Thời gian này, James Watson khoảng 25 tuổi, sau khi bảo vệ tiến sĩ được đến thực tập ở Cambridge. Sự hợp tác của Watson và Crick đã dẫn đến *một trong những phát minh lớn nhất của thế kỷ 20*.



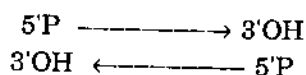
Hình 5.5. Chuỗi xoắn kép DNA Watson - Crick

Vào năm 1953, J.Watson và F.Crick đã thực hiện bước quyết định cuối cùng bằng sự tổng hợp tài tình các số liệu phân tích hóa học và tán xạ tia X để xây dựng đúng đắn mô hình cấu trúc của phân tử DNA, còn gọi là mô

hình cấu trúc DNA của Watson - Crick hay chuỗi xoắn kép. Mô hình gồm hai mạch polynucleotide **bất cặp bổ sung** (complementary) tạo thành lò xo xoắn kép (hình 5.5). Hai mạch được gắn với nhau bằng các liên kết hydro giữa các base đối diện với nhau theo nguyên tắc bổ sung trong từng cặp : đối diện **adenine** là **thymine**, đối diện **guanine** là **cytosine** (xem hình 5.4). Watson và Crick đã đi đến kết luận rằng A bất cặp với T và G với C hoàn toàn dựa trên tính toán lí thuyết và điều này bất ngờ giải thích phát hiện của E.Chargaff (Mĩ) vào năm 1951, rằng tất cả các loại DNA đều chứa cùng một số lượng A và T đúng như nhau ; G và C cũng có cùng một số lượng đúng như nhau.

Tóm lại, theo mô hình của Watson - Crick, phân tử DNA là một **chuỗi xoắn kép** mà hai mạch gồm khung đường xen kẽ với các nhóm phosphate, được gắn với nhau nhờ các liên kết hydro giữa adenine với thymine ở mạch đối diện và giữa guanine với cytosine ở mạch đối diện. Từ năm 1953 đến nay, mô hình đó là trung tâm của các nghiên cứu di truyền học và sinh học phân tử. Watson, Crick và Wilkins đã nhận được giải thưởng Nobel vào năm 1962.

Một đặc điểm của mô hình là **sự đối song song** (anti parallel). Để các base tương ứng đối diện với nhau, hai mạch cần phải bố trí đầu sợi này đối diện với đuôi sợi kia. Mỗi mạch đơn có một đầu mang nhóm P tự do gắn vào C₅ của đường desoxyribose nên gọi là đầu 5'P, còn đầu kia có nhóm OH ở vị trí C₃ nên gọi là đầu 3'OH (xem hình 5.4). Hai mạch có đầu ngược nhau như sau :



Như vậy đầu 5'P của mạch này đối diện với đầu 3'OH của mạch bổ sung. Trong các phần sau chúng ta sẽ thấy tầm quan trọng của sự định hướng 5'P → 3'OH trên mỗi mạch.

3. Các loại DNA

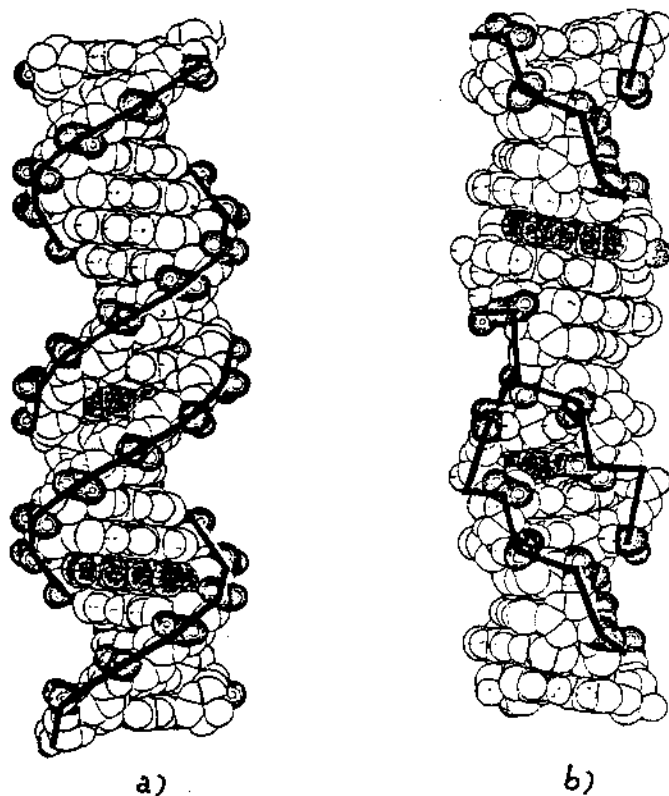
Mô hình Watson - Crick ra đời từ năm 1953 và trong vòng 25 năm tiếp theo nó được công nhận và sử dụng rộng rãi. Mãi vào những năm 70, nhờ dùng các phương pháp phân tích chính xác, các số liệu được chỉnh lí lại tốt hơn và các quan điểm mới được bổ sung. Nhiều dạng DNA được phát hiện, dạng thường gặp là **dạng B** theo **mô hình của Watson - Crick**. Trước đây, phân tử DNA được hiểu có cấu trúc cứng nhắc như các số liệu của mô hình Watson - Crick. Ngày nay, theo quan niệm mới, mỗi dạng DNA là một **dòng họ** các phân tử có kích thước dao động quanh các trị số trung bình. Hai chỉ số được dùng để đánh giá là :

- h - chiều cao giữa hai nucleotide kề nhau.
- n - số cặp nucleotide trong một vòng xoắn.

BẢNG 5.1. DNA có thể tồn tại trong nhiều dạng cấu trúc

Kiểu xoắn ốc	Số cặp base của 1 vòng xoắn (n)	Góc xoắn so với mặt phẳng của base (độ)	h - khoảng cách đứng giữa 2 base kế nhau (Å)	Đường kính của chuỗi xoắn kép (Å)
A	11	+ 32,7°	2,56	23
B	10	+ 36,0°	3,38	19
C	9 ¹ / ₃	+ 38,6°	3,32	19
.....				
Z	12	- 30,0°	3,71	18

Dạng B (Watson - Crick) thường tồn tại trong điều kiện sinh lý bình thường, còn các dạng khác ở những điều kiện độ ẩm và ion khác nhau. Đặc biệt **dạng Z** có chiều *xoắn ngược* về phía bên *trái* theo hình zigzag nên gọi là Z (hình 5.6).



Hình 5.6. DNA dạng B (Watson - Crick) và dạng Z xoắn trái

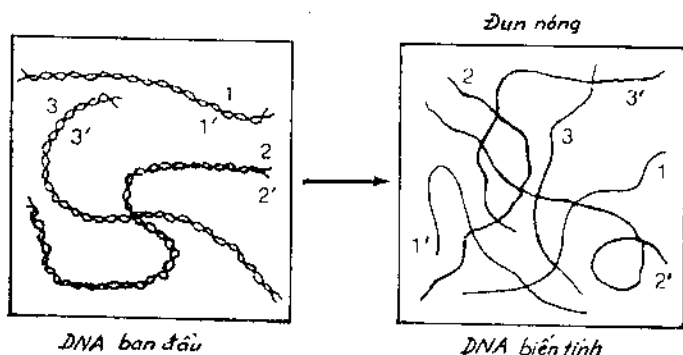
a) Dạng B ; b) Dạng Z

Việc phát hiện các dạng DNA khác nhau cho thấy DNA trong tế bào sống có thể **không đơn điệu** với một cấu trúc duy nhất, mà tùy trạng thái sinh lí có thể ở dạng này hay khác.

4. Biến tính DNA và lai nucleic acid

a) Biến tính (denaturation) và hồi tính (renaturation)

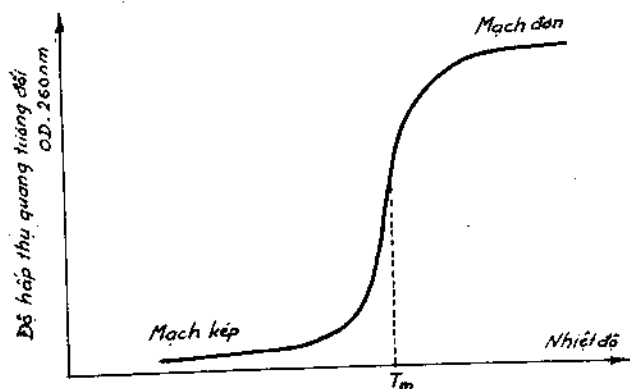
Hai mạch DNA gắn với nhau nhờ các liên kết hydro. Nếu tác động nào đó làm đứt các liên kết này hai mạch sẽ tách rời nhau. Khi đun nóng phân tử DNA vượt quá nhiệt độ sinh lí (thường ở khoảng $80-95^{\circ}\text{C}$) các liên kết hydro giữa hai mạch bị đứt và chúng tách rời nhau. Đó là hiện tượng **biến tính** của DNA (hình 5.7).



Hình 5.7. Sự biến tính của DNA

DNA mạch kép hay mạch đơn được đo bằng mật độ quang (OD - Optical Density). Phương pháp dựa vào nguyên tắc của các base purine và pyrimidine của DNA hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260 nm. Giá trị mật độ quang tăng lên khi phân tử mạch đôi chuyển thành mạch đơn. Điều này xảy ra do hiện tượng gọi là "**hiệu ứng siêu sắc**" (hyperchromic effect). Trong phân tử DNA **mạch đôi**, các base nằm chồng lên nhau trên những mặt phẳng song song nên che lấp lẫn nhau một phần, khiến chúng hấp thụ ánh sáng ít hơn (tính chung) so với ở DNA **mạch đơn**.

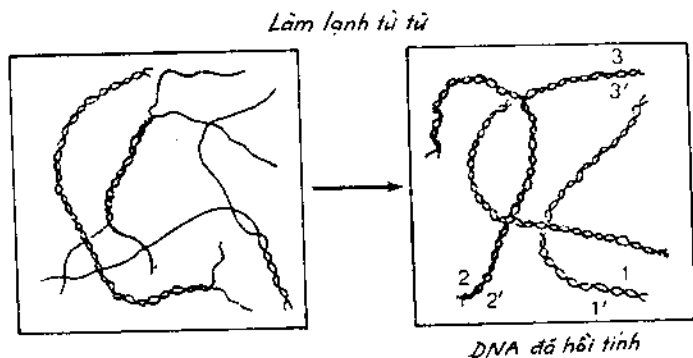
Nhiệt độ làm hai mạch DNA tách rời nhau ra được gọi là **điểm chảy** (melting point) của DNA. Điểm chảy được tính ở giữa đường cong OD hình sigma (hình 5.8).



Hình 5.8. Đường cong T_m
(sách Genes III)

Nhiệt độ này đặc trưng cho mỗi loại DNA, phụ thuộc vào số lượng các liên kết hydro. DNA có tỉ lệ G-C cao sẽ có điểm chảy cao hơn. DNA có 60% là G-C thì điểm chảy khoảng 95°C . Đoạn DNA càng dài bao nhiêu thì số lượng liên kết hydro nối hai mạch càng lớn bấy nhiêu và do đó “điểm chảy” cũng càng cao.

Chất *formamide* có khả năng hạ thấp điểm chảy rất nhiều, được dùng trong lai phân tử để giảm nhiệt độ lai.



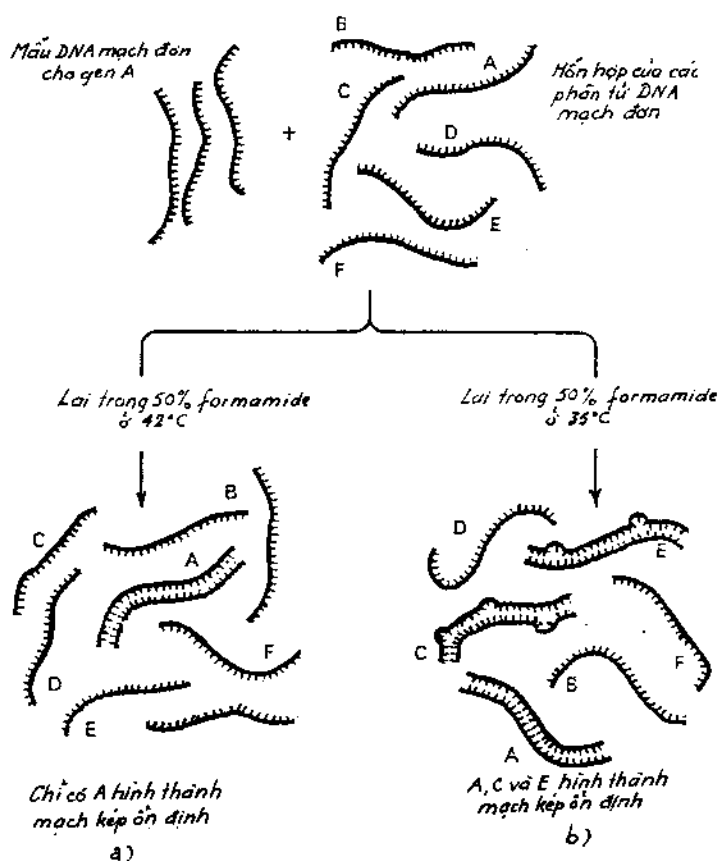
Hình 5.9. Sự hồi tính của DNA khi hạ nhiệt độ từ từ

Sự biến tính của DNA có thể thuận nghịch. Nếu DNA đã biến tính được hạ nhiệt độ từ từ trở lại bình thường, chúng có thể gắn lại với nhau thành mạch kép. Hiện tượng này gọi là *hồi tính* (renaturation) (hình 5.9).

b) Lai nucleic acid

Sử dụng đặc tính biến tính rồi hồi tính, có thể tiến hành lai DNA với DNA, DNA với RNA và RNA với RNA.

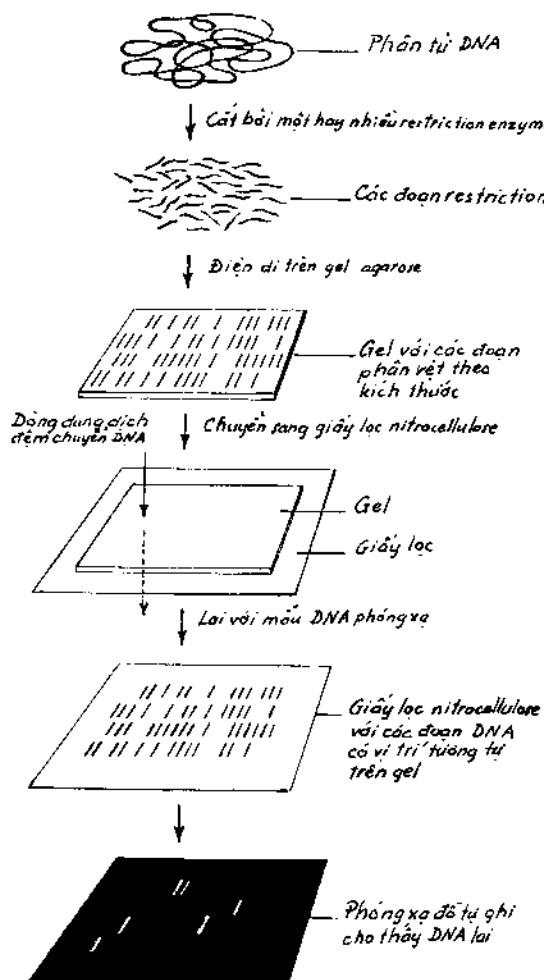
Nguyên tắc lai như sau. Lấy DNA loại A làm biến tính để thành mạch đơn, trộn lẫn với DNA loại B cũng bị biến tính chỉ có mạch đơn. Dung dịch được hạ nhiệt độ từ từ để xảy ra hồi tính. Đây là **kiểu lai lỏng** hay lai trong dung dịch. Trong dung dịch này sẽ xảy ra quá trình hồi tính, sợi A kết với A, sợi B kết với B, nhưng đồng thời có sợi A kết với B tạo **phân tử lai**. Muốn lai được với nhau, nhất thiết giữa hai loại DNA phải có những **đoạn có trình tự bổ sung** cho nhau, tức **tương đồng**. Có thể dùng đồng vị phóng xạ đánh dấu để phát hiện đoạn lai.



Hình 5.10. Lai nghiêm ngặt (bên trái) và lai ít nghiêm ngặt (phải).

Các mạch đơn của DNA A được trộn với hỗn hợp DNA mạch đơn A, B, C, D, E, F. Trong lai nghiêm ngặt, chỉ có A lai với A. Khi lai ít nghiêm ngặt, A, C, E tạo mạch xoắn kép lai ổn định.

Sự hoàn thiện kĩ thuật dẫn đến phương pháp *lai nghiêm ngặt* (stringent hybridization) và *lai ít nghiêm ngặt* (reduced stringent hybridization) (hình 5.10). Trong lai nghiêm ngặt (sự kết hợp dung môi và nhiệt độ làm cho mạch kép ổn định), hai mạch sẽ bắt cặp tạo chuỗi xoắn kép “lai” chỉ khi có trình tự nucleotide hoàn toàn bổ sung với nhau. Tính đặc hiệu cực lớn của phản ứng lai này cho phép bất kì trình tự mạch đơn nào tìm gặp mạch cặp bổ sung với nó, thậm chí trong tế bào hay dịch chiết tế bào có chứa hàng triệu các trình tự DNA hay RNA khác nhau. Khi lai ít nghiêm ngặt, các điều kiện được tạo ra để các trình tự gần giống nhau do có quan hệ họ hàng gần nhau có thể bắt cặp với nhau.



Hình 5.11. Các phương pháp Southern blot và Northern blot

Phương pháp này dựa trên nguyên tắc : hỗn hợp các đoạn DNA hoặc RNA được cắt ngắn, cho điện di trên gen để trải rời ra. Sau đó dùng lực hút mạnh của chống giấy thấm kéo in lên màng và lai với mẫu dò trên màng.

Ngoài ra, hiện nay các phương pháp **lai trên pha rắn** như trên màng nitrocellulose (hiện nay không còn thông dụng), màng lai bằng nylon. Ba phương pháp lai trên pha rắn được sử dụng rộng rãi nhất :

- Phương pháp thấm Southern (Southern blot), do ông E.Southern tìm ra, dùng cho DNA (hình 5.11).

- Thấm Northern (Northern blot) dùng cho RNA.

- Phương pháp dot (điểm) và slot (khe) blot dùng cho RNA và DNA.

Lai tại chỗ (*In situ* hybridisation) là một kiểu lai phân tử trong đó, trình tự nucleic acid cần tìm (trình tự đích) nằm ngay trong tế bào hay trong mô. Lai tại chỗ cho phép nghiên cứu nucleic acid ngay trên nhiễm sắc thể, khuẩn lạc hay mô tế bào mà không cần tách chiết chúng. Kiểu lai này có nhiều ứng dụng của rất đa dạng.

Dùng phương pháp lai DNA có thể xác định mối **quan hệ họ hàng** giữa các loài. Ví dụ : DNA người với DNA của chuột chỉ lai được 25%. Điều này chứng tỏ thứ tự nucleotide chỉ giống nhau ở một số gen người và chuột, còn ở các gen còn lại khác nhau.

Có thể tiến hành lai mRNA với DNA để xác định vị trí gen tạo ra mRNA tương ứng trên nhiễm sắc thể.

Phương pháp lai nucleic acid giúp hiểu chi tiết hơn về bộ gen, nó là cơ sở của phương pháp **chẩn đoán môi** dùng nucleic acid đang được sử dụng rộng rãi hiện nay và thế kỉ tới.

III. DNA TRONG TẾ BÀO

1. DNA trong sinh giới

Đến nay, các nghiên cứu cho thấy tất cả các sinh vật có cấu tạo tế bào và ti thể, lục lạp đều có bộ gen là DNA mạch kép. Các virus có bộ gen đa dạng gồm RNA và DNA mạch đơn hay mạch kép. Chiều dài bộ gen đơn bội căn cứ theo số cặp base của các nhóm sinh vật chủ yếu như sau :

Sinh vật	Chiều dài bộ gen đơn bội (số cặp base)
Virus	10^3 đến 10^5
E.coli	$4.5.10^6$
Nấm men	5.10^7
Caenorabditis elegans	8.10^7

Sinh vật	Chiều dài bộ gen đơn bội (số cặp base)
Drosophila	$1,5 \cdot 10^8$
Động vật có xương sống	10^8 đến 10^{10}
Người	$3 \cdot 10^9$
Thực vật	10^{10} đến 10^{11}

Số liệu cho thấy, số lượng base không phản ánh mức độ tiến hóa. Giữa các sinh vật *Prokaryotae* và *Eukaryotae* có sự khác nhau đáng kể về thành phần cấu tạo và tổ chức của DNA trong tế bào. Nhưng tất cả sinh vật đều có chung cấu trúc DNA xoắn kép.

Theo A. Levine (Princeton University), số lượng gen của một số sinh vật ước tính như sau :

Sinh vật	Số lượng gen
Viroid	< 1 gen (~ 250 N)
Virus	3 - 350
E.coli	3.000 - 5.000
Drosophila	20.000 đến 25.000
Người	70.000 đến 120.000
Thực vật Petunia	50.000 đến 150.000

2. Bộ gen của *Prokaryotae*

Có sự khác nhau đáng kể giữa bộ gen của *Prokaryotae* và *Eukaryotae*. Tuy nhiên, giữa chúng có điểm chung là chiều dài DNA của bộ gen dài hơn gấp **1.000 lần** chiều dài của tế bào.

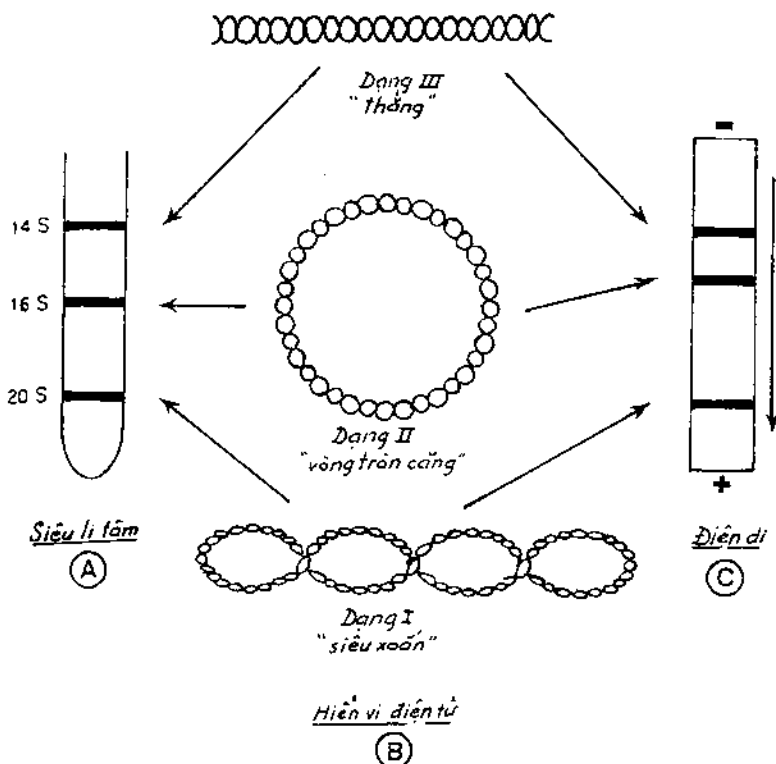
Một phân tử DNA vòng tròn của *E.coli* nếu kéo thẳng sẽ dài khoảng 1,35 mm gấp 1.000 lần chiều dài tế bào. DNA tế bào đơn bội của người nếu kéo thẳng và nối đuôi nhau cũng dài khoảng 1m, gấp 1.000 lần chiều dài tế bào. Do đó trong tế bào, DNA phải xoắn chặt và gói gọn rất tinh vi mà các gen vẫn biểu hiện khi có nhu cầu.

a) Siêu xoắn là trạng thái tự nhiên của DNA

Bộ gen (genome) của vi khuẩn *E.coli* và đa số các sinh vật tiến nhân là **một phân tử DNA** có dạng **vòng tròn** và không gắn với protein để tạo phức hợp như nhiễm sắc thể của *Eukaryotae*. Khái niệm **nhiễm sắc thể**, hiện nay được dùng cho cả vi khuẩn, được hiểu là **sợi DNA**.

DNA có thể ở 3 dạng cấu trúc tô-pô (topological structure) :

- Dạng thứ nhất : *siêu xoắn*, khi mạch kép vận xoắn hình số 8. Đây là *dạng tự nhiên* (native) trong tế bào vi khuẩn (hình 5.12).
- Dạng thứ hai : *vòng tròn*, khi sợi DNA căng tròn. Dạng này có được do DNA siêu xoắn bị cắt đứt 1 trong 2 mạch kép.
- Dạng thứ ba : *thẳng*, khi DNA bị đứt cả 2 mạch.



Hình 5.12. Các dạng thẳng, vòng tròn và siêu xoắn của DNA.

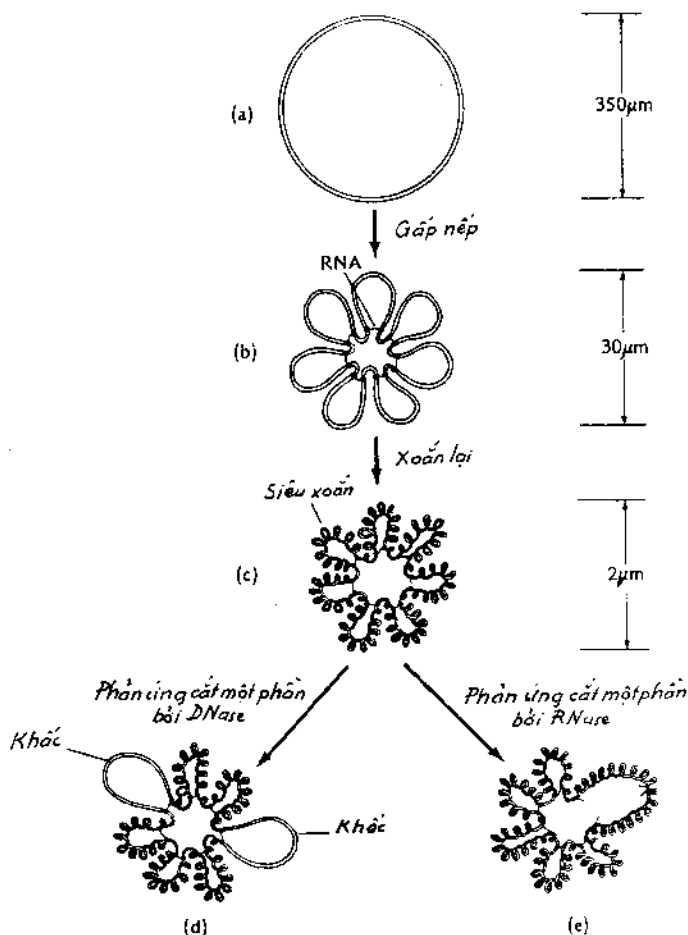
Trên hình có nêu 3 phương pháp nghiên cứu : siêu li tâm (A), hiển vi điện tử (B) và điện di trên gen agarose (c).

Thường trong tế bào *Prokaryotae*, DNA ở dạng siêu xoắn.

b) Mô hình bộ gen của *E.coli*

Một số mô hình được nêu ra để mô tả bộ gen của *E.coli* trong tế bào. Sau đây là 1 ví dụ (hình 5.13).

Mô hình cho thấy sự rút ngắn đáng kể (từ đường kính 350 micrometer còn 2 micrometer) chiều dài phân tử, sự cuộn lại được thực hiện nhờ các *RNA nối*. Khi các RNA nối bị cắt, mạch DNA bung dài ra thuận tiện cho sao chép DNA. Nếu DNase cắt 1 mạch, mạch DNA tháo xoắn căng ra cho tổng hợp protein.



Hình 5.13. Mô hình cấu trúc nhiễm sắc thể (bộ gen) của *E.coli*.

(Theo Pettijohn và Hecht, 1974).

Các RNA nối (linker) nối gấp các đoạn DNA, sự siêu xoắn tiếp tục làm ngắn thêm.

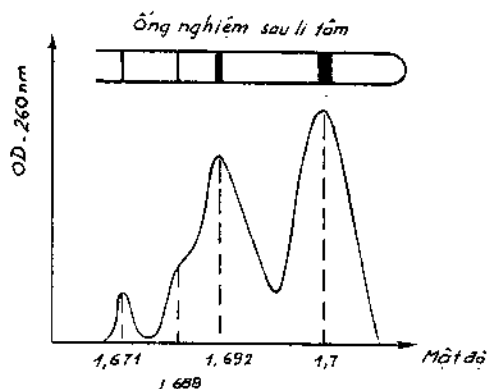
Sự siêu xoắn có thể thuận nghịch như giãn ra do DNase hay RNase

2. Sự không đồng nhất của DNA *Eukaryotae*

a) Các phân đoạn DNA

Khi tách DNA của *Eukaryotae* bằng siêu li tâm trên thang nồng độ cesium chloride, có 3 vệt (band) được ghi nhận (hình 5.14). Một vệt lớn có

nồng độ đậm, một loạt vệt khác có nồng độ thấp, được gọi *DNA vệ tinh* (satellite DNA).

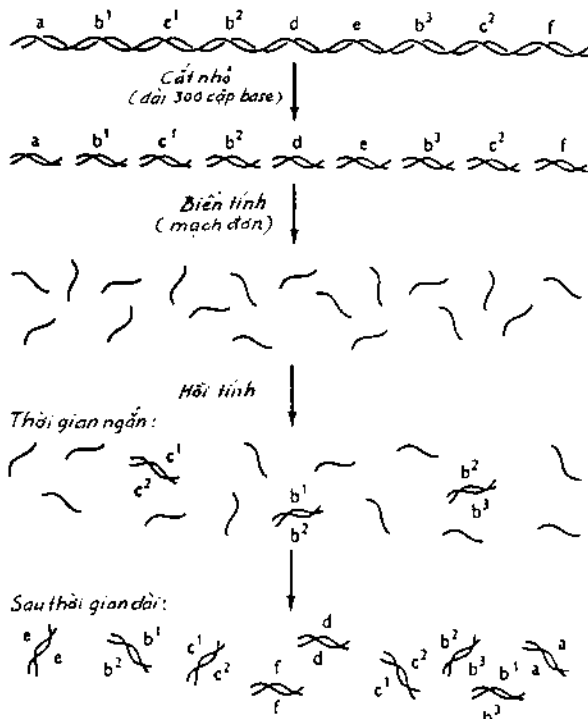


Hình 5.14. Sự xuất hiện của DNA vệ tinh khi siêu li tâm

b) Các trình tự lặp lại và đơn độc

Sự không đồng nhất của DNA *Eukaryotae* thể hiện rõ hơn khi thực hiện **phản ứng tái hợp** (reassociation) DNA (hình 5.15). DNA được cắt nhỏ và cho biến tính rồi sau đó cho hồi tính. Khi hồi tính, các đoạn có trình tự bổ sung dễ tái hợp với nhau, nhờ vậy nhận biết các trình tự lặp lại.

Phân tử DNA:

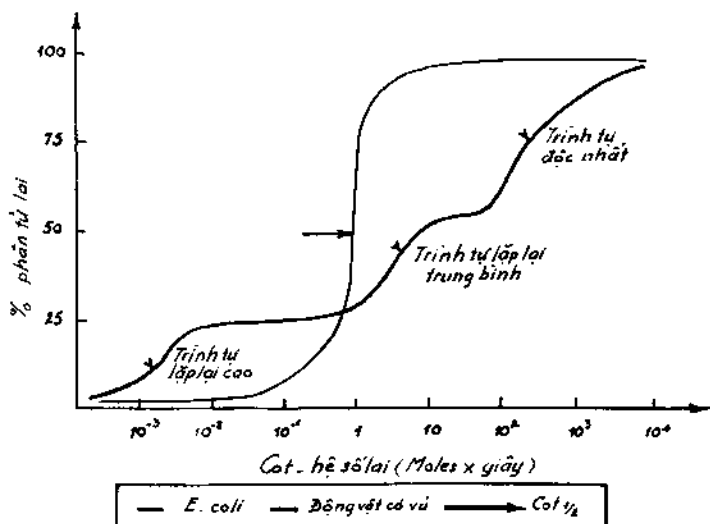


Hình 5.15. Sơ đồ mô tả phản ứng tái hợp

Các đoạn ngắn giống nhau, tức các trình tự lặp lại với tần số cao sẽ tái hợp rất nhanh

Động học tái hợp thành sợi đôi của DNA *Eukaryotae* khác với *Prokaryotae* (hình 5.16). Đường cong tái hồi của *Prokaryotae* có dạng hình sigma điển hình, chứng tỏ sự đồng nhất của các trình tự trong tái hợp. Ở *Eukaryotae*, đường cong có nhiều đỉnh, cho thấy có 3 loại trình tự :

- DNA lặp lại cao (tái hợp rất nhanh).
- DNA lặp lại trung bình (tái hợp nhanh vừa).
- DNA đơn độc (tái hợp rất chậm).



Hình 5.16. Đường cong tái hợp của động vật có vú và *E.coli*.
Các mũi tên nhỏ trên đường cong tái hợp của DNA động vật có vú
cho thấy 3 loại trình tự khác nhau.

Các loại trình tự này có ý nghĩa khác nhau đối với bộ gen (chi tiết ở chương XVIII).

c) Trình tự *CEN*

Các trình tự lặp lại cao *CEN* là của các tâm động (Centromere). Ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae* chúng gồm :

- Trình tự đầu có 9 cặp base 5' TCACATGAT.
- Trình tự giữa có 80 - 90 cặp base, rất giàu A và T (> 90%).
- Trình tự 11 cặp base ở đầu 3' TGATTTCCGAA.

Các trình tự này ở DNA người phức tạp hơn.

d) Các trình tự *TEL*

Các trình tự *TEL* thuộc các telomere (đầu mút của nhiễm sắc thể) với nhiều vai trò khác nhau : bảo vệ đầu mút nhiễm sắc thể khỏi bị cắt, giữ chiều dài của nhiễm sắc thể khi sao chép, gắn với màng nhân và kim hãm sự biểu hiện của các gen ở đầu mút.

Các trình tự *TEL* có tính bảo tồn cao trong tiến hóa. Chúng có số lần lặp lại cao, giàu C và A : CC(C)ACACA(CA) ở nấm men, CCCTAA ở người. Đầu mút của nhiễm sắc thể giàu G gấp lại thành hình kẹp tóc có cấu trúc 4 mạch. Cấu trúc này bảo vệ đầu mút nhiễm sắc thể khỏi bị cắt bởi nuclease, đồng thời khi sao chép giữ đầu mút khỏi bị mất các trình tự mã hóa.

3. Nhiễm sắc thể của *Eukaryotae*

Đa phần *DNA* của *Eukaryotae* được tổ chức thành nhiều nhiễm sắc thể trong nhân tế bào. Các nghiên cứu cho thấy, mỗi nhiễm sắc thể chứa 1 *phân tử DNA thẳng mạch kép*. Các nhiễm sắc thể có *số lượng và hình dạng đặc trưng* cho tế bào của mỗi loài sinh vật.

Các nhiễm sắc thể của *Eukaryotae* có tổ chức phức tạp gồm *DNA* và *nhiều loại protein* gắn vào. Trong số đó, *histone* là protein giữ vai trò cốt lõi trong việc cuộn lại và điều hòa hoạt tính của *DNA*. Các *histone* là những *protein nhỏ* chứa nhiều amino acid mang *điện tích dương* (lysine và arginine) nên gắn chặt với *DNA* điện tích âm.

Sự hình thành nhiễm thể kì giữa từ chuỗi xoắn kép *DNA* qua hệ thống các bậc cấu trúc sau :

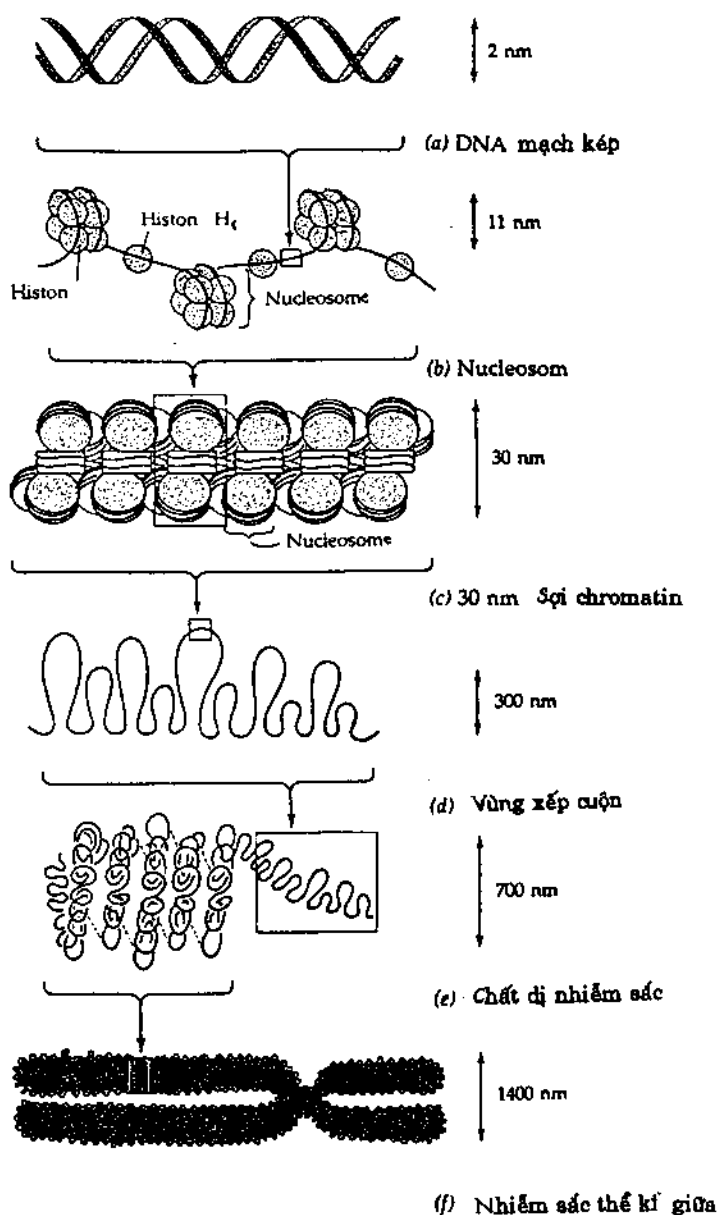
- *Nucleosome* là đơn vị cấu trúc của nhiễm sắc thể được tạo nên do sợi *DNA* dài quấn quanh các protein *histone*, hình thành sợi 11nm. Đơn vị này là phức hợp gồm 146 cặp base của *DNA* quấn quanh 8 phân tử *histone* (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 và 2 H4). Các *nucleosome* kề nhau được nối qua một phân tử *histone trung gian* (H1) (hình 5.17b).

- *Sợi chromatin* dày 30nm : các *nucleosome* xếp khít nhau tạo thành phức hợp *nucleoprotein*.

- *Vùng xếp cuộn* dày 300nm do sợi *chromatin* sau nhiều lần xoắn uốn khúc tạo nên (hình 5.17d).

- Chất dị nhiễm sắc 700nm (hình 5.17e).

- *Nhiễm sắc thể* kì giữa 1400nm (hình 5.17f).



Hình 5.17. Phức hợp nucleoprotein cuộn lại thành nhiễm sắc thể

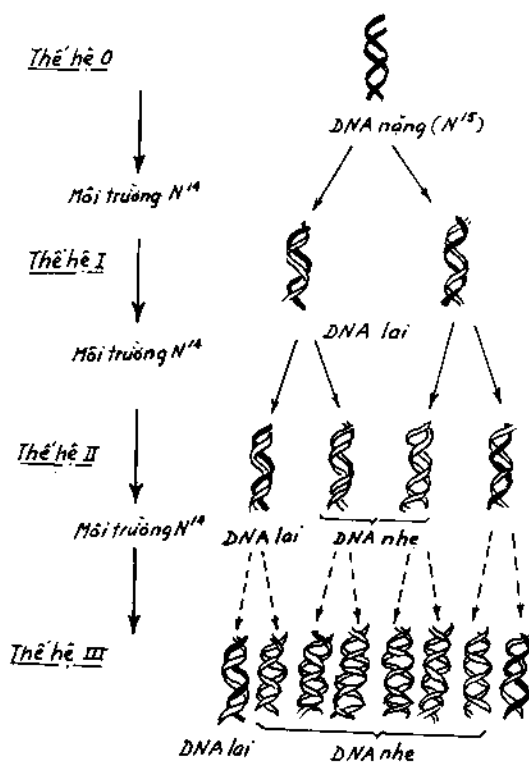
IV. SAO CHÉP DNA

Một trong những tính chất căn bản của chất di truyền DNA là khả năng *tự sao chép* (replication) chính xác hay *tự nhân đôi* (self duplication).

Ưu điểm nổi bật của mô hình Watson - Crick là cho phép dự đoán ngay phân tử DNA sao chép như thế nào. Ngay sau khi mô hình cấu trúc DNA được nêu ra, nhiều thí nghiệm được tiến hành để xác nhận các dự đoán.

1. Sao chép theo khuôn

Ngay khi nêu ra mô hình, Watson và Crick đã cho rằng nếu **hai mạch** của phân tử DNA **được tách ra** do các liên kết hydro giữa các cặp base bị đứt, **mỗi mạch sẽ làm khuôn** cần thiết cho việc tổng hợp mạch cặp mới tương tự với mạch cặp trước đó. Vì **adenine** phải bắt cặp với **thymine**, và **guanine** phải luôn luôn bắt cặp với **cytosine** nên trình tự các nucleotide trên một mạch sẽ xác định chính xác trình tự đặc hiệu các nucleotide trên mạch bổ sung với nó. Nói cách khác, nếu tế bào tách rời hai mạch của phân tử DNA ra, nó có thể xếp các nucleotide của mạch mới thành hàng theo **trình tự bổ sung** với các nucleotide trên mạch cũ và sau đó nối các nucleotide mới lại thành mạch mới bổ sung. Như vậy, hai mạch cũ của phân tử DNA ban đầu được tách ra, **mỗi cái làm khuôn để tổng hợp mạch mới**. Kết quả một phân tử DNA ban đầu tạo ra hai phân tử con giống hệt nhau. Mỗi phân tử con đều mang **một mạch cũ và một mạch mới**. Kiểu sao chép này gọi là **bán bảo tồn** (semi-conservative).



Hình 5.18. Thí nghiệm của Meselson và Stahl

Năm 1958, M. Meselson và Stahl đã chứng minh kiểu sao chép bán bảo tồn. Hai ông đã nuôi E.coli nhiều thế hệ trên môi trường có nguồn **nitơ đồng vị nặng N^{15}** . Như vậy tất cả DNA của vi khuẩn đều mang đồng vị nặng N^{15} thay cho N^{14} bình thường. Sau đó tế bào được chuyển sang môi trường chỉ chứa N^{14} **nhẹ**, mẫu các tế bào được lấy ra theo những khoảng thời gian đều đặn và chiết tách DNA. Bằng phương pháp **li tâm trên thang nồng độ $CsCl$** , các loại DNA nặng, nhẹ và lai được tách ra.

Kết quả cho thấy DNA nặng ban đầu (thế hệ 0) chứa N^{15} , sau một lần phân chia cho thế hệ I với DNA lai có tỉ trọng nằm giữa DNA nặng N^{15} và DNA nhẹ N^{14} . Nói cách khác sau một lần sao chép phân tử DNA mới chứa một nửa mang N^{15} và một nửa N^{14} . Ở thế hệ II một nửa số phân tử DNA là lai, nửa còn lại là DNA nhẹ N^{14} (hình 5.18). Thí nghiệm này khẳng định giả thuyết của Watson và Crick là đúng tức hai mạch DNA mẹ tách ra, mỗi cái làm khuôn để tổng hợp nên mạch mới bổ sung.

Để khẳng định kết quả DNA lai được làm biến tính để tách rời hai mạch ra, đúng là một mạch chỉ chứa N^{15} , còn mạch kia chỉ chứa N^{14} .

2. Quá trình sao chép DNA

Những nghiên cứu tiếp theo đã tìm ra các cơ chế phân tử của quá trình sao chép DNA. Đó là một quá trình phức tạp, nhưng phải trải qua các cơ chế chung như :

- Các liên kết hydro ổn định cấu trúc xoắn và gắn hai mạch với nhau phải bị phá vỡ và **tách rời hai mạch**;

- Phải có **đoạn mồi (primer)** tức đoạn DNA hay RNA mạch đơn ngắn bắt cặp với mạch đơn khuôn;

- Đủ **4 loại nucleosid triphosphat** (dATP, dGTP, dTTP và dCTP) **bắt cặp** bổ sung với các nucleotide mạch khuôn;

- Mạch mới tổng hợp theo **hướng $5'P \rightarrow 3' OH$** ;

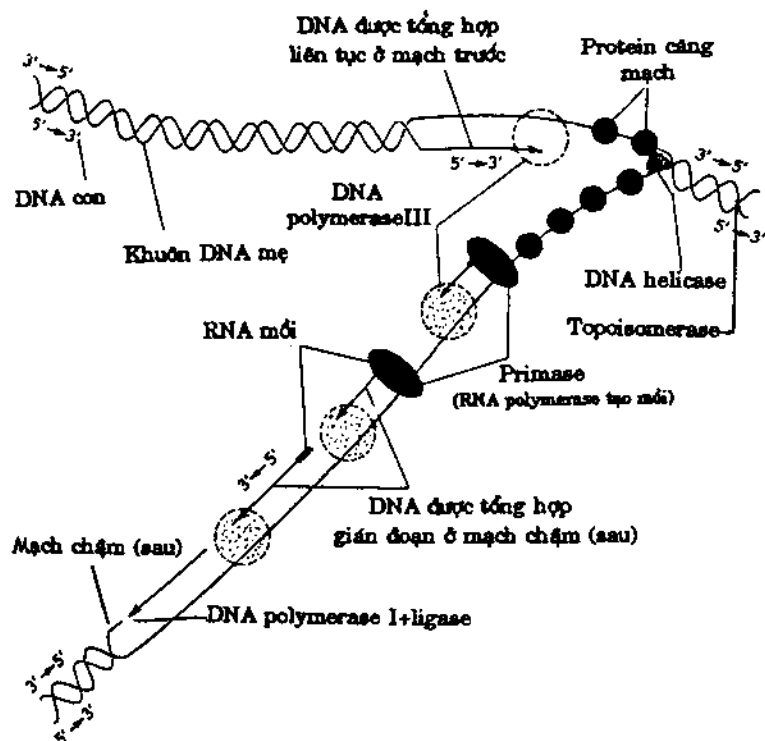
- Các nucleotide mới được nối lại với nhau bằng **liên kết cộng hóa trị** để tạo mạch mới.

Mỗi bước được điều khiển bởi **enzyme đặc hiệu** và được thực hiện một cách **nhANH chóng, chính xác**.

Ở các *Prokaryotae*, lẫn *Eukaryotae*, từng mạch riêng lẻ được sao chép chỉ **theo một hướng** : các enzyme sao chép di chuyển dọc theo mạch mẹ từ đầu $3'$ đến $5'$ để tạo nên mạch mới bổ sung theo **hướng $5' \rightarrow 3'$** . Phân tử DNA gồm hai mạch đối song song, khi tách hai mạch ở một đầu để sao chép tạo ra **ché ba sao chép** (replication fork). Mạch mới được tổng hợp

theo hướng $5' \rightarrow 3'$, nên trên một mạch khuôn quá trình tổng hợp sẽ *hướng từ ngoài vào chẻ ba*; còn ở mạch khuôn kia sẽ tổng hợp *theo chiều từ chẻ ba hướng ra ngoài* bằng cách tạo ra các đoạn ngắn rồi nối lại với nhau.

Sau đây là diễn biến sao chép ở nhiễm sắc thể vòng tròn của *E.coli*. Chi tiết của quá trình được mô tả trên hình 5.19, gồm hai giai đoạn khởi sự (initiation) và nối dài (elongation).



Hình 5.19. Sao chép DNA ở vi khuẩn *E.coli*

a) Khởi sự

Ở *E.coli* quá trình bắt đầu khi một *protein B* đặc hiệu nhận biết *điểm khởi sự sao chép* (replication origine gọi tắt là *ori*) và gắn vào trình tự base đặc biệt đó. Tiếp theo enzyme *gyrase* (một loại enzyme topoisomerase) *cắt DNA làm tháo xoắn* ở 2 phía của protein B. Trong khi 2 phân tử enzyme *gyrase* chuyển động ngược chiều nhau so với điểm *ori* thì 2 phân tử của enzyme *helicase* (còn gọi là *rep*) tham gia tách mạch tạo *chẻ ba sao chép*. Helicase sử dụng năng lượng của ATP làm đứt các liên kết hydro giữa hai base bắt cặp với nhau. Các *protein làm căng mạch SSB* (Single-strand

binding protein = SSB - protein) gắn vào các mạch đơn DNA làm chúng tách nhau, thẳng ra và ngăn không cho chấp lại ngẫu nhiên hoặc xoắn để việc sao chép được dễ dàng.

b) Nối dài

DNA-polymerase III, là một **phức hợp** gồm nhiều enzyme gắn với nhau, bắt đầu sao chép một trong 2 mạch bằng cách gắn vào mạch khuôn và lấp các nucleotide bổ sung vào vị trí tương ứng. Một phức hợp là cần thiết vì DNA-polymerase phải xúc tác nhiều bước phản ứng khác nhau và phải có khả năng sử dụng 4 loại nucleotide như chất phản ứng phụ thuộc vào chỗ được "đọc" trên mạch khuôn. Ít nhất nó phải có 4 trung tâm hoạt động, mỗi trung tâm ứng với một loại nucleotide (A, T, G, C). Ngoài chức năng **polymer hóa** theo hướng $5' \rightarrow 3'$, DNA-polymerase III có khả năng **sửa sai nhờ hoạt tính exonuclease** (exonuclease là hoạt tính enzyme cắt DNA từ đầu mút một mạch) theo hướng $5' \rightarrow 3'$ và $3' \rightarrow 5'$.

Khi phức hợp DNA-polymerase đọc theo mạch khuôn và kéo các nucleotide bổ sung vào đúng chỗ nó gắn các nucleotide lại làm mạch mới bổ sung mọc dài ra. Trên đường di chuyển để tổng hợp DNA, nếu DNA-polymerase III gặp chỗ mà nucleotide mới lắp sai vị trí, nó sử dụng hoạt tính exonuclease $3' \rightarrow 5'$ cắt lùi lại bỏ nucleotide sai, để rồi lắp cái đúng vào tiếp tục sao chép. Các nucleotide trước khi được gắn vào đầu $3'OH$ đã được hoạt hóa do ATP để thành **nucleoside triphosphate** có mang năng lượng. DNA-polymerase có **tính đặc hiệu cao**, nó chỉ thêm nucleotide vào **đầu $3'OH$** của mạch đang được tổng hợp.

Mạch khuôn có đầu $3'$ được DNA-polymerase III gắn vào và tổng hợp ngay mạch bổ sung $5' \rightarrow 3'$ hướng vào chẻ ba sao chép. Mạch khuôn này được gọi là **mạch khuôn trước**, còn mạch mới được tổng hợp gọi là **mạch trước (leading strand)**.

Trong khi đó ở **mạch khuôn sau** có đầu $5'$ việc tổng hợp phức tạp hơn và thực hiện **từ chẻ ba sao chép hướng ra ngoài** để đảm bảo đúng hướng $5' \rightarrow 3'$. Khi mạch kép tách ra, ở gần chẻ ba sao chép, **enzyme primase** gắn mỗi (primer) ARN khoảng 10 nucleotide, có trình tự bổ sung với mạch khuôn. DNA-polymerase III nối theo mỗi ARN, theo hướng ngược với chẻ ba sao chép, tổng hợp các đoạn ngắn 1000 - 2000 nucleotide, được gọi là **các đoạn Okazaki**. DNA-polymerase nối dài đoạn Okazaki đến khi gặp ARN mỗi phía trước thì dừng lại, rồi lùi ra sau tiếp tục tổng hợp từ ARN mỗi mới được tạo nên gần chẻ ba sao chép. Tiếp theo, **DNA-polymerase I** nhờ **hoạt tính exonuclease** $5' \rightarrow 3'$ cắt bỏ mỗi ARN, lấp các nucleotide của DNA vào chỗ trống và thực hiện **polymer hóa hướng $5' \rightarrow 3'$** . Đoạn DNA ngắn 10 nucleotide này còn hở hai đầu, được nối liền chỗ hở nhờ **enzyme ligase** của DNA. Mạch

được tổng hợp từ chỗ ba sao chép hướng ra ngoài được tổng hợp chậm hơn nên gọi là *mạch sau* (lagging strand).

Quá trình sao chép DNA ở E.coli diễn ra với tốc độ rất nhanh, có thể đạt đến 50.000 nucleotide/phút.

3. Các nhân tố tham gia vào sao chép DNA

Các nghiên cứu đến nay xác định thêm chi tiết về các protein và các gen tương ứng tham gia vào sao chép DNA :

Protein	M (kDa)	Gen	Chức năng	Số bản sao/tế bào
Rep	65	<i>rep</i>	Tách mạch	50
Helicase III	75		Tách mạch	
SSB Protein	74	<i>ssb</i>	Ổn định mạch đơn	300
Protein <i>i</i>	66	<i>dnaT</i>	Tham gia	50
Protein <i>n</i>	28		vào	80
Protein <i>n'</i>	76		cấu trúc	70
Protein <i>n''</i>	17		của	-
Protein <i>dna B</i>	29	<i>dnaB</i>	primosome	100
Protein <i>dna C</i>	300	<i>dnaC</i>		20
Primase	60	<i>dnaG</i>	Tổng hợp môi (primer) RNA	50
DNA polymerase III	760		Nối dài	20
tiểu đơn vị	140	<i>polC</i>	mạch DNA	
tiểu đơn vị	37	<i>dnaN</i>	đang	
tiểu đơn vị	52	<i>dnaZ</i>	tổng hợp	
tiểu đơn vị	32	<i>dnaX</i>	và	
tiểu đơn vị	25	<i>dnaQ</i>	kiểm soát	
tiểu đơn vị	10		sự chính xác	
tiểu đơn vị	83			
DNA polymerase I	102	<i>polA</i>	Cắt môi tổng hợp đoạn DNA ngắn ở chỗ hở	300
Ligase	75	<i>lig</i>	Hàn kín mạch	300
DNA Topoisomerase I			Cắt hở 1 mạch	
DNA Topoisomerase II			Cắt hở 2 mạch	

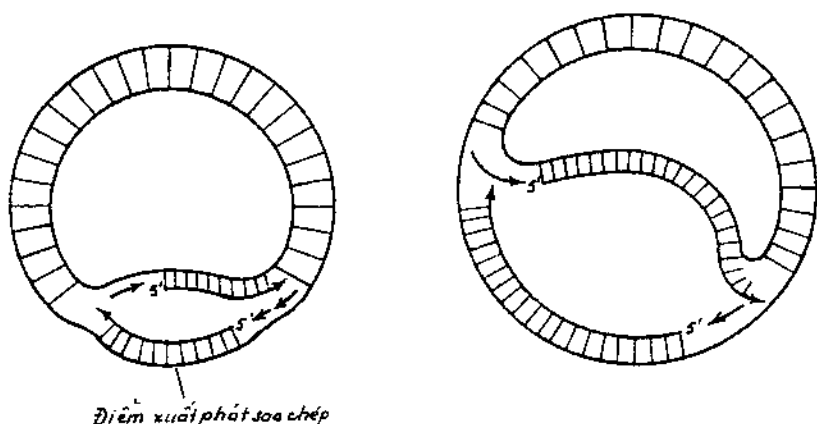
Số liệu cho thấy quá trình sao chép là chuỗi các phản ứng sinh hóa rất phức tạp có sự tham gia của nhiều gen và các protein tương ứng.

4. Sao chép DNA trong tế bào

Trong tế bào quá trình sao chép phụ thuộc vào cấu trúc của bộ gen nên tuy tuân theo các nguyên tắc chung vẫn có những khác biệt giữa tế bào *Prokaryotae* và *Eukaryotae*.

a) Sao chép của nhiễm sắc thể *Prokaryotae*

Để theo dõi sao chép DNA, đồng vị phóng xạ thymidine là tiền chất đặc hiệu cho DNA sử dụng. Quá trình sao chép xuất phát từ **một điểm ori** (từ chữ origine) gọi là **điểm xuất phát** và triển khai ra cả hai phía (hình 5.20). Khi DNA vòng tròn đang sao chép, quan sát thấy dạng DNA hình "con mắt" (eye replication). Chỉ ba sao chép lan dần, cuối cùng tạo ra 2 phân tử DNA lai: một mạch có mang dấu phóng xạ T-H³ (thymidine H³). Có trường hợp sao chép chỉ xảy ra về một phía.



Hình 5.20. Sao chép replicon ở tế bào vi khuẩn

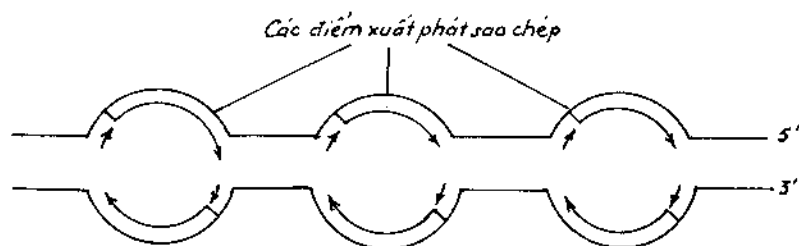
E.coli chỉ có một điểm xuất phát sao chép ori nên cả DNA thành **một đơn vị sao chép** thống nhất được gọi là **replicon**. Replicon được hiểu là đơn vị sao chép. Bộ gen của các sinh vật tiến nhân thường chỉ có một replicon.

b) Sao chép nhiễm sắc thể ở tế bào *Eukaryotae*

Tế bào nhân thực có số lượng DNA lớn hơn nhiều so với tế bào tiến nhân, tạo nên nhiều nhiễm sắc thể, mà mỗi cái gồm một sợi DNA thẳng có kết hợp với protein. Do đó sao chép DNA của tế bào nhân thực có **phức tạp hơn** và **tốc độ chậm hơn** (khoảng 50 nucleotide / giây).

Điểm khác căn bản là DNA của tế bào nhân thực có **nhiều replicon**. Ví dụ : nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* có tới 500 replicon tức có **500 điểm ori** xuất phát sao chép. Quá trình sao chép cũng bắt đầu từ ori rồi lan về hai phía như mô tả trên hình 5.21. Tế bào có **cơ chế kiểm soát nghiêm ngặt** quá trình sao chép, điểm ori nào đã sao chép qua một lần rồi thì **không lặp lại** trước khi toàn bộ DNA được sao chép hoàn toàn.

Sau khi sao chép xong tế bào có cơ chế phân chia DNA đều đặn về các tế bào con.



Hình 5.21. Sao chép của nhiều replicon

5. Sửa sai trong sao chép và khi không sao chép

Sự sao chép chính xác của phân tử DNA có tầm quan trọng sống còn đối với hoạt động bình thường của tế bào. Nhiễm sắc thể chứa các thông tin cần thiết cho việc xây dựng và điều khiển toàn bộ hoạt động của tế bào. Vì thông tin cho sự lắp ráp hàng ngàn protein khác nhau, có chiều dài hàng trăm hoặc ngàn base, sự sai hỏng một vài base trong số đó dễ xảy ra và có ý nghĩa rất quan trọng. Bản thân phân tử DNA dài, mỏng manh, trong quá trình sống nó thường xuyên chịu tác động của các nhân tố bên trong và ngoài tế bào. Điều đó cho thấy chỉ riêng cơ chế **sao chép chính xác** chưa đủ giải thích **sự ổn định** cấu trúc DNA qua nhiều thế hệ tế bào.

a) Sửa sai trong sao chép

Người ta đã dùng các nucleotide và DNA-polymerase để **tổng hợp DNA in vitro** (trong ống nghiệm). **Sai sót** trong trường hợp này là 1.10^{-5} tức trong 100.000 nucleotide có một cái sai. Sai sót này cho thấy sao chép DNA trong ống nghiệm có mức chính xác cao, nhưng đối chiếu lên các sinh vật thì mức sai sót này hãy còn quá lớn.

Ví dụ:

– Ở *E.coli* DNA có 3.10^6 cặp base, vậy mỗi lần sao chép có 30 sai sót có thể dẫn đến nhiều đột biến. Trên thực tế không có nhiều đột biến qua mỗi lần sao chép như vậy.

– Ở người DNA của một tế bào có 3.10^9 cặp base, với sai sót 1.10^{-6} sẽ có 30.000 sai sót trong một lần sao chép. *So với thực tế sai sót này quá lớn.* Động vật có vú xuất hiện cách nay 300 triệu năm (3.10^8 năm), nếu sai sót lớn như vậy khó mà có sự giống nhau của nhiều protein giữa người và cá voi. Thực tế cho thấy giữa người và cá voi có những protein giống nhau.

Bằng cách đánh giá tần số các đột biến mới xuất hiện trong quần thể lớn và theo dõi biến đổi enzyme nào đó trong nuôi cấy mô tế bào, người ta tính được rằng trong cơ thể sinh vật sai sót trong khi *sao chép in vivo* (trong cơ thể sinh vật) là 1.10^{-9} tức một sai sót trên một tỉ base. Như vậy tế bào người có 3.10^9 cặp nucleotide mỗi lần sao chép chỉ có 3 sai sót.

Đánh giá tốc độ biến đổi trong tiến hóa cũng khẳng định mức chính xác rất cao trong sao chép *in vivo*.

Mức chính xác cao của sao chép trong cơ thể sinh vật có được nhờ các cơ chế sửa sai:

– Hướng sao chép bao giờ cũng *từ đầu 5' → 3' để việc sửa sai chính xác.*

– Các DNA-polymerase I và III vừa *polymer hóa*, vừa có hoạt tính *exonuclease 5' → 3' và 3' → 5'*. Nếu trên đường di chuyển để polymer hóa, nếu gặp nucleotide lắp sai, DNA -polymerase sẽ lùi lại cắt bỏ theo hướng 3' → 5' (hoạt tính exonuclease 3' → 5').

b) Sửa sai khi không sao chép

Phân tử DNA có thể bị biến đổi ngay cả *khi không sao chép*. Các biến đổi đột biến này xảy ra với *tần số khá cao*. Nhờ các cơ chế sửa sai nên tần số đột biến được duy trì ở mức thấp.

Chiến lược sửa sai trên nhiễm sắc thể về cơ bản giống nhau khi sửa sai trong sao chép và khi bị đột biến : *các enzyme nhận biết* gắn vào các trình tự sai và *cắt rời đoạn sai*, rồi mạch đơn đúng làm khuôn để tổng hợp lại chỗ bị cắt cho *đúng*. Hàng loạt enzyme đặc hiệu làm nhiệm vụ *dò tìm và sửa sai*. Có khoảng *20 enzyme* rà soát dọc các nhiễm sắc thể dò tìm các base có biến đổi hóa học, mỗi enzyme có *chức năng chuyên biệt* cho một loại sai hỏng. Khoảng *5 enzyme khác đặc hiệu* cho các liên kết cộng hóa trị sai giữa base với các chất hóa học khác hoặc giữa các base kề nhau trên một mạch. Một số enzyme đặc hiệu khác phát hiện sự bắt cặp sai, như trường hợp mất purine. Tổng cộng có khoảng 50 enzyme chuyên *phát hiện* và *sửa* các sai hỏng trên phân tử DNA.

V. DNA THỎA MÃN CÁC YÊU CẦU ĐỐI VỚI VẬT CHẤT DI TRUYỀN

1. Chứa và truyền đạt thông tin di truyền

Đòi hỏi trước tiên đối với vật chất di truyền là có khả năng chứa thông tin di truyền. Phân tử DNA có chiều ngang giới hạn, nhưng chiều dài thì không hạn chế. *Trình tự sắp xếp các nucleotide theo chiều dài có thể phân ánh những thông tin nhất định.* Tuy DNA chỉ có 4 loại nucleotide nhưng số trình tự khác nhau là một con số khổng lồ. Người ta tính ra rằng với đoạn DNA có 20 nucleotide, thì số trình tự của nó theo chiều dài có đến 4^{20} tức khoảng nghìn tỉ tổ hợp. Khả năng chứa thông tin đó làm cho phân tử DNA là *phân tử dài nhất trong tự nhiên.*

Ngoài việc chứa thông tin theo chiều dài, khả năng này còn được *mở rộng do các thay đổi cấu trúc, do gãy nối lại và lắp ghép* giữa các đoạn DNA.

Thông tin chứa trên DNA được *sử dụng và hiện thực hóa* nhờ các chất trung gian RNA, rồi đến *tổng hợp các protein* là những công cụ phân tử thực hiện chức năng của tế bào.

2. Tự sao chép chính xác

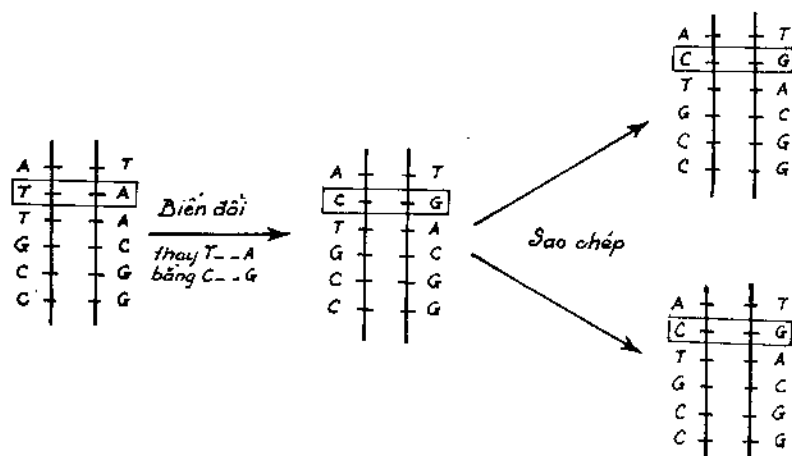
Mô hình Watson - Crick cũng thỏa mãn ở mức lí tưởng yêu cầu thứ hai của vật chất di truyền. Chuỗi xoắn kép gồm hai sợi bổ sung cho nhau theo nguyên tắc A-T và G-C, làm cho phân tử như có một *bản âm* và một *bản dương*. Mỗi bản có thể làm khuôn tạo ra bản kia để từ một phân tử ban đầu có hai phân tử con giống hệt.

3. Có khả năng biến dị di truyền

Trên phân tử DNA có thể xảy ra nhiều biến đổi. Các *biến đổi có thể được di truyền*. Ví dụ : cặp A-T trên DNA được thay bằng G-C thì sự thay thế được truyền cho các phân tử con (hình 5.22).

4. Có tiềm năng cho tự sửa sai

Các nhà di truyền học còn phát hiện thêm một tính chất nữa của DNA là tiềm năng cho tự sửa sai. Do cấu trúc mạch kép nên sai hỏng ở một mạch có thể bị cắt bỏ và dựa vào mạch nguyên vẹn làm khuôn để tổng hợp lại cho đúng.



Hình 5.22. DNA có khả năng biến dị di truyền

TÓM TẮT CHƯƠNG

Việc chứng minh vai trò mang **thông tin di truyền** của **DNA** và **mô hình cấu trúc DNA** của Watson-Crick đã tạo nên bước phát triển mới cho sinh học dẫn đến sự hình thành sinh học phân tử.

DNA trong tế bào có thể ở các dạng khác nhau như B-DNA và Z-DNA tùy trạng thái sinh lý. Nhờ sự **biến tính** và **hồi tính** nên có thể **lại nucleic acid**. DNA của *Prokaryotae* có cấu trúc tự nhiên dạng **siêu xoắn**. DNA của *Eukaryotae* có các **trình tự lặp lại** cao, vừa và **độc nhất**. Nhiễm sắc thể của *Eukaryotae* là **phức hợp nucleoprotein** cuộn chặt thành nhiễm sắc thể qua nhiều bước, mà đơn vị căn bản là **nucleosome**.

DNA sao chép theo nguyên tắc **bán bảo tồn** nhờ khuôn của mạch mẹ. Quá trình sao chép **phức tạp** có sự tham gia của hàng loạt enzyme và protein bắt đầu từ điểm xuất phát **ori**. Thông tin di truyền được duy trì với mức **ổn định cao** nhờ các **cơ chế sửa sai** cả trong sao chép và không có sao chép.

DNA thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu đối với chất di truyền: chứa và truyền đạt thông tin, tự sao chép, có khả năng biến dị di truyền và sửa sai. DNA là chất kì diệu nhất trong thiên nhiên.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu các chứng minh gián tiếp và trực tiếp rằng DNA là chất di truyền.
2. Các đặc điểm của mô hình cấu trúc của Watson-Crick.
3. Hãy phân tích cho thấy khả năng của nguyên tắc bắt cặp bổ sung trong nghiên cứu các tính chất của DNA.
4. DNA trong tế bào có trạng thái tự nhiên như thế nào ?
5. Thí nghiệm nào chứng minh DNA sao chép bán bảo tồn ?
6. Kể tên các enzyme và protein tham gia sao chép DNA.
7. Ngoài chức năng polymer hóa các DNA-polymerase còn có hoạt tính gì để có thể sửa sai ?
8. Để đảm bảo sao chép theo đúng hướng 5' → 3' tế bào phải sao chép như thế nào trên 2 mạch khuôn ?
9. Sự ổn định rất cao của thông tin di truyền nhờ các cơ chế nào?
10. DNA thỏa mãn các yêu cầu đối với vật chất di truyền như thế nào?
11. Vì sao nói DNA là chất kì diệu nhất trong thiên nhiên ?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Loài *Chironomus*, xếp cùng giống (*genus*) với ruồi, có khoảng $4,3 \times 10^{-13}$ gram DNA trong một tế bào lưỡng bội và $3,4 \times 10^{-9}$ gram DNA trong nhân đa bội (polytene).

a) Xác định số lượng trung bình các phân tử DNA có trong một nhiễm sắc thể đa sợi.

b) Tính số lần sao chép của một phân tử DNA (hay chromatide) cần thực hiện để đạt được đủ số bản sao trung bình trong một nhiễm sắc thể đa sợi.

Lời giải

a) Nếu mỗi chromatide chứa một sợi DNA, số lượng bản sao đối với một nhiễm sắc thể trong nhân đa sợi (polytene nucleus) là :

$$(3,4 \times 10^{-9}) \text{ gram} / (4,3 \times 10^{-13}) \text{ gram} = 0,79 \times 10^4$$

Tuy nhiên, mỗi nhiễm sắc thể đa sợi được tạo nên do sự bắt cặp của các nhiễm sắc thể tương đồng tiếp theo sau sao chép của chromatide. Như vậy, mỗi "nhiễm sắc thể" đa sợi chứa số phân tử DNA là :

$$2 \times (0,79 \times 10^4) \approx 1,6 \times 10^4$$

b) Ở mỗi lần sao chép, số lượng chromatide tăng gấp đôi. Nếu coi n là số lần sao chép (hay nhân đôi) để tạo ra nhiễm sắc thể đa sợi, thì:

$$2^n = 0,79 \times 10^4$$

$$n = \frac{\log 7900}{\log 2} = \frac{3,897}{0,301} = 12,947$$

$$n = 13 \text{ (gần số chẵn)}$$

BÀI TẬP BỔ SUNG

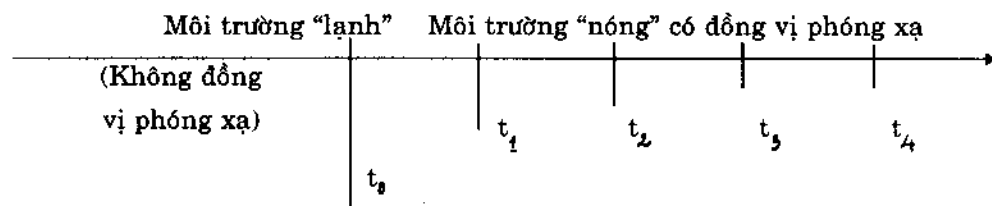
1. Trong tế bào lưỡng bội của người có khoảng $6,4 \times 10^9$ cặp nucleotide. Nếu chiều dài trung bình của nhiễm sắc thể người ở kì giữa khoảng 6 micrometer, thì tỉ lệ cuộn chặt so với chiều dài kéo thẳng của DNA là bao nhiêu ?

2. Phân tử DNA mẹ chỉ chứa N^{15} phóng xạ được chuyển sang môi trường chỉ có N^{14} . Sau 4 lần sao chép, có bao nhiêu phân tử DNA còn chứa một số N^{15} ?

3. DNA của *E. coli* sao chép về 2 phía. Thời gian cần để sao chép xong là 40 phút. Biết rằng ở 37°C DNA được tổng hợp nhiều hơn trên một số môi trường này so với môi trường khác, tốc độ thêm nucleotide vào mạch đang mọc dài ra như nhau ở tất cả môi trường nuôi vi khuẩn. Giải thích vì sao *E. coli* có thể chia tế bào mỗi lần chỉ 22 phút trong một số môi trường dinh dưỡng ?

4. DNA của sinh vật A đánh dấu N^{14} được lai với DNA của sinh vật B đánh dấu N^{15} cùng một nồng độ. DNA lai chiếm 5% tổng DNA hồi tính. Bao nhiêu phần trăm tự base là chung cho cả hai sinh vật ?

5. Một dung dịch nuôi cấy tế bào không đồng nhất (asynchronous) ở giai đoạn tăng trưởng nhanh (phage - log) chịu tác động đánh dấu phóng xạ liên tục với thymidine- H^3 ($T-H^3$). Theo thời gian người ta lấy mẫu đều đặn :



Dấu phóng xạ bắt đầu tác động ngay sau t_0 . Các tế bào được lấy mẫu ngay, định hình và trải lên lam. Người ta nhuộm màu để làm hiện ra các bào quan của tế bào và tiếp theo rửa sạch T-H³ không gắn vào tế bào, rồi làm phóng xạ đồ tự ghi. Một bào quan được coi có đánh dấu phóng xạ khi nó chứa ít nhất một hạt bạc.

a) Ở các bào quan nào có thể quan sát thấy các hạt bạc ?

b) Cho biết tế bào đang ở giai đoạn nào trong chu trình phân bào khi các quan sát tiếp theo không thấy các kì mang dấu phóng xạ trước $t_0 + 3$ giờ.

c) Tất cả các tế bào, dù ở gian kì hay đang phân chia, có nhân hay nhiễm sắc thể mang dấu phóng xạ ở $t_0 + 16$ giờ. Cho biết các giai đoạn nào của phân bào kéo dài trong 16 giờ ?

ĐÁP SỐ

1. Khoảng 8.000 lần.

2. Chỉ 2 phân tử.

3. Vòng sao chép mới đã bắt đầu sớm khi vòng sao chép trước chưa kết thúc.

4. 10%.

5. a) Các nhân tế bào và các ti thể.

b) Như trên đã nói, các kì giữa không có dấu phóng xạ trước t_0 là 3 giờ, vậy các tế bào đã qua G_2 + kì trước = 3 giờ.

c) Tất cả các nhân và nhiễm sắc thể có dấu phóng xạ sau $t_0 + 16$ giờ.

Vậy G_2 + nguyên phân + G_1 = 16 giờ

SINH TỔNG HỢP PROTEIN

Sự chuyển tiếp từ di truyền học cổ điển sang di truyền học phân tử được đặt cơ sở từ *giả thuyết 1 gen - 1 enzyme*. Nó cho thấy các gen kiểm tra các phản ứng sinh hóa thông qua việc tổng hợp các protein - enzyme và dẫn đến hình thành tính trạng. Giữa gen và mạch polypeptide có sự liên quan tuyến tính. *Học thuyết trung tâm* của sinh học phân tử ra đời đã mở ra một giai đoạn mới. Đồng thời, nó cho thấy rõ thông tin di truyền trên DNA được hiện thực hóa qua các quá trình *phiên mã* và *dịch mã* để tổng hợp nên các phân tử protein.

I. CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA PROTEIN

Các phân tử protein là cơ sở của sự đa dạng về cấu trúc và chức năng của tất cả các sinh vật. Chúng có cấu trúc phức tạp hơn rất nhiều so với glucid, lipid và cả nucleic acid. Các protein có cấu trúc không gian 3 chiều phức tạp khi ở dạng tự nhiên (native) và ở dạng này mới có hoạt tính sinh học. Các protein là *công cụ phân tử* hiện thực hóa thông tin di truyền chứa trên nucleic acid.

1. Cấu trúc của các phân tử protein

a) Amino acid - đơn vị cấu trúc

Các phân tử protein là các polymer (cao phân tử) được tạo nên từ những đơn vị cấu trúc là các amino acid gồm 20 loại. Các amino acid nối nhau bằng liên kết peptide tạo thành mạch polypeptide (polypeptide chains). Thường một mạch polypeptide có khoảng 40 đến 500 amino acid, tuy có cái ngắn hoặc dài hơn.

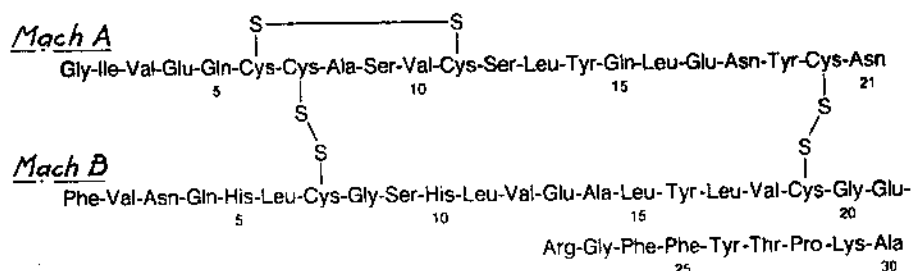
Các phân tử protein thường có nhiều hơn một mạch polypeptide. Các mạch thường gắn với nhau nhờ các liên kết yếu, đặc biệt là các liên kết hydro. Tuy nhiên ở phân tử insulin, ngoài các liên kết hydro, hai mạch polypeptide gắn với nhau nhờ các liên kết cộng hóa trị là các *cấu disulfide* (disulfide bonds) nối giữa các nguyên tử S của hai amino acid cysteine (hình 6.1).

Các phân tử protein trong tế bào có nhiều bậc cấu trúc khác nhau.

b) Cấu trúc bậc một

Cấu trúc bậc một (primary structure) của phân tử protein được hiểu là **số lượng** của các **mạch polypeptide**, **số lượng** và **trình tự của các amino acid** trên mỗi mạch. Vì cấu trúc bậc một của các protein khác nhau có sự dao động lớn, nên các loại protein có thể có được là một con số khổng lồ. Ví dụ, một mạch polypeptide ngắn có 20 amino acid, có thể có 20^{100} kiểu trình tự amino acid.

F.Sanger là người đầu tiên xác định được trình tự các amino acid của một protein đầu tiên là insulin. Ông cùng nhiều nhà nghiên cứu phải làm việc liên tục 10 năm, đến năm 1964 mới biết được trình tự của toàn bộ 51 amino acid của insulin (hình 6.1). Công trình này đã đặt cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo và ông nhận giải Nobel vào năm 1958.



Hình 6.1. Phân tử insulin có 2 mạch polypeptide A,B và 3 cầu disulfide

Phương pháp Sanger xác định trình tự các amino acid của mạch polypeptide được thực hiện theo nguyên tắc sau : thủy giải, định loại, định lượng và xếp thứ tự.

Nếu mạch polypeptide được đun nóng trong dung dịch acid 24 giờ, tất cả các liên kết peptide bị **thủy giải** và các amino acid tách rời nhau.

Để **xác định loại amino acid** nào có số lượng bao nhiêu Sanger đã dùng phương pháp sắc kí.

Tiếp theo, insulin được **thủy giải không hoàn toàn** để nhận các đoạn peptide có chứa 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều amino acid hơn. Các đoạn ngắn này được phân tích đặc biệt để xác định trình tự amino acid của chúng bằng cách xác định amino acid nào nằm ở đầu mút có nhóm $-NH_2$. Sau khi phân tích một số lượng lớn các đoạn ngắn, ông ráp chúng lại tìm các chỗ trùng lặp. Ví dụ: ông tìm thấy 2 đoạn có đầu trùng lặp như sau :

Đoạn 1 : Leu - Val - Cys - Gli - Glu - Arg - Gli - Phe - Phe

Đoạn 2 : Gli - Phe - Phe - Tyr - Thr - Pro - Lis

từ đó rút ra được một đoạn dài của insulin có trình tự :

Leu - Val - Cys - Gly - Glu - Arg - Gly - Phe - Phe - Tyr - Thr - Pro - Lis...

Ông tìm thêm các đoạn trùng lặp với đoạn này để kéo dài nó ra. Bằng các nghiên cứu tốn nhiều công sức như trên, ông đã tìm ra toàn bộ trình tự các amino acid của hai mạch polypeptide.

Tiếp theo, bằng kĩ thuật khác ông đã xác định vị trí của 2 cầu disulfide (---).

Phát minh của Sanger, tìm ra công thức cấu trúc phân tử của insulin, là đỉnh cao của sự nỗ lực trong hơn một thế kỉ của nhiều nhà khoa học nhằm đọc được thành phần và cấu trúc của protein. Sau đó nhiều phân tử protein cũng được tìm ra cấu trúc bậc một (hình 6.2a). Ngày nay nhờ các tiến bộ khoa học và *máy tự động* xác định trình tự các amino acid đã được chế tạo. Tuy nhiên nguyên tắc xác định cũng y như vậy.

c) Cấu trúc bậc hai : xoắn alpha và beta

Các protein không chỉ là một chuỗi thẳng các amino acid nối lại với nhau, mà chúng còn cuộn lại trong một cấu trúc không gian phức tạp. Chính điều này đóng vai trò chủ yếu trong xác định các tính chất sinh học đặc trưng cho từng loại protein. Đặc tính cấu trúc không gian ba chiều này là hệ quả của *sự tương tác giữa các peptide* trong protein. Vào năm 1951, L. Pauling và B. Corey cho thấy các liên kết hydro bên trong phân tử tạo nên và ổn định cấu trúc xoắn alpha (hình 6.2b). Cấu trúc xoắn dễ hình dung khi coi mạch xoắn đều quanh ống hình trụ. Mạch được duy trì ở dạng xoắn nhờ các liên kết hydro tạo nên giữa nhóm amin của một amino acid với oxygen của amino acid thứ ba ở xa. Vùng có cấu trúc xoắn α được gọi là *cấu trúc bậc hai* (secondary structure). Cấu trúc alpha có dạng đơn giản nhất ở một số protein sợi (fibrous proteins).

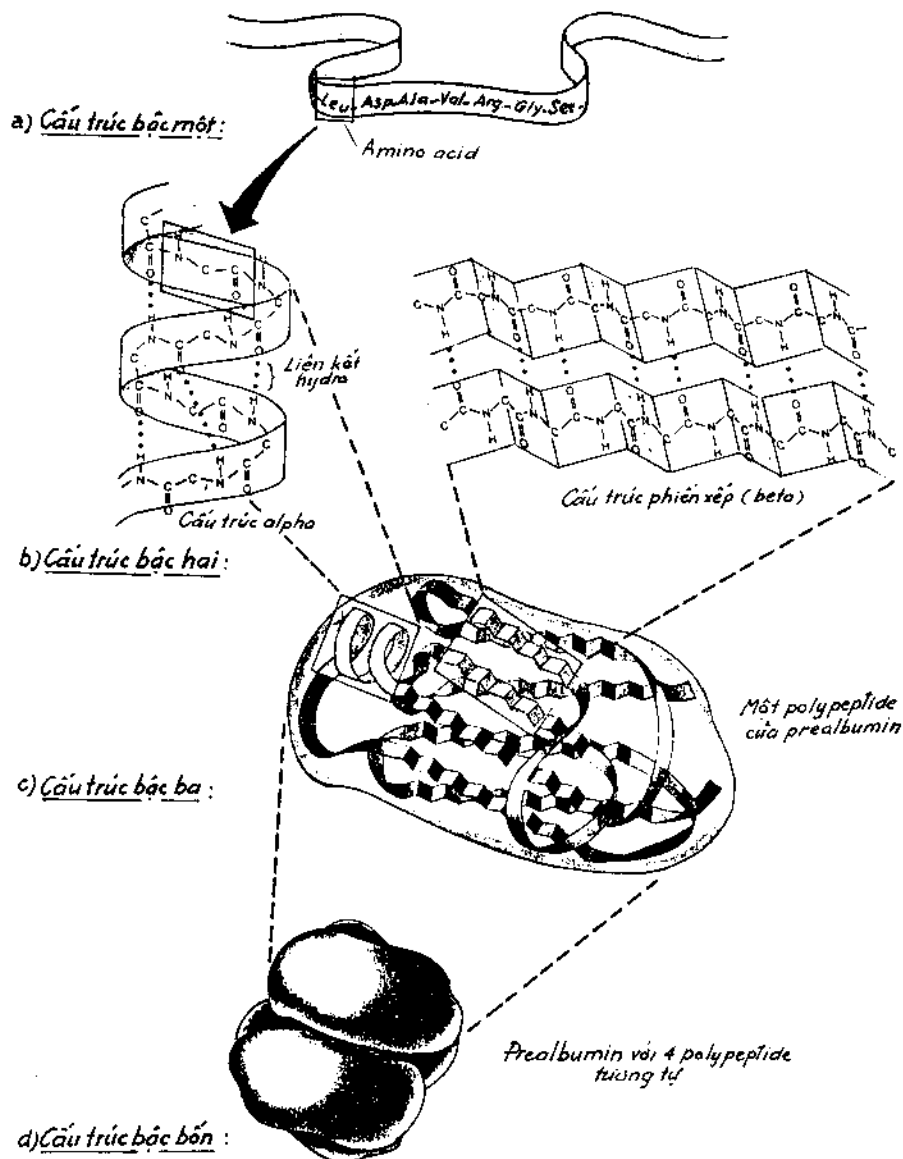
Một cách sắp xếp của mạch polypeptide tạo nên kiểu cấu trúc bậc hai khác gọi là *cấu trúc beta* (β), thường gọi là các phiến xếp (pleated sheet). Ở cấu trúc này các mạch polypeptide xếp cạnh nhau được nối nhờ các liên kết hydro (hình 6.2b). Nhờ sự sắp xếp như vậy nên protein dẻo, chắc, lại chịu sức căng như các loại protein của tơ lụa, mạng nhện, lông vũ, vảy, vuốt, các loại β -keratin ở mỏ chim và bò sát.

d) Cấu trúc không gian ba chiều

Các *protein khối cuộn* (globular protein) có cấu trúc không gian phức tạp hơn nhiều so với protein sợi, các mạch polypeptide của chúng cuộn lại phức tạp có dạng cuộn hay khối cầu (hình 6.2c), nhờ các nhóm gốc bên R tích điện và phân cực.

Các protein cuộn gồm các enzyme, các hormone protein, các kháng thể và phần lớn protein của máu. Đa số tan trong nước. Thường chúng có các đoạn xoắn alpha xen với không xoắn. Cấu trúc không gian ba chiều này phức tạp hơn cấu trúc bậc hai được gọi là **cấu trúc bậc ba** (tertiary structure).

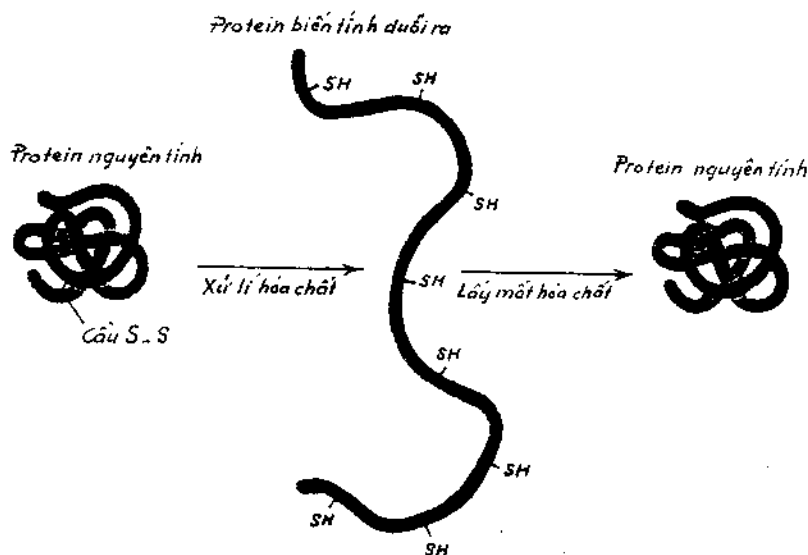
Khi một protein khối cuộn gồm hai hay nhiều hơn các mạch polypeptide độc lập gắn lại với nhau, thường nhờ các liên kết yếu, sẽ có **cấu trúc bậc bốn** (quaternary structure). Cấu trúc bậc bốn của prealbumin là một ví dụ (h.6.2d).



Hình 6.2. Các bậc cấu trúc của phân tử protein

e) Tầm quan trọng của cấu trúc bậc một

Tuy phân tử protein có nhiều bậc cấu trúc khác nhau, nhưng có nhiều cơ sở để cho rằng : chính cấu trúc bậc một xác định cấu trúc không gian tự nhiên (native) của phân tử protein. Đặc biệt, cấu trúc bậc một tạo thuận lợi nhất về mặt năng lượng để ổn định mạch polypeptide. Nếu mạch polypeptide có 2 đơn vị *cysteine*, thường cầu disulfide sẽ nối hai mạch ổn định cấu trúc. *Proline* cũng có ảnh hưởng đến sự cuộn lại của mạch, vì nó tạo thành cấu trúc alpha do nhóm gốc R của nó có mạch vòng.



Hình 6.3. Sự biến tính và hồi tính của RNase

Các tính chất khác nhau của gốc R amino acid cũng ảnh hưởng đến hình dạng của protein. Các nhóm kỵ nước có xu hướng nằm trong, nhóm ưa nước nằm ngoài tiếp xúc với nước, nhóm phân cực hay tích điện cũng có những tương tác nhất định.

Một chứng cứ nữa về tầm quan trọng của cấu trúc bậc một của protein nhận được khi nghiên cứu biến tính protein, tức làm mất cấu trúc bậc hai, ba, bốn do nhiệt độ cao hay pH khác thường. Thậm chí, khi đun nóng nhanh (thường khoảng 60°C) phần lớn protein khối cuộn bị biến tính (denaturation), nhưng dưới những điều kiện thuận lợi trong ống nghiệm, một số protein đã biến tính có thể tự động phục hồi cấu trúc không gian ba chiều có hoạt tính tự nhiên. Ví dụ, sự biến tính và hồi tính của enzyme ribonuclease (hình 6.3).

2. Các chức năng sinh học đa dạng của protein

Các protein có chức năng rất đa dạng, có thể nói chúng thực hiện hầu hết các chức năng căn bản của chất sống như : xúc tác các phản ứng sinh

hóa; là các phân tử cấu trúc của tế bào; tham gia vào sự vận động, dự trữ và vận chuyển thức ăn, các chất điều hòa và bảo vệ tế bào. Có thể phân loại các protein dựa theo chức năng.

a) Các chất xúc tác

Các enzyme hay ferment là nhóm protein lớn nhất và quan trọng nhất. Có hàng nghìn enzyme và mỗi cái xúc tác một kiểu phản ứng sinh hóa nhất định. Các phân tử enzyme thường có cấu trúc không gian hình khối cuộn (globular) và có trung tâm hoạt tính. Có những enzyme làm nhiệm vụ điều hòa có cấu trúc lập thể. Một số ví dụ:

- Ribonuclease thủy giải ARN.
- Cytochrome C tham gia chuyển điện tử.
- Trypsin thủy giải peptide.

b) Các protein cấu trúc

Đây là nhóm protein lớn thứ hai, một số chủ yếu như :

- Các protein của vỏ virus.
- Glycoprotein tạo vỏ và thành tế bào.
- Các protein tham gia cấu trúc màng.
- α - Keratin cấu tạo da, lông vũ, móng và guốc động vật.

c) Các protein vận chuyển

- Hemoglobine của máu vận chuyển O_2 cho cơ thể.
- Myoglobine - protein vận chuyển O_2 trong cơ.
- Albumin - huyết tương.

d) Các protein vận động

- Myosine - protein của cơ.
- Actine - protein của cơ.
- Dineine - protein trong các chiên mao.

Các protein này tham gia vào sự co cơ để vận động.

e) Các protein bảo vệ

- Các kháng thể là các protein bảo vệ cơ thể.

- Fibrinogen là chất có thể thành fibrine làm đông máu.
- Trombine là protein làm đông máu.

f) Các chất có hoạt tính sinh học

- Các hormone protein như insulin, hormone tăng trưởng, điều hòa hoạt động trao đổi chất.
- Nọc rắn - protein thủy giải phosphoglyceride gây độc.
- Độc tố do *Clostridium botulicum* - protein gây độc thực phẩm.

Trên đây là những liệt kê tóm tắt, nhưng cũng đủ cho thấy sự đa dạng về chức năng của các loại protein. Điều đáng lưu ý là tất cả chúng đều được tạo nên từ 20 loại amino acid giống nhau, chỉ khác nhau ở số lượng và trình tự sắp xếp các loại amino acid. Không có loại amino acid nào độc nhưng từ chúng có thể tạo nên các protein độc như nọc rắn.

II. GEN KIỂM TRA CÁC PHẢN ỨNG SINH HÓA

Cho đến những năm 40, di truyền học dựa vào việc theo dõi các tính trạng trong quá trình lai mà suy đoán về các gen trên nhiễm sắc thể. Người ta gọi thời kì này là *di truyền học hình thức* (formal genetics). Quá trình diễn biến như thế nào từ gen đến tính trạng chưa rõ. Một số người đã dự đoán gen liên quan đến phản ứng sinh hóa.

Năm 1941, G.Beadle và E.Tatum đã xác định được mối quan hệ giữa gen và enzyme với giả thuyết nổi tiếng 1 gen - 1 enzyme và được giải Nobel năm 1958. Thuật ngữ "*di truyền học sinh hóa*" ra đời với ý nghĩa : sự kiểm soát gen - enzyme xác định các đặc tính, tốc độ, các mối quan hệ tương hỗ và trình tự các phản ứng sinh hóa trong cơ thể. Tính di truyền đã tái tạo các kiểu trao đổi chất giống nhau qua nhiều thế hệ.

Về sau này, các gen được nghiên cứu về mặt sinh hóa toàn diện hơn với các kĩ thuật vật lí và hóa học tiên tiến.

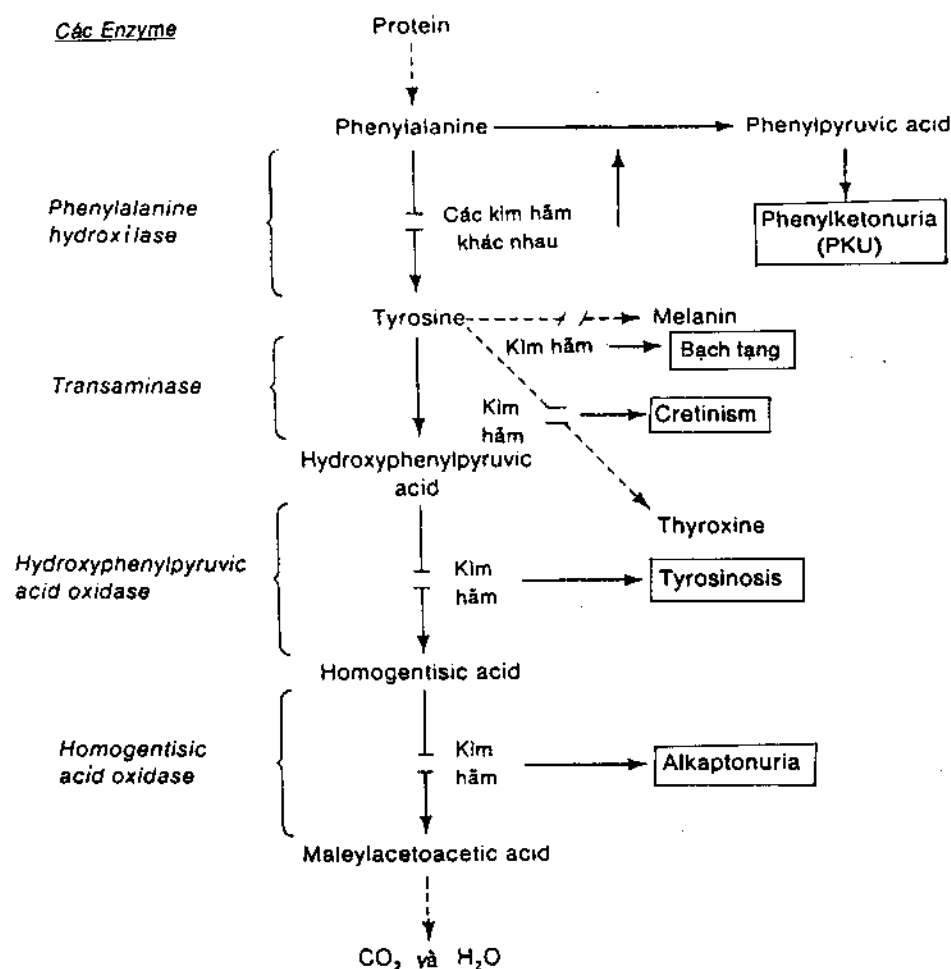
1. Các sai hỏng trao đổi chất bẩm sinh ở người

Vào năm 1908, trên cơ sở nghiên cứu các bệnh do *sai hỏng trao đổi chất bẩm sinh* (inborn errors of metabolism), bác sĩ người Anh A. Garrod lần đầu tiên nêu lên quan niệm về di truyền sinh hóa. Bệnh được phát hiện đầu tiên là ancapto niệu (alcaptonuria), trong nước tiểu có tích tụ homogentisic acid, đen lại ngoài không khí. Theo dõi phả hệ thấy bệnh có liên quan đến 1 gen lặn, ông Garrod cho rằng gen có liên quan đến phản ứng sinh hóa. Năm

1914, phát hiện thêm ở người bị bệnh này thiếu hoạt tính enzyme oxydase của homogentisic acid.

Đến nay, hàng nghìn sai hỏng trao đổi chất bẩm sinh đã được phát hiện. Các sai hỏng gây bệnh di truyền *trong chu trình phenylalanine* được tìm ra và được làm ví dụ điển hình (hình 6.4).

Mỗi bệnh ở đây liên quan đến sai hỏng của một phản ứng sinh hóa do hậu quả của một enzyme bị mất hoạt tính.

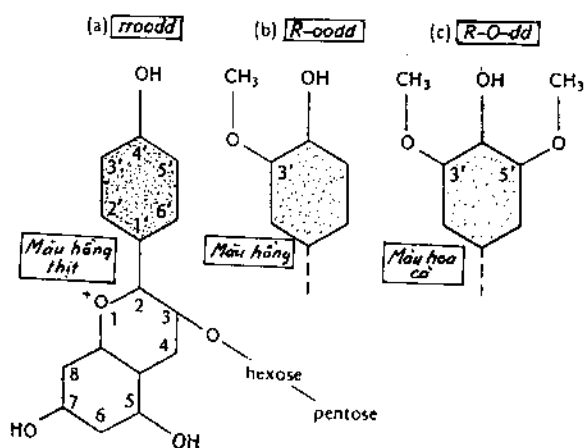


Hình 6.4. Các phản ứng của chu trình phenylalanine và hậu quả các sai hỏng.
Tên các bệnh được đóng khung

2. Sự di truyền màu hoa của *Streptocarpus*

Một ví dụ khác là sự di truyền màu hoa ở *Streptocarpus*. Màu của hoa này có liên quan đến tổng hợp sắc tố anthocyanine (hình 6.5).

Màu hoa	màu hồng thịt (salmon)	màu hồng (rose)	màu hoa cà (mauve)
Kiểu gen	<i>r r o o d d</i> cả 3 gen lặn	<i>R - o o d d</i> 1 gen trội	<i>R - O - d d</i> 2 gen trội



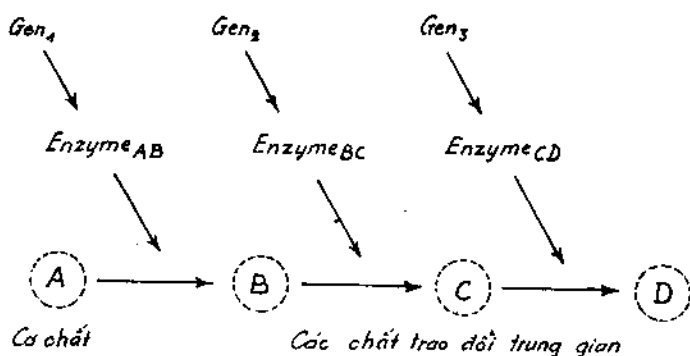
Hình 6.5. Sự tương quan giữa màu hoa với kiểu gen và công thức sắc tố

- Kiểu gen xác định hoa màu hồng thịt.
- Kiểu gen xác định hoa màu hồng.
- Kiểu gen xác định hoa màu hoa cà.

3. Giả thuyết một gen - một enzyme

Năm 1941, Beadle và Tatum đã sử dụng *Neurospora crassa* để chứng minh gen kiểm tra các phản ứng sinh hóa.

Trước hết, chúng ta tìm hiểu nguyên tắc lí thuyết của thí nghiệm. Hãy hình dung một chuỗi các phản ứng sinh tổng hợp : $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$. Sản phẩm cuối cùng là chất D, một nhân tố sinh trưởng cần thiết cho sinh vật, ví dụ, một amino acid (hình 6.6).



Hình 6.6. Sơ đồ về mối liên hệ giữa gen và enzyme
(các phản ứng của chuỗi phản ứng và hậu quả do các đột biến).

Đột biến gen G_1 : sai hỏng phản ứng giữa A và B

Đột biến gen G_2 : sai hỏng phản ứng giữa B và C

Đột biến gen G_3 : sai hỏng phản ứng giữa C và D

Có ba enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp này : E_{AB} xúc tác phản ứng biến A thành B; E_{BC} xúc tác B thành C và E_{CD} biến C thành D. Trong điều kiện bình thường, sự trao đổi chất được điều hòa bằng sản phẩm cuối cùng D. Các sản phẩm trung gian B và C chỉ được tạo thành khi cần thiết, nên khó phát hiện chúng bên trong cũng như bên ngoài tế bào.

Mỗi enzyme có một gen tương ứng xác định di truyền. Đột biến xảy ra ở bất kì gen nào của G_1 , G_2 , G_3 sẽ làm enzyme mất hoạt tính dẫn đến sai hỏng các phản ứng. Đột biến xảy ra ở G_1 sẽ làm ngưng phản ứng từ A $\rightarrow$ B, chất A sẽ được tích tụ, tuy nhiên nếu có chất B nó sẽ được biến thành C rồi D như bình thường. Nói cách khác nếu thêm vào môi trường nuôi B hoặc C hoặc D, sinh vật sống được bình thường. Đột biến G_2 phản ứng B $\rightarrow$ C bị ngưng, nhưng C có thể biến thành D, chất được tích lũy là B, thêm C và D sinh vật sử dụng tốt để sống bình thường. Đột biến G_3 : C không biến thành D, phải bổ sung chất D cho tế bào.

Mốc vàng bánh mì *Neurospora crassa*, loài hoang dại mọc được trên môi trường tối thiểu đơn giản gồm nước, muối khoáng, urê và biotin. Khi mọc trên môi trường tối thiểu dạng hoang dại tổng hợp được tất cả các chất khác cần thiết cho cơ thể như các amino acid, các nucleotide, đường, lipid. Dùng các tia phóng xạ và tử ngoại có thể gây tạo ra các **đột biến sinh hóa** mất khả năng tổng hợp chất này hay chất nọ. Các đột biến này mọc được trên môi trường tối thiểu có bổ sung thêm chất mà đột biến không tổng hợp được. Trong số đó đột biến mất khả năng tổng hợp arginine (*arg-*) nhiều hơn cả. Việc nghiên cứu sâu hơn về các nhu cầu dinh dưỡng của các đột biến *arg-* cho kết quả như sau :

Các đột biến *arg-* và tác dụng của chất bổ sung

Nhóm	Môi trường tối thiểu (MTTT)	MTTT + ornithine	MTTT + citrulline	MTTT + arginine
Hoang dại	+	+	+	+
I	-	+	+	+
II	-	-	+	+
III	-	-	-	+

Trên cơ sở này đã xác định được chu trình arginine như sau :

Glutamic semialdehyde



Ornithine



Citrulline



Arginine

Kết quả này nếu đối chiếu với sơ đồ lí thuyết của hình 6.6 thì nhóm I tương ứng với đột biến G_1 , nhóm II tương ứng với G_2 và nhóm III tương ứng với G_3 .

Các dạng đột biến sinh hóa trên khi lai với loài hoang dại đã cho tỉ lệ phân li của sự di truyền 1 gen. Từ kết quả này giả thuyết **một gen - một enzyme** được nêu lên. Nội dung chủ yếu như sau:

- Trong cơ thể quá trình trao đổi chất thực hiện qua nhiều bước nối tiếp nhau do sự xúc tác của các enzyme.
- Các bước trao đổi chất chịu sự kiểm tra di truyền của các gen xác định hoạt tính enzyme.
- Có mối quan hệ 1 gen - 1 enzyme.

Theo giả thuyết này, gen kiểm soát sự tổng hợp của tất cả enzyme, các nhân tố xúc tác chuỗi phản ứng trao đổi chất. Mỗi gen chỉ kiểm soát một enzyme. Trên thực tế giả thuyết này vượt xa ngoài khuôn khổ của nó. Tất cả enzyme đều là protein, nhưng không phải tất cả protein đều là enzyme. Về sau, nó được chỉnh lại là "một gen - một protein", rồi "**một gen - một polypeptide**".

Giả thuyết “một gen - một enzyme” là điểm tiếp cận của hai bộ môn sinh học : *sinh hóa học* và *di truyền học*. Enzyme là đối tượng chủ yếu của sinh hóa học, cũng như gen là đối tượng hàng đầu của di truyền học. Sự kết hợp này đã đưa di truyền học lên một bước phát triển mới, không những làm sáng tỏ những con đường trao đổi chất trung gian từ gen đến tính trạng mà còn thúc đẩy việc sử dụng các đột biến sinh hóa trong nghiên cứu các quá trình di truyền và các đặc tính sinh học.

III. CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA GEN

Khi nghiên cứu các quy luật di truyền Mendel và học thuyết di truyền nhiễm sắc thể, gen được quan niệm như *một điểm* trên nhiễm sắc thể, vừa là *đơn vị chức năng* xác định một tính trạng, vừa là *đơn vị đột biến*, vừa là *đơn vị tái tổ hợp*. Cùng với sự phát triển của di truyền học, khái niệm về gen được cụ thể hóa thêm, cấu trúc và chức năng của gen được hiểu chi tiết hơn.

1. Sự phân chia nhỏ của gen

Khái niệm locus được đưa ra để chỉ vị trí của gen trên nhiễm sắc thể, là vị trí của tất cả các allele của dãy đa allele. Bản thân hiện tượng đa allele cho thấy gen có cấu tạo phức tạp, sự biến đổi của gen có thể dẫn đến nhiều trạng thái allele khác nhau.

a) Hiện tượng “allele giả”

Theo quan niệm cổ điển gen là đơn vị tái tổ hợp. Nếu cá thể mang hai allele lặn a_1/a_2 của một dãy đa allele sẽ tạo thành hai loại giao tử là a_1 và a_2 , lai phân tích với bố mẹ đồng hợp tử lặn sẽ chỉ cho kiểu hình đột biến a_1 và a_2 , mà không có dạng tái tổ hợp hoang dại. Ví dụ :

$$\begin{array}{ccc} a_1/a_2 & \times & a_1/a_1 \\ \text{Giao tử :} & & a_1 \end{array}$$

Các con lai : a_1/a_1 và a_2/a_1 – cả hai đều kiểu hình đột biến.

Tuy nhiên, trong nhiều thí nghiệm, nếu tăng số cá thể thí nghiệm lên 10.000 hoặc 100.000, người ta phát hiện có dạng kiểu hình hoang dại do *tái tổ hợp*.

Ví dụ : trường hợp locus *Lozenge* (mắt quả trám) ở ruồi giấm, có 18 allele. Khi tăng số cá thể nghiên cứu lên nhiều, phát hiện các allele có thể xếp thành 3 nhóm A, B, C. Các allele của cùng một nhóm, khi lai lẫn nhau, không cho kiểu hình tái tổ hợp hoang dại mắt bình thường, mà chỉ có kiểu hình *Lozenge*. Nhưng lai allele của nhóm này với allele của nhóm khác sẽ có

xuất hiện kiểu hình hoang dại do tái tổ hợp. Hiện tượng này được gọi là *allele giả* (pseudoallele).

Hiện tượng allele giả cho thấy *gen phân chia nhỏ về mặt tái tổ hợp*, có thể xảy ra tái tổ hợp giữa các phần trong gen. Lúc đầu, hiện tượng allele giả được coi là trường hợp ngoại lệ, nhưng khi tăng vọt số cá thể nghiên cứu thì rõ ràng đó là hiện tượng *phổ biến*. Nó được tìm thấy ở nhiều đối tượng khác nhau như ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, bắp, bồ câu, chuột, phage,...

b) Locus *rII* của phage T_4

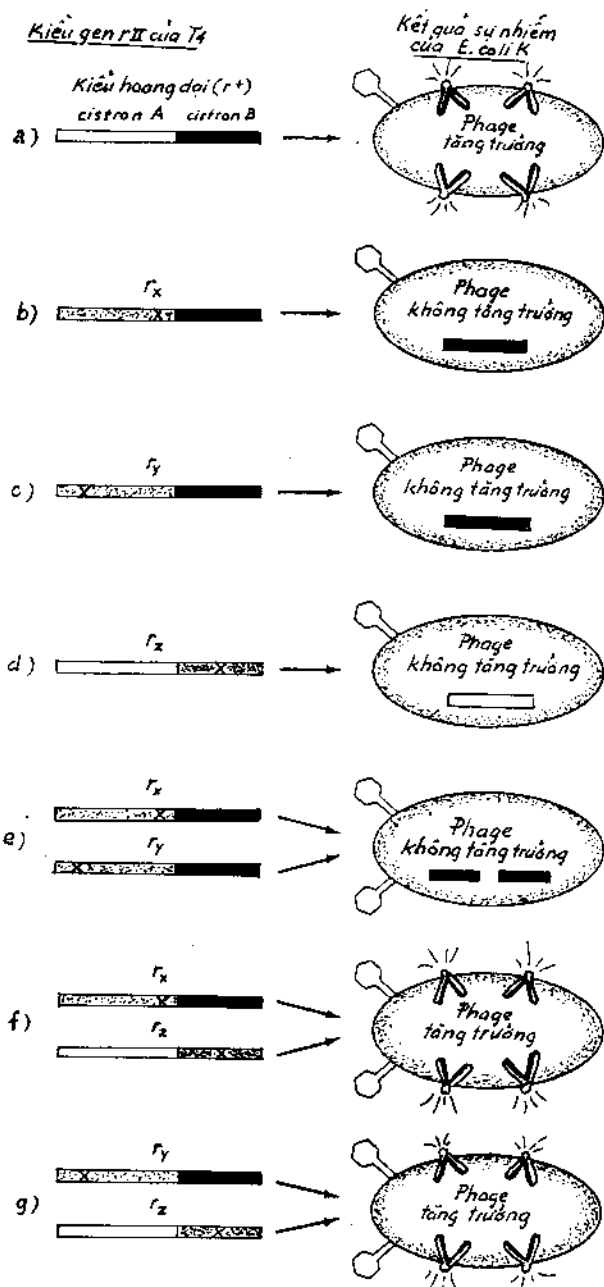
Các nghiên cứu chi tiết về các đột biến *rII* của Phage T_4 làm sáng tỏ hơn về cấu trúc gen. Phage T_4 ở dạng hoang dại r^+ có khả năng nhiễm đồng thời hai nòi *E.coli* B và K. Các đột biến *rII* chỉ nhiễm nòi B nhưng không nhiễm nòi K. S.Benzer (1955) đã nhận được vài nghìn đột biến *rII* có nguồn gốc độc lập với nhau. Ông đã cho lai các đột biến với nhau và căn cứ vào sự xuất hiện các dạng tái tổ hợp hoang dại r^+ mà lập bản đồ các *điểm đột biến* (mutation sites).

Trước thí nghiệm của ông, *rII* được coi là một locus. Thí nghiệm cho thấy các đột biến xếp thành hai nhóm *rIIA* và *rIIB*. Lai các đột biến *rIIA* $\times$ *rIIB* sẽ có r^+ , nhưng lai *rIIA* $\times$ *rIIA* và *rIIB* $\times$ *rIIB* thì kiểu hình đột biến là *r* (hình 6.7).

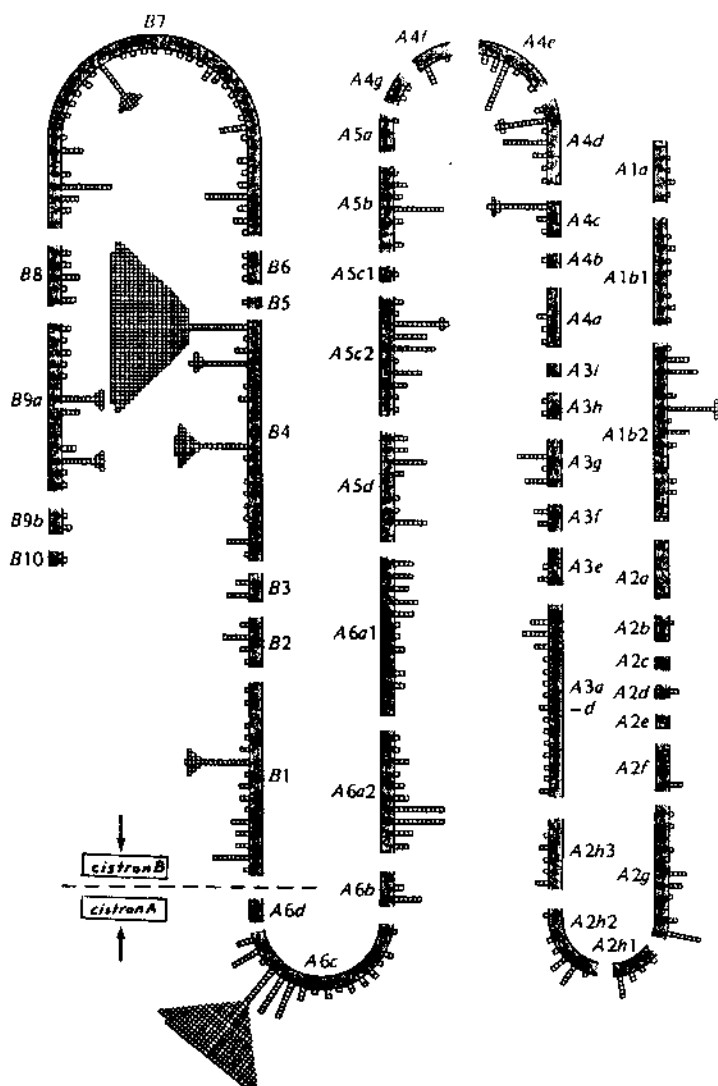
Kết quả thí nghiệm cho thấy, gen có thể *phân chia nhỏ về mặt đột biến*. Các đoạn *rIIA* và *rIIB* được gọi là *cistron*, đơn vị chức năng nhỏ nhất đảm bảo khả năng xâm nhập nòi K. Thuật ngữ cistron thực chất là gen, ngày nay nó chỉ có tính chất lịch sử, ít được dùng. Theo quan niệm hiện nay, *rIIA* và *rIIB* là hai locus. Hai khái niệm mới được nêu ra là *muton* - đơn vị đột biến và *recon* - đơn vị tái tổ hợp.

Đoạn gen nghiên cứu tìm thấy có 2000 điểm đột biến, chúng phân bố không đều nhau, có những điểm "nóng" tập trung nhiều đột biến hơn (hình 6.8). Chiều dài gen khoảng 900 nucleotide. Đơn vị đột biến muton ở đây tương ứng với 900/2000. Số đột biến ghi nhận có thể thấp hơn so với thực tế nên *muton* tương ứng với *một cặp nucleotide*. Giống như vậy *recon* có thể tương ứng với *một cặp nucleotide*.

Tóm lại, *gen là đơn vị chức năng*, có thể chia nhỏ bởi các đơn vị đột biến và tái tổ hợp.



Hình 6.7. Lai các đột biến rIIA và rIIB



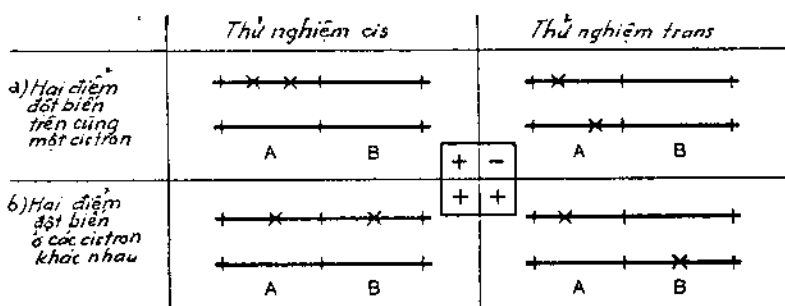
Hình 6.8. Bản đồ các đột biến ở locus *rII*

2. Thử nghiệm chức năng allele

Muốn nghiên cứu cấu trúc bên trong một gen, phải tìm hiểu nhiều allele của gen đó. Nhiều đột biến có kiểu hình giống nhau nhưng không allele với nhau. **Thử nghiệm chức năng allele** (functional test of allelism) được sử dụng để xác định xem hai đột biến có allele với nhau không. Đây chính là thử nghiệm mà Benzer dùng để lập bản đồ locus *rII*.

Thử nghiệm này còn được gọi là **thử nghiệm bổ sung** (complementary) vì nó cho biết sai hỏng chức năng ở hai đột biến có bổ sung tức bù trừ cho nhau được không. Hotchkis đã giải thích nội dung thử nghiệm này bằng một ví dụ rất súc tích : “ Từ hai chiếc xe hơi hỏng có thể ráp thành một chiếc tốt nếu một xe bị bể bánh và xe kia hư máy nổ, công việc cần làm chỉ là thay thế bánh hay máy nổ từ xe nọ sang xe kia. Nhưng nếu cả hai đều cùng bị hư máy nổ thì rõ ràng không có cách nào thay thế được.”

Phương pháp thử này còn được gọi là **thử nghiệm đều lệch** (cis - trans test). Sở dĩ như vậy vì phép thử nghiệm này so sánh hiệu quả kiểu hình (phenotype) của các gen đột biến ở hai vị trí khác nhau trên nhiễm sắc thể tương đồng. Ở vị trí lệch (trans) các đột biến nằm trên hai nhiễm sắc thể. Hình 6.9 mô tả nguyên tắc thử nghiệm.



Hình 6.9. Thử nghiệm chức năng allele

- a) Sai hỏng cùng 1 gen không bù đắp được, có kiểu hình đột biến.
b) Sai hỏng khác gen nên bù trừ được cho nhau, có kiểu hình hoang dại.

Trường hợp b sai hỏng ở hai gen khác nhau nên bổ sung được, còn trường hợp a sai hỏng ở cùng một gen nên không bù đắp được dẫn đến kiểu hình đột biến.

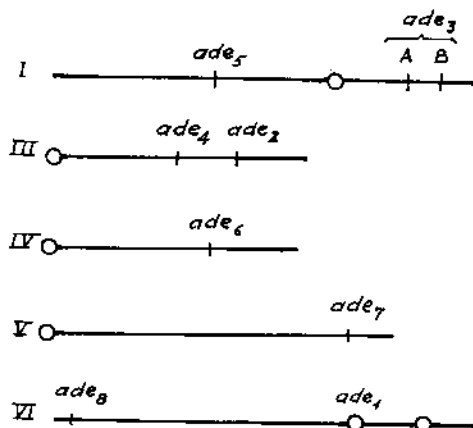
3. Gen là đơn vị chức năng nhỏ nhất

Thử nghiệm chức năng allele có thể thực hiện được dễ dàng trên các đối tượng vi sinh vật với các đột biến sinh hóa, thường là các **đột biến khuyết dưỡng** (mất khả năng tổng hợp chất này hay chất nọ). Ví dụ, ở *Neurospora crassa* có nhiều đột biến mất khả năng tổng hợp adenine (Ade^-). Các đột biến này dễ phát hiện vì có khuẩn lạc màu đỏ. Có hai đột biến Ade_x và Ade_y , nếu di hợp tử Ade_x/Ade_y có kiểu hình đột biến tức cho khuẩn lạc màu đỏ thì Ade_x và Ade_y là hai allele của một gen. Thử nghiệm chức năng allele cho thấy các đột biến Ade ở *Neurospora crassa* tạo thành 9 nhóm.

Như vậy có 9 gen tổng hợp adenine ở nấm này : ade_1 , ade_2 , ade_3 ,... Riêng ade_3 có hai locus nằm kế sát nhau là ade_{3A} và ade_{3B} . Hình 6.10

mô tả vị trí của gen tổng hợp adenine trên các nhiễm sắc thể của nấm mốc *Neurospora crassa*.

Ở các nhiễm sắc thể I, III và VI, các gen *ade* liên kết với nhau.



Hình 6.10. Các gen adenine trên các nhiễm sắc thể I, III, IV, V, VI của *Neurospora crassa*.

Qua nghiên cứu các gen tổng hợp adenine chúng ta thấy quá trình tổng hợp adenine có liên quan đến 9 nhóm đột biến của gen này hay gen nọ, có chung hậu quả là mất khả năng tổng hợp adenine. Như vậy khái niệm gen không chỉ kiểm tra di truyền cả chu trình tổng hợp adenine, mà gen là **đơn vị chức năng nhỏ nhất**, kiểm tra một giai đoạn cơ sở nào đó của chu trình. Biến đổi di truyền làm sai hỏng chức năng đó dẫn đến đột biến mất khả năng tổng hợp adenine.

IV. HỌC THUYẾT TRUNG TÂM

1. Sự xác định di truyền cấu trúc bậc I của protein

Như trên đã nêu, cấu trúc không gian của mạch polypeptide được xác định một cách tự động bởi trình tự sắp xếp của các amino acid tức cấu trúc bậc I. Như vậy, rõ ràng tuy có nhiều mức cấu trúc không gian khác nhau, nhưng cấu trúc bậc I tức trình tự sắp xếp các amino acid chi phối toàn bộ các mức cấu trúc khác. Việc **xác định di truyền** phân tử protein ở trạng thái tự nhiên có đầy đủ hoạt tính sinh học chỉ quy tụ lại chủ yếu ở **xác định cấu trúc bậc I** là đủ.

2. Các enzyme mất hoạt tính do đột biến

Nhiều quan sát cho thấy việc mất hoạt tính enzyme không do vắng mặt hoàn toàn của bản thân enzyme, mà chỉ do biến đổi trên phân tử

(modification). Có trường hợp, đột biến dẫn đến thay đổi tính vi : enzyme vẫn có hoạt tính nhưng sẽ biểu hiện khác nếu thay đổi điều kiện. Ở *Neurospora crassa*, enzyme tyrosinase do gen *T* xác định, nó xúc tác phản ứng biến tyrosine thành dihydroxyphenylalanine. Allele *T⁺* của dòng hoang dại tạo tyrosinase có hoạt tính ở nhiệt độ bình thường và cả ở 60°C. Một đột biến *T^s* tạo tyrosine có hoạt tính ở nhiệt độ bình thường, nhưng mất hoạt tính ở 60°C.

Trường hợp khác cũng ở *Neurospora crassa* là đột biến làm enzyme mất hoạt tính, nhưng phản ứng kháng nguyên - kháng thể của enzyme vẫn còn. Enzyme tryptophan synthetase (viết tắt Trtase) thực hiện phản ứng cuối cùng của sinh tổng hợp tryptophan. Chiết tách enzyme của dạng hoang dại tiêm cho thỏ, trong thỏ xuất hiện kháng thể. Kháng thể sẽ kết hợp với kháng nguyên (protein) rất đặc trưng. Nhiều enzyme Trtase của các đột biến ở gen *trp3* được nghiên cứu phản ứng kháng thể. Kết quả cho thấy enzyme mất hoạt tính, nhưng vẫn có phản ứng với kháng thể. Chứng tỏ protein của enzyme vẫn còn.

Như vậy, trong đa số trường hợp, đột biến của một gen không làm biến mất enzyme mà chỉ biến đổi cấu trúc dẫn đến thay đổi hoạt tính. Các đột biến của cùng một gen có thể gây những biến đổi khác nhau trên enzyme. Các sự kiện đó chứng tỏ rằng cấu trúc của enzyme chịu sự kiểm soát trực tiếp của gen.

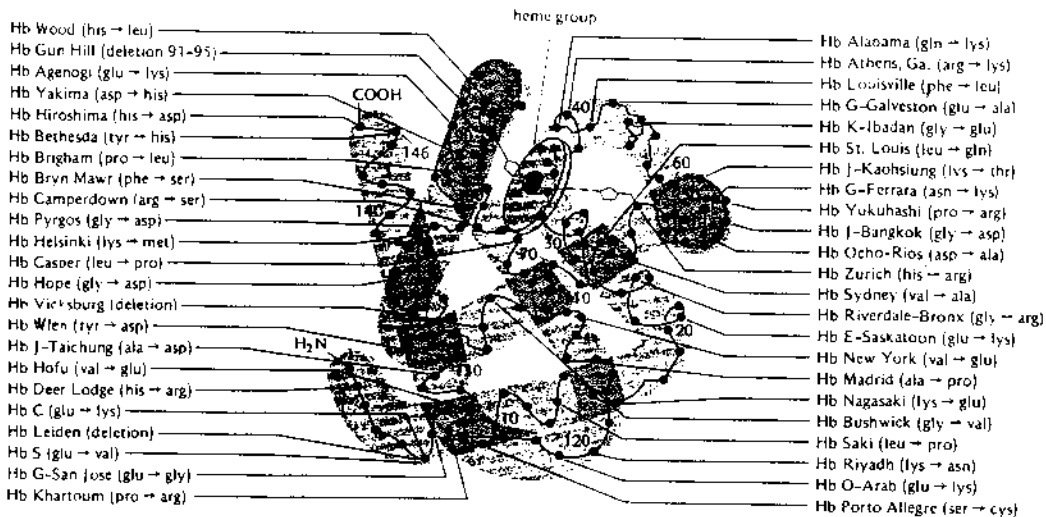
3. Bản chất các biến đổi di truyền của protein

Việc nghiên cứu các hemoglobine liên quan đến bệnh thiếu máu đã đóng vai trò quan trọng làm sáng tỏ mối quan hệ gen - protein. Hemoglobine của người lớn là một protein phức tạp gồm 2 mạch α và 2 mạch β hợp thành. Các nghiên cứu cho thấy, nhiều bệnh di truyền liên quan đến cấu trúc bất thường của phân tử protein. Ở các hemoglobine bất thường có sự thay thế một amino acid này bằng một amino acid khác. Sự thay đổi ở một amino acid xảy ra cả ở mạch α lẫn β . Sau đây là một số ví dụ về các đột biến với những thay đổi tương ứng của các amino acid.

	mạch α							
	1	2	16	57	58	68	116	141
	Val	Leu	Lis	Gli	His	Asp	Glu	Arg
Hb I			Asp					
Hb Norfolk				Asp				
HbM Boston					Tyr			
HbP Philadelphie						Lis		
Hb O Indonesie							Lis	

mạch β

	1	2	3	6	26	67	121	146
	Val	His	Leu	Glu	Glu	Val	Glu	His
Hb S				Val				
Hb C				Lis				
Hb E					Lis			
HbM Milwaukee						Glu		
Hb O Arabia							Lis	



Hình 6.11. Sơ đồ cấu trúc phân tử hemoglobine ở người với các đột biến do thay thế amino acid.

Các số chỉ vị trí các amino acid, tương ứng với các biến đổi đột biến (dường gạch nối).

Khoảng 200 đột biến hemoglobine được phát hiện (tên gọi nơi phát hiện).

Trên hình chỉ nêu một số điển hình.

Trong sự di truyền của hemoglobine có 2 gen tham gia, một liên quan đến biến đổi của mạch α , cái kia với mạch β . Các nghiên cứu trên cho thấy, các đột biến của gen xác định cấu trúc protein thường chỉ làm thay đổi một amino acid.

4. Sự tương quan đồng tuyến tính gen - polypeptide

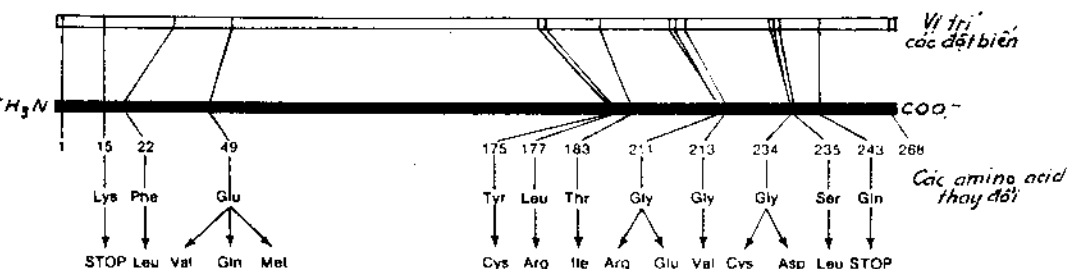
Vào năm 1953, Crick nêu giả thuyết, rằng DNA xác định trình tự amino acid trong mạch polypeptide và khi trình tự đó được xác định thì cấu trúc không gian ba chiều của protein cũng được xác định. Cơ sở cho mối quan hệ đó giữa gen và mạch polypeptide là cả hai đều có cấu trúc thẳng : một bên là trình tự các nucleotide, còn bên kia là trình tự của các amino acid. Nếu giả thuyết đúng, cả hai trình tự đó phải như sau :

- Thứ tự theo đường thẳng của các nucleotide sẽ xác định trình tự amino acid đặc trưng (mỗi quan hệ này do mã di truyền).

- Những thay đổi đột biến trong thứ tự nucleotide sẽ gây nên biến đổi ở vị trí tương ứng của trình tự amino acid.

Như vậy, các trình tự của nucleotide và amino acid sẽ có sự tương quan **đồng tuyến tính** (colinearity). Ví dụ : trong gen có biến đổi theo thứ tự A, B, C, D, trên mạch polypeptide tương ứng có thay đổi theo cùng trình tự a, b, c, d.

Nhiều ví dụ đã được nêu ra như biến đổi gen của protein vỏ của virus đốm thuốc lá, của gen kiểm soát enzyme tryptophan synthetase ở *E. coli* (hình 6.12).



Hình 6.12. Sự tương quan đồng tuyến tính giữa gen và enzyme tryptophan synthetase ở *E. coli*.

(Phía trên các biến đổi di truyền tương ứng với các thay đổi amino acid phía dưới).

Tổng hợp các sự kiện được nêu trên, rõ ràng gen xác định cấu trúc bậc I của protein.

5. Học thuyết trung tâm của sinh học phân tử

Tổng hợp protein trong tế bào có các đặc điểm sau :

– Các phân tử thông tin như nucleic acid và protein được *tổng hợp theo khuôn*. Tổng hợp theo khuôn vừa chính xác, vừa ít tốn enzyme.

Căn cứ hàng loạt tính chất hóa học các protein không thể làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp chính chúng. Vậy *khuôn để tổng hợp nên protein không phải là protein.*

- Sinh tổng hợp protein *tách rời về không gian* với chỗ chứa DNA. Nhiều quan sát cho thấy tổng hợp protein có thể xảy ra khi không có mặt DNA. Sự kiện này biểu hiện rõ ràng nhất ở những tế bào có nhân *Eukaryotae*. Trong những tế bào này hầu như toàn bộ *DNA* tập trung ở nhân sắc thể nằm *trong nhân*, còn *tổng hợp protein* chủ yếu diễn ra ở *tế bào chất*. Tảo xanh đơn bào *Acetabularia* khi bị cắt mất phần chứa nhân vẫn tổng hợp được protein và sống vài tháng nhưng mất khả năng sinh sản. Rõ

ràng, nơi chứa DNA mang thông tin di truyền và chỗ sinh tổng hợp protein tách rời nhau về không gian.

– DNA cũng *không phải là khuôn trực tiếp* để tổng hợp protein, do đó phải có *chất trung gian* chuyển thông tin từ DNA ra tế bào chất và làm khuôn để tổng hợp protein. Chất đó phải có cả trong nhân và tế bào chất với số lượng phụ thuộc mức độ tổng hợp protein.

– Chất trung gian đó chính là **RNA** qua các sự kiện sau :

+ Thứ nhất, RNA được *tổng hợp* ngay ở *trong nhân* có chứa DNA, sau đó nó đi vào tế bào chất cho tổng hợp protein.

+ Thứ hai, những tế bào giàu RNA tổng hợp protein nhiều hơn. Ví dụ: Các tế bào tổng hợp nhiều protein như ở gan, lá lách, tuyến tụy của tằm chứa RNA nhiều hơn so với tế bào ít tổng hợp protein như ở thận, tim, phổi.

+ Thứ ba, về phương diện hóa học **RNA giống DNA** : mạch polynucleotide thẳng cũng chứa 4 loại ribonucleotide A, G, C và uracil (U). Nó có thể nhận được thông tin từ DNA qua bất cặp bổ sung.

Trong tế bào không tìm thấy chất nào khác ngoài RNA có thể đóng vai trò trung gian cho tổng hợp protein. Mỗi quan hệ được biểu hiện như sau:



sao chép phiên mã dịch mã

Đây còn gọi là *học thuyết trung tâm* hay *tiền đề cơ sở của sinh học phân tử*, được F.Crick nêu ra từ năm 1956 đến nay căn bản vẫn đúng.

Thông tin di truyền được đi từ DNA qua RNA rồi đến protein. Vào những năm 70 đã phát hiện quá trình *phiên mã ngược* từ RNA tổng hợp nên DNA nhờ enzyme *reverse transcriptase*. Thông tin không thể đi theo chiều ngược từ protein đến RNA.

6. DNA và mã di truyền (*The genetic code*)

Chúng ta đã biết có sự liên quan đồng tuyến tính giữa DNA và phân tử protein, từ đó dễ dàng dự đoán rằng trình tự đặc hiệu của các amino acid trên phân tử protein sẽ được *mã hóa bằng nhóm các nucleotide* trên phân tử DNA. Có tất cả 4 loại base, nếu các base có nhóm đôi tức hai cái mã hóa cho một loại amino acid thì tất cả chỉ có 16 tổ hợp, không đủ cho 20 loại amino acid. Như đơn vị mã hóa hay còn gọi là **Codon** phải gồm 3 hay nhiều nucleotide hơn.

Năm 1961 F.Crick đã làm thí nghiệm chứng minh rằng **nhóm nucleotide mã hóa có 3** hay nói cách khác codon gồm 3 nucleotide. Tất cả sẽ có $4^3 = 64$ tổ hợp codon.

Vấn đề tiếp theo là xác định chính xác các codon nào mã hóa cho từng amino acid. M.W.Nirenberg và H.Matthaei (Mi) đã dùng enzyme theo phương pháp của Ochoa **tổng hợp RNA nhân tạo**. Khi dùng chỉ một loại nucleotide là **uracil** sẽ nhận được RNA là **polyuracil**, nếu chỉ adenine sẽ được polyadenine.

Năm 1961, khi dùng **polyuracil** thay cho mRNA để tổng hợp protein trong hệ thống vô bào (có amino acid, enzyme tổng hợp protein, nhưng không có DNA...) sản phẩm nhận được là mạch polypeptide **polyphenylalanine** chỉ chứa một loại amino acid là **phenylalanine**. Điều đó chứng tỏ **codon UUU** mã hóa cho **phenylalanine**. Đây là codon đầu tiên được xác định. Nirenberg và Matthaei cũng chứng minh được rằng **AAA** mã hóa cho **lysine**, **GGG** cho **glycine** và **CCC** cho **proline**.

Vào năm 1964, H.G.Khorana tìm ra phương pháp tạo **mRNA tổng hợp nhân tạo** với trình tự lặp lại (như AAG AAG AAG...) và nhờ nó giải quyết xong các vấn đề còn chưa rõ.

Bảng mã di truyền cho thấy trong 64 codon, có 3 codon **UAA, UAG, UGA** không mã hóa cho amino acid được gọi là **vô nghĩa** (non-sense), đồng thời là **codon kết thúc** (termination) tức "dấu chấm câu", tức chấm dứt mạch polypeptide.

Mã di truyền có tính "**suy thoái**" (degeneration) tức một amino acid có nhiều codon mã hóa, chỉ trừ methionine và tryptophane chỉ có một codon. Các codon đồng nghĩa tức mã hóa cho cùng một amino acid thường có hai base đầu tiên giống nhau, nhưng khác nhau ở cái thứ ba. Ví dụ: CCU, CCC, CCA và CCG tất cả đều mã hóa cho proline. Trên thực tế, U và C luôn luôn tương đương nhau ở vị trí thứ ba, còn A và G tương đương nhau trong 14 trên 16 trường hợp.

Trừ một số ngoại lệ nhỏ, mã di truyền có **tính vạn năng** (universel) tức toàn bộ thế giới sinh vật có chung bộ mã di truyền.

Bảng mã di truyền được tóm tắt như hình 6.13.

Vị trí thứ nhất (đầu 5')	Vị trí thứ hai	Vị trí thứ ba (đầu 3')			
		U	C	A	G
U	U	UUU Phenylalanine	UUC	UUA Leucine	UUG
	C	UCU	UCC Serine	UCA	UCG
	A	UAU Tyrosine	UAC	UAA kết thúc	UAG
	G	UGU Cysteine	UGC	UGA	UGG Tryptophane
C	U	CUU	CUC Leucine	CUA	CUG
	C	CCU	CCC Proline	CCA	CCG
	A	CAU Histidine	CAC	CAA Glutamine	CAG
	G	CGU	CGC Arginine	CGA	CGG
A	U	AUU Isoleucine	AUC	AUA	AUG Methionine
	C	ACU	ACC Threonine	ACA	ACG
	A	AAU	AAC Asparagine	AAA	AAG
	G	AGU Serine	AGC	AGA Arginine	AGG
G	U	GUU	GUC Valine	GUA	GUG
	C	GCU	GCC Alanine	GCA	GCG
	A	GAU Asparagine	GAC	GAA Glutamine	GAG
	G	GGU	GGC Glycine	GGA	GGG

Hình 6.13. Bảng mã di truyền gồm 64 codon

V. QUÁ TRÌNH PHIÊN MÃ (TRANSCRIPTION)

1. Nguyên tắc chung

Quá trình chuyển thông tin di truyền từ DNA sang RNA được gọi là sự phiên mã. RNA được tổng hợp nhờ hệ enzyme RNA polymerase, đúng ra tên gọi chính xác là *RNA polymerase phụ thuộc DNA* (DNA-dependent-RNA polymerase). Ở đây DNA còn thể hiện một tính chất kì lạ là *khả năng dị xúc tác (heterocatalysis)* tức làm khuôn để tổng hợp nên một phân tử khác. Điều này thực hiện được nhờ enzyme RNA polymerase và các ribonucleotide, đặc biệt là uracil.

Sự phiên mã thực hiện theo các nguyên tắc :

- Chỉ *một* trong hai mạch của phân tử DNA được dùng làm *khuôn* để tổng hợp RNA.

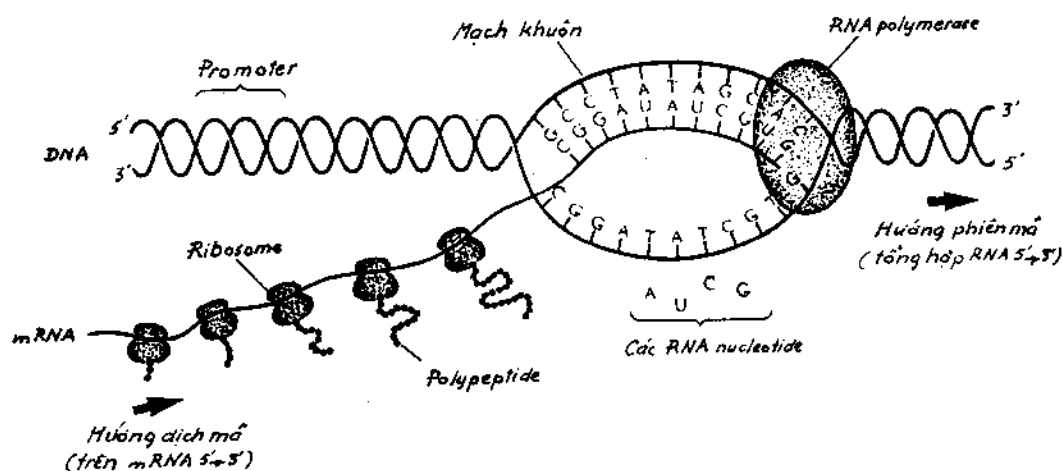
- RNA polymerase bám vào DNA làm tách mạch và di chuyển theo hướng $3' \rightarrow 5'$ trên DNA để cho *mRNA được tổng hợp theo hướng $5' \rightarrow 3'$*

2. Sự phiên mã ở *Prokaryotae*

Ở *Prokaryotae* sự phiên mã có các đặc điểm :

- Chỉ *một loại RNA polymerase* chịu trách nhiệm tổng hợp *tất cả các loại RNA*.

- mRNA thường chứa *thông tin nhiều gen* nối tiếp nhau (polycistronic mRNA).



Hình 6.14. Phiên mã ở *Prokaryotae*

Quá trình tổng hợp mRNA được tiến hành khi RNA polymerase bám vào **đoạn khởi động (promoter)**. Promoter ở *E.coli* được đọc từ 5' → 3' ở trên mạch bổ sung (hình 6.14). RNA polymerase nhận biết cả hai đoạn trên và đủ lớn để gắn đồng thời vào cả hai. Khi gắn vào rồi, polymerase không tổng hợp mRNA ngay. Thay vào đó, sự tổng hợp bắt đầu từ **điểm xuất phát (start signal)** thường là **CAT** nằm cách khoảng 7 base phía sau chỗ bám về phía đầu 3' của mạch bổ sung.

Ở phần lớn *Prokaryotae* quá trình tổng hợp tiếp tục đến khi đọc qua **dấu kết thúc (termination signal)**. Khi polymerase kết thúc phiên mã nó và mRNA tách rời khỏi DNA.

3. Phiên mã ở *Eukaryotae* và chế biến mRNA

Phiên mã ở *Eukaryotae* có các đặc điểm sau :

- RNA polymerase II chịu trách nhiệm **tổng hợp mRNA** còn hai RNA-polymerase khác tổng hợp rRNA của ribosome và các loại RNA khác.

- mRNA chứa **thông tin của 1 gen** (monocistronic mRNA).

- Quá trình **phiên mã phức tạp hơn** nhiều. Ở đầu 5' của mRNA có gắn thêm một "**chóp**" (tiếng Anh là **cap** có nghĩa chóp hay chụp đèn) là 7-methylguanosine, còn cuối mRNA phía 3' có thêm "**đuôi**" **polyadenine dài 100-200 adenine**.

- Đặc biệt là **bản phiên mã đầu tiên (primary transcript)** còn gọi là **tiền mRNA (pre-messenger mRNA)** chưa được sử dụng trực tiếp mà phải qua quá trình **chế biến**.

a) Các gen gián đoạn

Từ năm 1977 người ta phát hiện nhiều gen của *Eukaryotae* có tính **gián đoạn** (hình 6.15). Trên gen các **đoạn mã hóa cho protein** được gọi là **exon** xen kẽ với các **đoạn không mã hóa** được gọi là **intron**. Bản phiên mã đầu tiên tức **tiền m-RNA** chứa cả trình tự của các exon và các intron. Tiếp theo **các intron** tức các đoạn không mã hóa cho protein **được cắt rời ra**, còn **các exon** mã hóa cho protein **được nối liền lại** với nhau. Quá trình chế biến tiền mRNA tạo **RNA trưởng thành** (chỉ gồm các đoạn exon), tức cắt intron, gắn exon lại với nhau được gọi là **splicing**. Các intron tuy không mã hóa cho protein nhưng chúng có vai trò quan trọng đối với chức năng của mRNA.

b) Diễn biến phiên mã

Chi tiết của quá trình phiên mã ở *Eukaryotae* được mô tả trên hình 6.15. Tương ứng với sơ đồ có 3 giai đoạn :

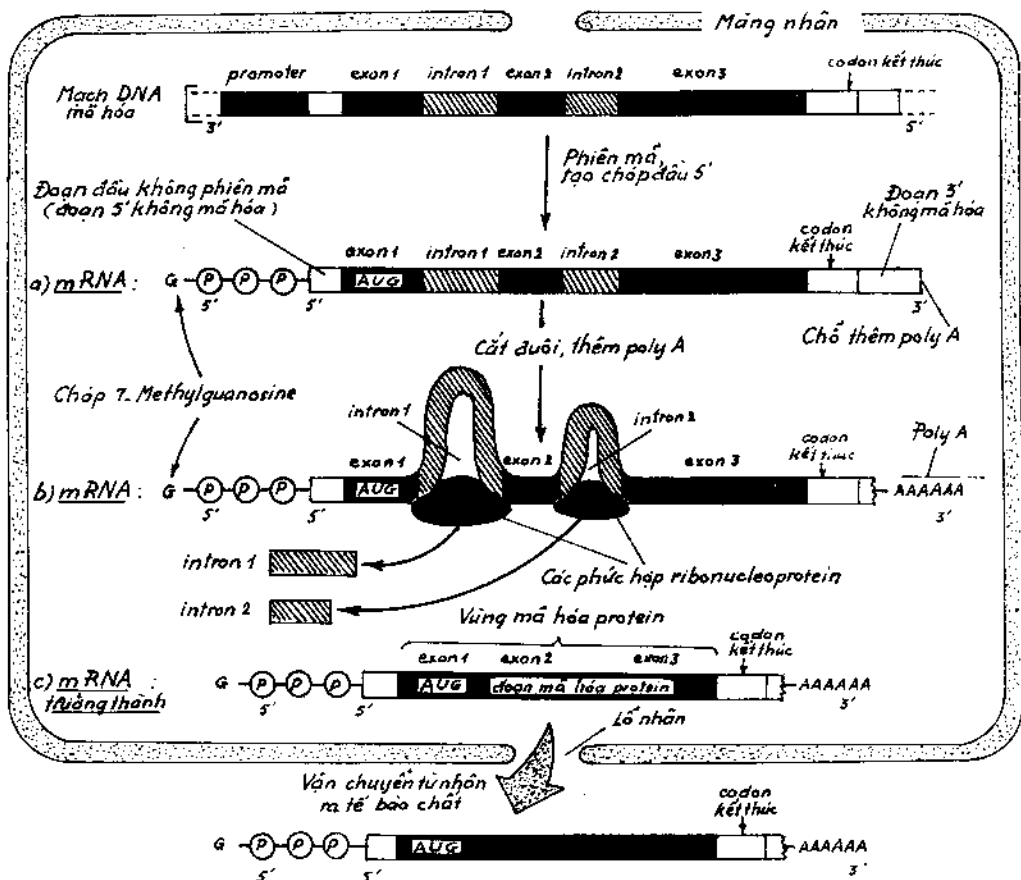
- **Gắn chóp** : Khi mạch $mRNA$ đang được tạo ra dài độ 20 - 30 nucleotide thì ở đầu $5'P$ enzyme nối thêm vào chất **7-methyl-guanylate**. **Chóp** này gắn vào đầu $5'P$ một cách đặc biệt là tạo liên kết $5'P-5'P$.

Bản phiên mã đầu tiên là **tiền $mRNA$** chứa đủ trình tự nucleotide của gen, cả các đoạn intron (h.6.15a).

- **Thêm đuôi poly-A** : Một đoạn ngắn của mRNA bị cắt và các adenin được nối vào thành **đuôi polyadenin** (h.6.15b).
- **Splicing** : Cắt rời các intron và nối các exon lại với nhau. Quá trình được thực hiện nhờ các **phức hợp ribonucleoprotein** (snRNP) của nhân tế bào tạo cấu trúc không gian thuận tiện cho các đầu exon gần nhau và **xúc tác phản ứng cắt nối** (h.6.15c).

Sau splicing, mRNA mới **trưởng thành** (mature $mRNA$) không còn các intron và qua lỗ nhân vào tế bào chất để dịch mã.

Mặc dù đa phần $mRNA$ của *Eukaryotae* cần gắn chóp, đuôi và splicing, nhưng không phải tất cả chúng đều được chế biến như vậy.



Hình 6.15. Phiên mã gen gián đoạn ở *Eukaryotae*

VI. CÁC RNA VÀ VAI TRÒ CỦA CHÚNG

Các RNA giữ vai trò trung gian quan trọng trong sinh tổng hợp protein. Tất cả chúng đều được *tổng hợp từ các gen* tương ứng trên DNA và có những đặc điểm chung :

- mạch polynucleotide đơn,
- đường pentose (5C) là ribose,
- ngoài A, G, C thì uracil (U) thay cho thymine.

RNA gồm có các loại như sau:

- mRNA (messenger RNA) - RNA thông tin.
- rRNA (ribosomal RNA) - RNA ribosome.
- tRNA (transfer RNA) - RNA vận chuyển.
- pre - rRNA (tiền rRNA ribosome) là RNA được tổng hợp từ DNA, sau splicing trở thành rRNA.
- pre - tRNA (tiền tRNA vận chuyển) là RNA được tổng hợp từ DNA, sau splicing trở thành tRNA
- hn RNA (heterogenous nuclear RNA) là RNA không đồng nhất ở nhân tế bào.
- sn RNA (small nuclear RNA) - RNA nhỏ ở nhân.
- sc RNA (small cytoplasmic RNAs) - RNA nhỏ tế bào chất.

Hầu hết các RNA đều có vai trò nhất định trong bộ máy tổng hợp protein, nhưng chủ yếu là rRNA, tRNA và mRNA.

RNA có thể ở dạng tự do hoặc gắn với protein thành các phức hợp nucleoprotein giữ nhiều vai trò quan trọng trong hoạt động sống của tế bào.

1. rRNA ribosome

rRNA là thành phần cấu tạo, chiếm phân nửa khối lượng của ribosome. Tế bào có số lượng lớn ribosome nên rRNA *chiếm tỉ lệ cao*, có thể đến 75% của tổng RNA.

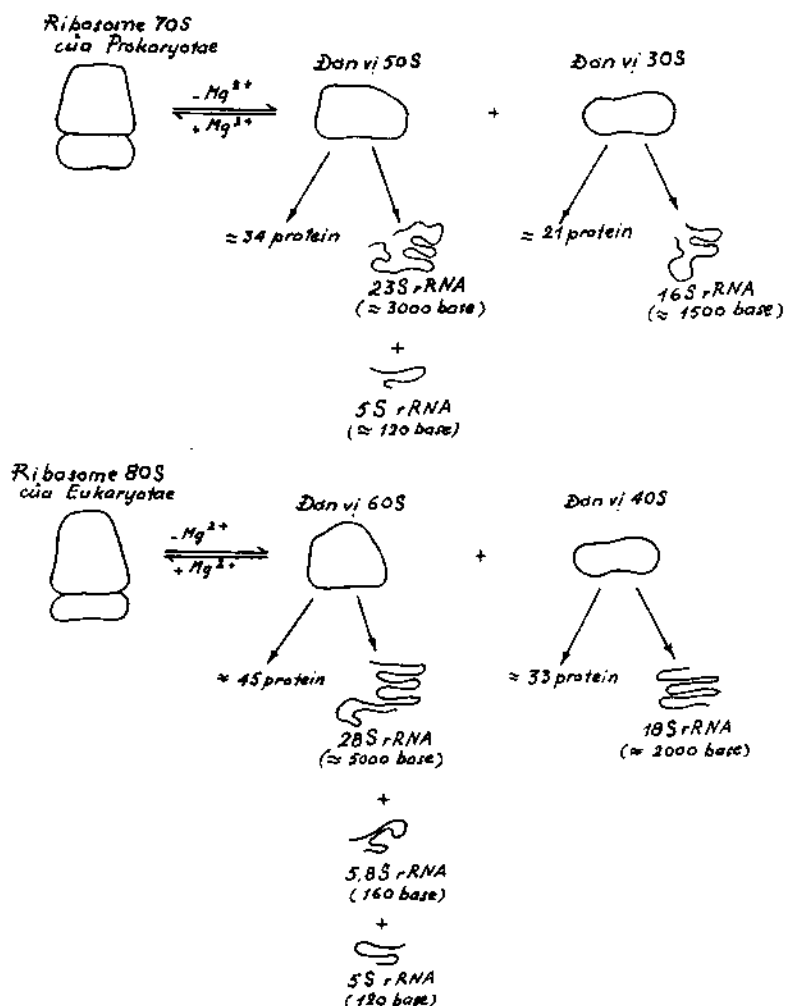
Các ribosome của lục lạp, ti thể ở *Prokaryotae* có hệ số lắng khi li tâm là 70S, gồm 2 đơn vị:

- đơn vị lớn 50 S có 1 rRNA 23S và 1 rRNA 5S,
- đơn vị nhỏ 30S chỉ có 1 rRNA 16S.

Các ribosome của *Eukaryotae* có hệ số lắng khi li tâm là 80S, gồm 2 đơn vị :

- đơn vị lớn 60 S có 1 rRNA 28S, 1 rRNA 5,8S và 1 rRNA 5S,
- đơn vị nhỏ 40S chỉ có 1 rRNA 18S.

Số lượng các nucleotide của mỗi loại rRNA hầu như đã biết (hình 6.16).



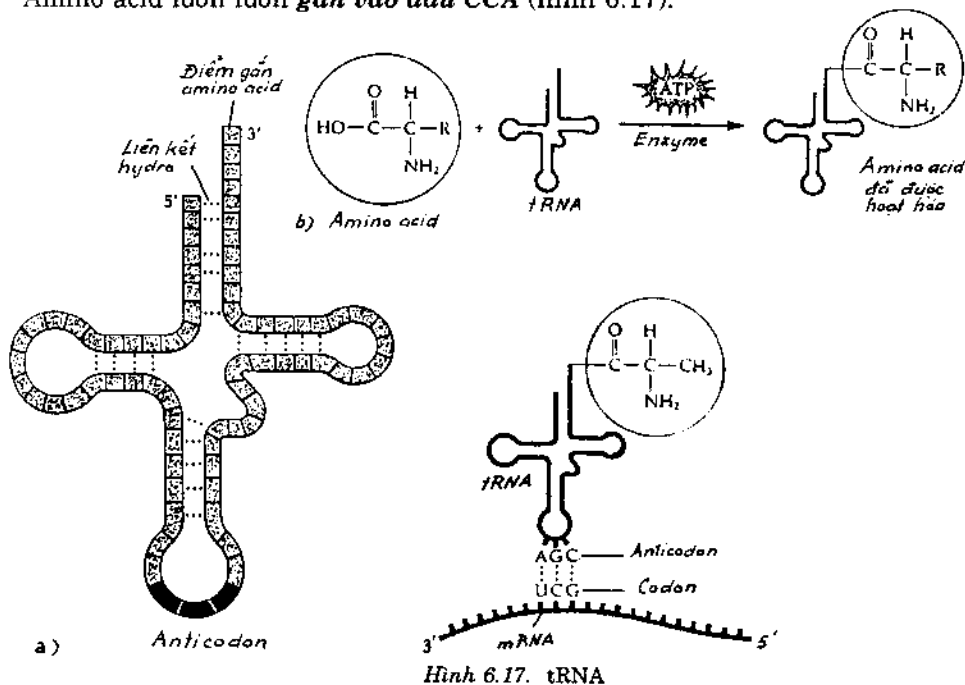
Hình 6.16. Thành phần của ribosome 70S và 80S

2. Các tRNA vận chuyển (transfer RNA)

Năm 1955, F.Crick nêu ra giả thuyết về **chất nối** (adapteur) cho rằng trước khi gắn thành polypeptide các amino acid phải gắn qua chất trung gian, chất này sẽ bắt cặp đặc hiệu với các base trên mRNA. Vào năm 1957,

M.Hoagland và các cộng sự tìm ra *tRNA vận chuyển* (transfer) và chứng minh rằng mỗi phân tử *tRNA* gắn với một phân tử amino acid và mang đến *ribosome*.

Hiện nay biết rằng ít nhất *mỗi loại tRNA đặc hiệu cho 1 loại amino acid*. Ví dụ: arginine chỉ gắn đặc hiệu với tRNA vận chuyển arginine. Tuy nhiên tất cả các tRNA có một số đặc tính cấu trúc chung: chiều dài khoảng 73 đến 93 nucleotide, cấu trúc gồm một mạch cuộn lại như *hình lá chẻ ba* nhờ bắt cặp bên trong phân tử, và đầu mút 3' có trình tự kết thúc CCA. Amino acid luôn luôn *gắn vào đầu CCA* (hình 6.17).



Hình 6.17. tRNA

Các enzyme đặc hiệu là *aminoacyl tRNA synthetase* gắn mỗi amino acid với tRNA tương ứng. Mỗi enzyme đặc hiệu cho một loại amino acid riêng biệt và xúc tác phản ứng gắn với tRNA của nó nhờ *năng lượng ATP* tạo ra *aminoacyl tRNA*. Phức hợp *aminoacyl tRNA* đến ribosome gắn với mRNA. tRNA gắn với mRNA bằng *bắt cặp bổ sung nhờ đối mã anticodon*.

Chúng ta đã biết rằng mỗi amino acid có một codon là trình tự 3 nucleotide trên mRNA. Mỗi tRNA có ở vị trí nhô ra một bộ ba không bắt cặp của các base gọi là *anticodon* (đối mã), mà bộ ba này *bổ sung với trình tự codon trên mRNA* tương ứng với một amino acid đặc hiệu. Ví dụ, codon của mRNA là CCG mã hóa cho proline. Một kiểu tRNA cho proline có trình tự đối mã anticodon là GGC. Khi phân tử tRNA có mang proline đến ribosome bộ ba GGC anticodon của nó sẽ bắt cặp với mRNA ở bộ ba CCG.

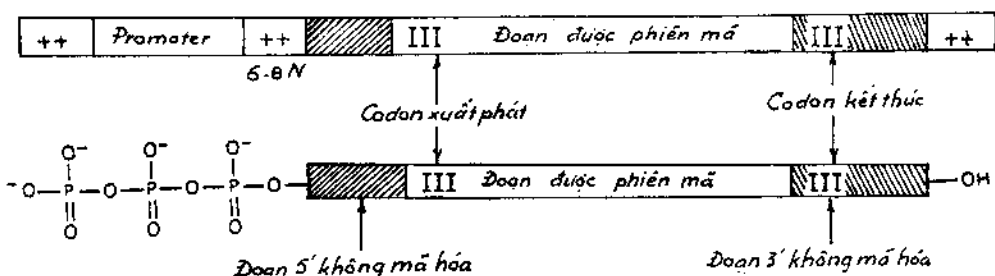
3. mRNA thông tin và thời gian tồn tại của chúng

mRNA nguyên vẹn của tế bào vi khuẩn và cả *Eukaryotae* chứa *trình tự nucleotide nhiều hơn số dùng mã hóa protein*.

DNA polymerase *khởi sự phiên mã* ở một đoạn nằm ngay *trước vùng mã hóa* cho phân tử protein, được gọi là đoạn 5' không mã hoá (5'-noncoding). Do đó, mRNA có *đoạn đầu* mang các *tín hiệu cho ribosome nhận biết* để gắn vào dịch mã.

Ngoài ra, ở đuôi 3' sau dấu kết thúc (stop signal) có *đoạn 3' không mã hóa* (3'-non coding) là nơi gắn poly-A. Như đã thấy ở phần phiên mã mRNA có cấu trúc phức tạp (hình 6.18). Điều đó có lẽ liên quan đến *sự biểu hiện của gen* do thời gian tồn tại ngắn hay dài của mRNA.

Các mRNA của *Prokaryotae* có cấu trúc đơn giản, có nửa thời gian (half life) tồn tại ngắn: trung bình 2 phút. mRNA của *Eukaryotae* có nửa thời gian tồn tại khoảng 30 phút đến 24 giờ.



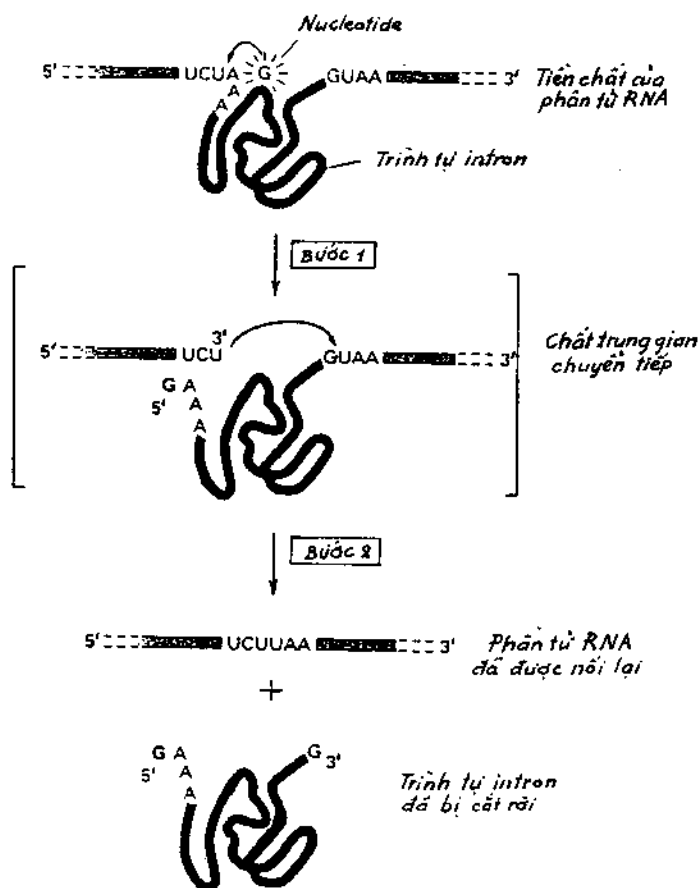
Hình 6.18. Cấu trúc của mRNA của *Eukaryotae*

4. Ribozyme và self - splicing

Vào năm 1981, phát minh về một số chức năng *xúc tác* của một số phân tử RNA đã làm đảo lộn quan niệm về nhóm chất này. Các phân tử rRNA của các loài Nguyên sinh động vật (Protozoa) *Tetrahymena* lúc đầu được tổng hợp với một số lượng lớn tiền chất, từ trong số rRNA đó một được tạo ra *bằng tự cắt nối (self - splicing)*. Điều đáng ngạc nhiên của phát minh này là splicing có thể xảy ra *in vitro* trong sự vắng mặt của protein. Điều đó cho thấy rõ ràng trình tự intron tự nó có *hoạt tính xúc tác tương tự enzyme*. Quá trình xúc tác tự cắt qua hai bước (hình 6.19).

Trình tự intron dài 400 nucleotide đã được tổng hợp trong ống nghiệm và nó cuộn lại tạo phức hợp bề mặt có hoạt tính tương tự enzyme trong các phản ứng với các RNA khác. Mặc dù splicing phần lớn không được thực hiện tự động như trường hợp self - splicing ở *Tetrahymena*, nhưng hiện tượng này cũng được phát hiện ở những sinh vật khác, cả ở nấm và vi khuẩn.

Sau này, nhiều họ RNA có khả năng xúc tác được phát hiện. Ví dụ, phần lớn tRNA được tổng hợp lúc đầu ở dạng tiền chất và có phân tử RNA đóng vai trò xúc tác trong phức hợp RNA - protein nhận biết các tiền chất đó và cắt ở những điểm chuyên biệt.



Hình 6.19. Phản ứng self - splicing của RNA

Sơ đồ mô tả phản ứng self - splicing trong đó trình tự intron tự xúc tác quá trình tự cắt rời khỏi phân tử rRNA ở loài *Tetrahymena*. Phản ứng được bắt đầu khi nucleotide G gắn vào trình tự intron, đồng thời cắt mạch RNA, đầu 3' của RNA mới vừa được tạo ra gắn vào đầu bên kia của intron hoàn thành phản ứng nối liền.

Các RNA có khả năng xúc tác được gọi là **Ribozyme**. Phát hiện này có ý nghĩa quan trọng trong việc tìm hiểu cơ chế và nguồn gốc sự sống.

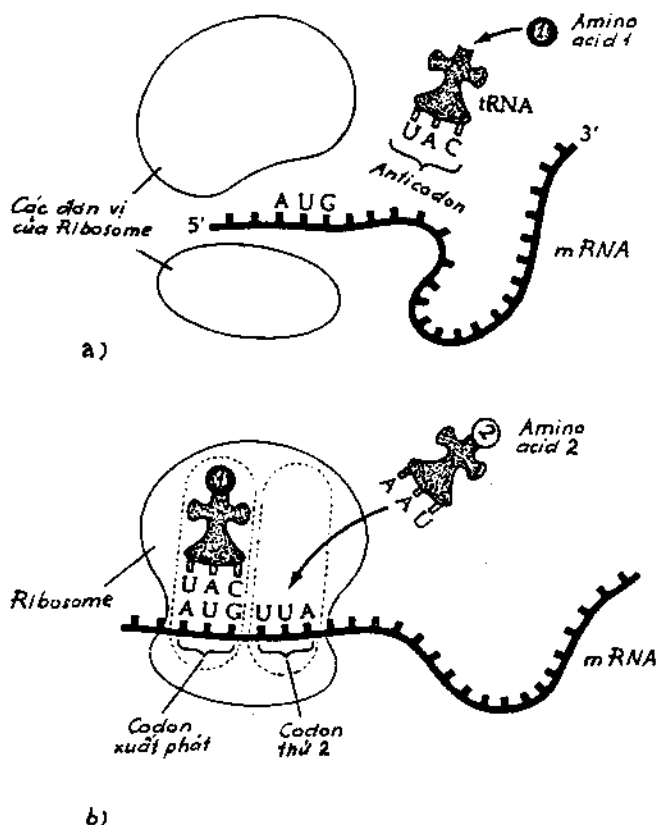
VII. DỊCH MÃ (TRANSLATION)

Thông tin trên mRNA trưởng thành, tức trình tự các base trên mRNA tiếp theo được sử dụng để xác định trình tự các amino acid tạo nên mạch

polypeptide. Quá trình này được gọi là **dịch mã** (translation), thông tin được chuyển từ "ngôn ngữ" này trên một phân tử (*trình tự ribonucleotide*) thành "ngôn ngữ" trên phân tử khác (*trình tự các amino acid*). Quá trình dịch mã **phức tạp hơn** so với sao chép và phiên mã. Nó được thực hiện trên một cấu trúc là **ribosome** với sự tham gia của cả **ba loại RNA** : mRNA, rRNA và tRNA, mà tất cả đều được **tổng hợp từ khuôn DNA**. Hướng dịch mã trên mRNA là $5' \rightarrow 3'$.

1. Các ribosome

Quá trình dịch mã thực hiện trên các ribosome. Mỗi ribosome gồm **hai đơn vị** : một **lớn** và một **nhỏ**. Mỗi cái là một phức hợp gồm rRNA, các enzyme và các protein cấu trúc (xem hình 6.20). Khi không thực hiện tổng hợp protein, mỗi đơn vị tồn tại tách rời trong tế bào chất. **Đơn vị lớn** của ribosome của *Prokaryotae* gồm **2 phân tử rRNA** và **35 phân tử protein**; **đơn vị nhỏ** có **một rRNA** và khoảng **20 phân tử protein**. rRNA có cấu trúc không gian phức tạp do có nhiều đoạn bắt cặp với nhau nhờ có trình tự nucleotide bổ sung.



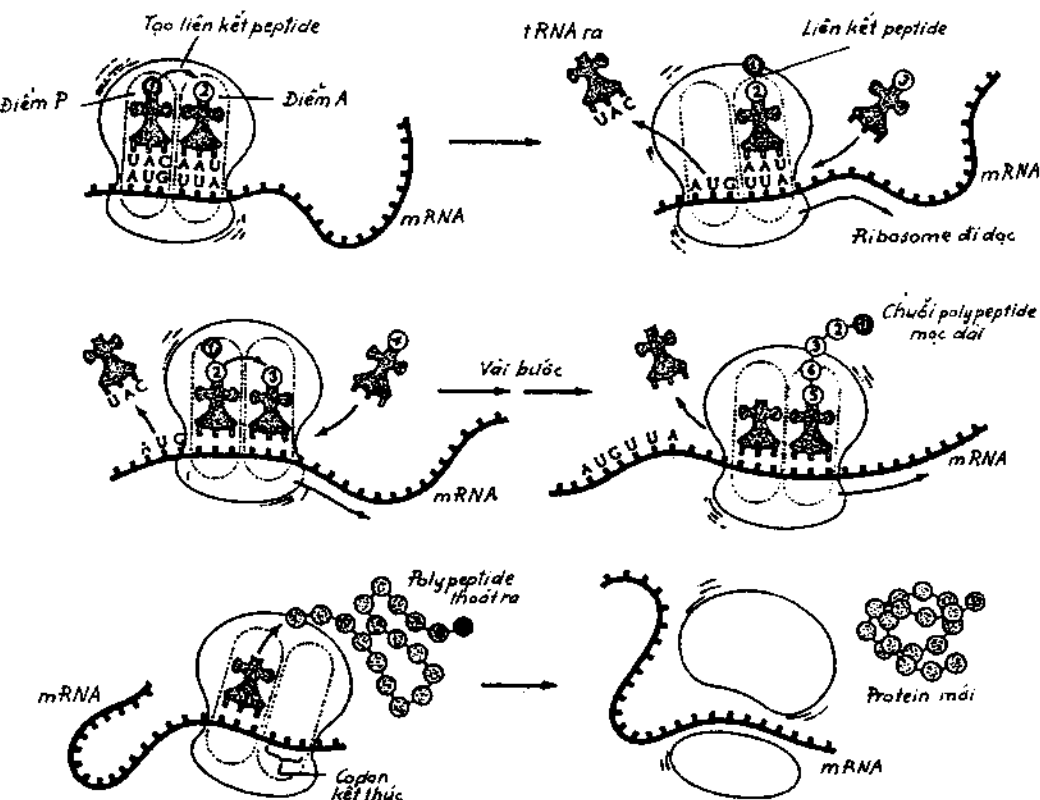
Hình 6.20. Sự gắn của mRNA với các tiểu phần ribosome và sự dịch mã của chúng

a) Sự gắn của 2 tiểu phần ribosome với mRNA

b) Sự dịch mã của chúng

Ở *Prokaryotae*, đầu 5' của mRNA gắn trước tiên vào đơn vị nhỏ, và lúc đó có khả năng gắn thêm vào đơn vị lớn (hình 6.20 và 6.21). Khi đơn vị lớn gắn vào xong thì sự dịch mã bắt đầu.

Vì tế bào *Prokaryotae* không có màng nhân, quá trình dịch mã không tách khỏi các ribosome và bộ máy dịch mã trong tế bào chất, các ribosome có khả năng gắn vào một đầu mRNA và dịch mã tạo protein, trong khi đó RNA polymerase vẫn tiếp tục phiên mã từ DNA.



Hình 6.21. Mô hình sự dịch mã ở ribosome

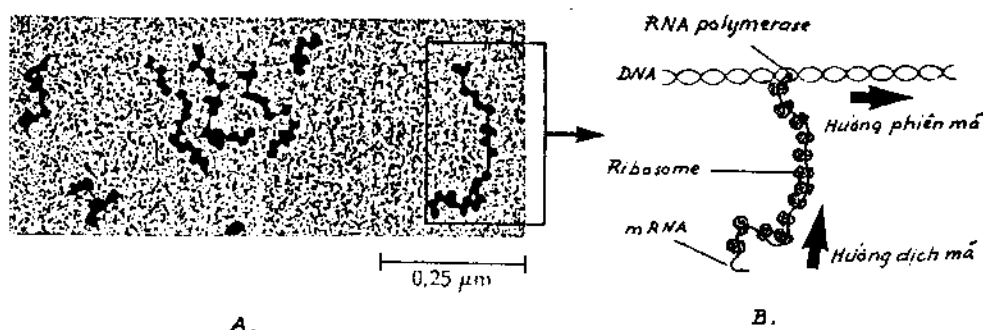
2. Polyribosome và quá trình gắn của amino acid

Sau khi mRNA được tạo ra do phiên mã, gắn vào đơn vị nhỏ của ribosome, đơn vị lớn có thể gắn vào và sự dịch mã bắt đầu.

a) Polysome

Ở cả *Prokaryotae* lẫn *Eukaryotae*, khi ribosome đầu tiên gắn vào dịch mã mRNA đến phần sau thì các ribosome khác có thể gắn vào phía đầu để

dịch mã. Do đó các ribosome **xếp thành chuỗi** trên mRNA tạo nên cấu trúc **polyribosome**, còn gọi là **polysom** (hình 6.22). Khoảng 15 ribosome có thể gắn cùng lúc trên mRNA cách nhau 80 nucleotide. Nhờ vậy, tốc độ **tổng hợp protein tăng nhanh** đáng kể.



Hình 6.22. Polyribosome

A : Ảnh hiển vi điện tử

B : Mô hình dịch mã của polysom

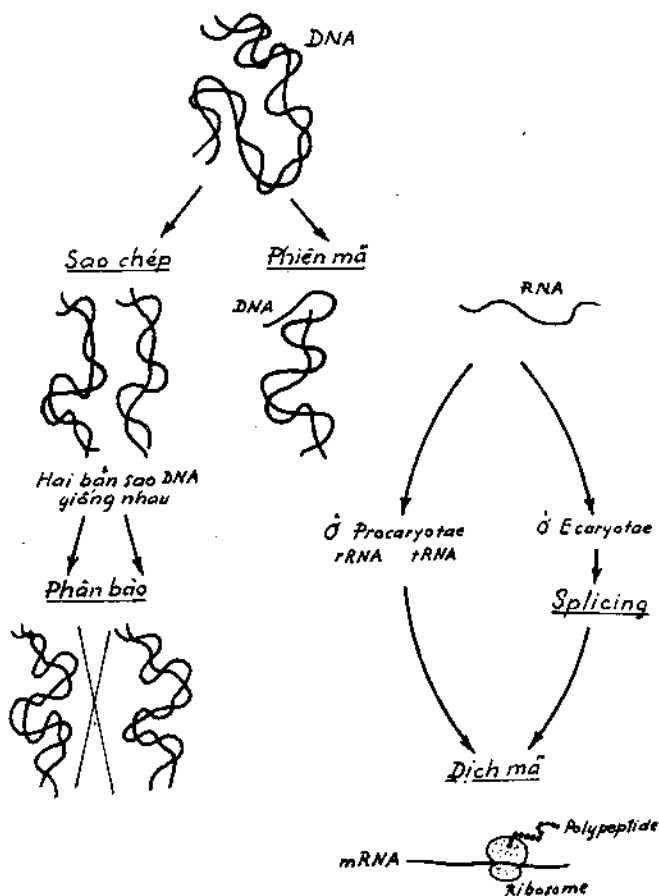
b) Diễn biến dịch mã ở ribosome

Dịch mã ở ribosome trải qua các giai đoạn : **khởi sự** (initiation), **nối dài** (elongation) và **kết thúc** (termination).

* **Khởi sự** : Giai đoạn bắt đầu, có sự tham gia của mRNA, các ribosome qua nhiều bước nhờ những protein gọi là các **nhân tố khởi sự** (initiation factors) như IF-1, IF-2, IF-3 ở vi khuẩn và 10 nhân tố eIF (eukaryotic IF) như eIF1, eIF2, eIF3, eIF-4A, eIF-4B,...ở các *Eukaryotae*.

Dịch mã bắt đầu khi **tRNA đặc biệt cho khởi sự** gắn với đơn vị nhỏ của ribosome. Ở tất cả các sinh vật, **bộ mã khởi sự** cho tổng hợp protein là **AUG mã hóa cho methionin**. *E.coli* có tRNA **khởi sự** của methionin **khác** với tRNA gắn methionin ở giữa phân tử protein. Chỉ có methionin đầu tiên của các protein *E.coli* được gắn thêm formic acid thành **N-formyl methionin** ở đầu amine.

Khi **tRNA khởi sự** gắn với đơn vị nhỏ của ribosome, phức hợp sẽ bám vào **các trình tự nhận biết đặc biệt của ribosome** ở đầu 5' của mRNA phía trước đoạn mã hóa cho protein. Nhờ đó, **anticodon** của tRNA-methionine khởi sự bắt cặp với **codon xuất phát AUG** trên mRNA, ở **điểm-P** (P-site) (hình 6.23). Sau đó, đơn vị lớn và nhỏ gắn vào nhau thành ribosome nguyên vẹn.



Hình 6.23. Dòng thông tin

*Nối dài : Sự nối thêm các amino acid tiếp theo. Sự nối dài đòi hỏi các protein được gọi là các **nhân tố nối dài EF** (elongation factor). Vi khuẩn và *Eukaryotae* có các nhân tố sau :

Các nhân tố nối dài (elongation factor)

(Số trong ngoặc là khối lượng phân tử)

Ở Prokaryotae	Ở Eukaryotae	Chức năng
EF - Tu (43.000)	FF - 1 α (53.000)	gắn aminoacyl - tRNA vào điểm A của ribosome
EF - Ts (30.000)	EF1 β 7 (50/38.000)	Tái hồi EF - T4 hay FF - 1 α
EF - G (77.000)	EF - 2 (100.000)	Tham gia vào bước chuyển tiếp trong chu trình nối dài

RNA khác mang anticodon tương ứng bắt cặp với codon ở điểm-A (A-site) còn trống (hình 6.23). Tiếp theo amino acid đã được gắn tRNA nằm ở điểm-P được tách ra và gắn với amino acid trên tRNA ở điểm-A. tRNA ở điểm-P sẽ được giải phóng. Phản ứng nối các amino acid kế nhau được xúc tác bởi enzyme *peptidyl transferase*. Ribosome *di chuyển từ đầu 5' của mRNA đến đầu 3'* sao cho tRNA còn lại chiếm điểm-P, và codon tiếp theo choán điểm-A chuẩn bị nhận anticodon bổ sung. Qua các giai đoạn trên quá trình dịch mã ở một ribosome khép kín vòng.

* Kết thúc : Chu trình dịch mã thêm khoảng 15 amino acid một giây vào mạch polypeptide, nó được chấm dứt khi trải qua codon kết thúc là UAA, UAG và UGA.

Ở bước kết thúc, các mã kết thúc không có anticodon. Thay vào đó các **nhân tố phóng thích RF** (release factor) làm kết thúc quá trình. Ở vi khuẩn có 3 nhân tố phóng thích RF1 (đại diện cho các codon UAA và UAG), RF- 2 (với UAA hay UGA) và RF - 3 kích thích cả hai nhân tố kia. Ở *Eukaryotae* chỉ có một nhân tố eRF (eukaryotic RF).

Mạch polypeptide có đầu $-NH_2$ và đuôi $-COOH$ hoàn chỉnh thoát ra ngoài nhờ các **nhân tố phóng thích** kể trên.

VIII. GEN LÀ GÌ ?

1. Dòng thông tin

Đến đây có thể hệ thống lại dòng thông tin như mô tả trên hình 6.23.

2. Định nghĩa về gen hiện nay

G.Mendel là người đầu tiên nêu lên khái niệm "**nhân tố di truyền**". Vào năm 1909, Johansen đã nêu ra thuật ngữ "**gen**" để chỉ nhân tố di truyền xác định một tính trạng nào đó. J.Morgan cụ thể hóa khái niệm về gen, khẳng định nó nằm **trên nhiễm sắc thể** và chiếm một **locus** nhất định. Gen là đơn vị chức năng xác định một tính trạng.

Vào những năm 40, G. Beadle và E. Tatum chứng minh gen kiểm tra các phản ứng sinh hóa và nêu giả thuyết **một gen - một enzyme**. Hemoglobin là một protein nhưng gồm 2 polypeptide do 2 gen xác định. Giả thuyết được chỉnh lại là 1 gen - 1 polypeptide.

Vào những năm 50, DNA được chứng minh là chất di truyền. **Mô hình cấu trúc DNA** của Watson - Crick được nêu ra và **học thuyết trung tâm** ra đời. Gen là các đoạn DNA trên nhiễm sắc thể không những mã hóa cho các

loại protein mà cả các loại RNA. *Gen* được hiểu là **một đoạn DNA** trên nhiễm sắc thể **mã hóa** cho **một polypeptide** hay RNA (một đại phân tử sinh học).

Cuối những năm 70, việc phát hiện ra gen gián đoạn ở *Eukaryotae* cho thấy có những đoạn DNA không mã hóa cho các amino acid trên phân tử protein. Khái niệm về gen được chỉnh lí một lần nữa: "*Gen là một đoạn DNA đảm bảo cho việc tạo ra một polypeptide, nó bao gồm cả vùng trước và sau vùng mã hóa cho protein và cả những đoạn không mã hóa (intron) xen giữa các đoạn mã hóa (exon)*". Hiện nay có thể định nghĩa tổng quát như sau : *Gen là đơn vị chức năng cơ sở của bộ máy di truyền chiếm một locus nhất định trên nhiễm sắc thể và xác định một tính trạng nhất định. Các gen là những đoạn vật chất di truyền mã hóa cho những sản phẩm riêng lẻ như các RNA được sử dụng trực tiếp hoặc cho tổng hợp các enzyme, các protein cấu trúc hay các mạch polypeptide để gắn lại tạo ra protein có hoạt tính sinh học.*

TÓM TẮT CHƯƠNG

Protein được cấu tạo từ các đơn phân là amino acid và có các bậc cấu trúc I, II, III và IV. Cấu trúc bậc I giữ vai trò quan trọng hàng đầu và được xác định về mặt di truyền bởi trình tự của các nucleotide ở dạng mã hóa từng bộ ba, gọi là codon.

Thông tin di truyền chứa trên DNA được hiện thực hóa qua các công cụ phân tử là các protein. Quá trình tổng hợp protein trải qua hai giai đoạn : **phiên mã và dịch mã**. RNA polymerase tổng hợp nên mRNA và chất này làm khuôn tạo nên phân tử protein ở các **ribosome**. Trình tự các nucleotide trên DNA tạo nên các bộ ba mã hóa tức các **codon**, xác định các amino acid trên phân tử protein.

Tóm lại, DNA của gen xác định mRNA, chất này lại xác định cấu trúc của phân tử protein, protein kiểm soát các phản ứng sinh hóa và tạo ra các tính trạng cơ thể.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Chứng minh sự liên quan giữa gen và phản ứng sinh hóa.
2. Giả thuyết 1 gen - 1 enzyme và ý nghĩa của nó đối với sự phát triển của di truyền học ?
3. Do đâu mà DNA có đặc tính kì lạ là vừa có khả năng tự sao chép, vừa có khả năng di xúc tác làm khuôn tổng hợp RNA ?

4. Học thuyết trung tâm dựa trên những cơ sở nào ?
5. Nói về vai trò của nhóm chất mà bản thân nó được tổng hợp từ khuôn của chất khác nó, và nó lại có thể làm khuôn để tạo ra phân tử khác nó.
6. Nói rõ vai trò của ribosome trong sinh tổng hợp protein.
7. Phân tích mối liên hệ giữa chu trình sống của *Prokaryotae* và *Eukaryotae* thể hiện ở những khác biệt trong sinh tổng hợp protein.
8. Sự tiến hóa của khái niệm về gen qua các giai đoạn phát triển của di truyền học ?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Một RNA được tổng hợp từ dung dịch chứa 80% adenosine diphosphate và 20% uridine diphosphate. Trong dịch chiết vô bào của *E.coli* dùng RNA trên làm RNA thông tin, có thể tổng hợp được các polypeptide từ các amino acid mang dấu phóng xạ. Các polypeptide được tổng hợp nên có chứa 4 gốc isoleucine đối với một tyrosine, 16 gốc isoleucine đối với một phenylalanine, 16 gốc lysine đối với một tyrosine.

Các bộ ba mã hóa nào đặc trưng với mỗi amino acid đó ?

Bài giải

Như đã biết, sự mã hóa được thực hiện bởi 3 gốc base, nhưng chưa biết cụ thể cái nào. Nếu các base được phân bố một cách ngẫu nhiên, có thể nhận được sự phân bố như sau trên RNA thông tin :

	Codon	Xác suất
(1)	A A A	$(0,8)^3 = (4/5)^3 = 64/125$
(2)	(2 A + 1 U)	$(0,8)^2 (0,2) = (4/5)^2 (1/5) = 16/125$
(3)	(1 A + 2 U)	$(0,8) (0,2)^2 = (4/5) (1/5)^2 = 4/125$
(4)	U U U	$(0,2)^3 = (1/5)^3 = 1/125$

Có thể viết gọn như sau :

(1)	(2)	(3)	(4)
64	16	4	1

Căn cứ số liệu đã cho có thể xác định như sau :

$$\text{lys} = 4, \text{isoleucine} = 16, \text{tyr} = 64 \text{ phe}$$

Hoặc dưới dạng đảo lại (thay vì 1 lys = 64 phe thì lấy số đảo ngược lại :)

lys	ile	tyr	phe
64	16	4	1

Nếu mỗi bộ ba mã hóa tương ứng với một amino acid, đối chiếu bảng xác suất và số lượng các loại amino acid gắn vào polypeptide chúng ta có thể xác định các mã di truyền tương ứng như sau :

Các amino acid	Codon	Xác suất
lysine	A A A	64/125
isoleucine	(2 A + 1 U)	16/125
tyrosine	(1 A + 2 U)	4/125
phenylalanine	U U U	1/125

Cần lưu ý việc dịch mã trên mRNA tổng hợp không định hướng nên AAU và UAA không phân biệt được .

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Trong một hệ thống chứa 70% U, 30% C và một enzyme có khả năng nối các nucleotide tạo RNA một cách ngẫu nhiên, xác định (bằng phần trăm) các tần số tất cả các kiểu bộ ba có thể được tạo thành.

2. Người ta cho vào tế bào tạo máu của thỏ trong một thời gian ngắn một hỗn hợp các amino acid được đánh dấu đồng vị phóng xạ. Sự đánh dấu này tiến hành lúc tế bào đang tổng hợp hemoglobine (một số phân tử được tổng hợp mới một phần). Ngay sau khi sự đánh dấu ngừng, các phân tử hemoglobine nguyên vẹn được tách ra. Đọc theo các phân tử này chỗ nào được mang dấu phóng xạ nhiều hơn và vì sao ?

3. Một đoạn của tRNA^{ser} (tRNA vận chuyển của serine) đã bị cắt bởi enzyme T₁, sau đó bị phân hủy hoàn toàn do T₁ và do enzyme RP, việc cắt ra đã cung cấp các đoạn xếp liên tiếp như sau :

Phân hủy bởi T₁ : AG, G, UCCUG, G, TCCCG, pG, G.

Phân hủy bởi RP : U, pGGGGU, C, C, C, C, C, G, GAGT.

Tái lập lại các đoạn tRNA^{ser} này.

4. Sự phân giải một loại RNA tinh sạch bởi 2 enzyme khác nhau (T₁ và RP) cho hai tập hợp các đoạn được viết liên nhau như sau :

Phân hủy do T₁ : G, pCAUUG, AUCUCG-OH, AAUCCAG.

Phân hủy do RP : pC, C, C, C, C, U, U, G-OH, AU, AGAU, GGAAU.

Tái lập phân tử RNA đó.

5. Sơ đồ dưới đây mô tả một enzyme tượng trưng có 4 đoạn được kí hiệu bởi các chữ A, B, C, D. Giải thích hiệu quả các đột biến sau căn cứ vào hoạt tính sinh học của các enzyme bị đột biến :

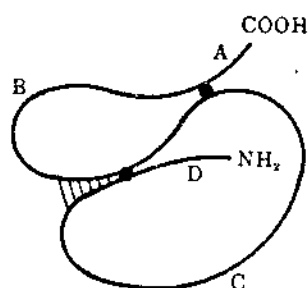
a) Đột biến vô nghĩa (non-senes) trong DNA mã hóa đoạn A.

b) Đột biến cùng nghĩa (đột biến im lặng) ở vùng D.

c) Đột biến sai nghĩa (mis-sens) ở vùng B.

d) Mất đoạn hoàn toàn một codon ở đoạn C.

e) Gắn thêm vào một nucleotide ở đoạn C.



Hình 6.24

ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN

Sự biểu hiện của các gen chịu sự kiểm soát của *các cơ chế điều hòa*. Chúng giữ nhiều vai trò rất quan trọng cho hoạt động sống, *đáp lại* các biến đổi của môi trường bên trong và ngoài cơ thể. *Sự biểu hiện của gen* có khác nhau giữa *Prokaryotae* và *Eukaryotae*. Việc điều hòa được thực hiện ở *nhiều mức độ khác nhau* và liên quan đến từng giai đoạn phát triển. Theo quan niệm về operon, các *gen điều hòa* giữ vai trò quan trọng trong việc *đóng và mở các gen cấu trúc* để có biểu hiện tổng hợp protein đúng lúc, đúng nơi theo nhu cầu cụ thể của tế bào.

Trong bất kì tế bào nào, tất cả các gen đều không hoạt động đồng thời. Ví dụ, tế bào *Escherichia coli* có khoảng 10^7 phân tử protein gồm 3000 loại khác nhau. Tính ra trung bình mỗi loại có khoảng 3000 phân tử. Nhưng trên thực tế, có lúc trong tế bào có loại protein đạt đến khoảng 500.000 phân tử, còn loại khác chỉ khoảng 10 phân tử. Như vậy không phải loại protein nào cũng được tổng hợp với số lượng như nhau và tế bào phải có những cơ chế điều hòa để tổng hợp protein tiết kiệm và hợp lí nhất. Năm 1962, J.Monod, F.Jacob và Lwoff đã nêu ra *quan niệm về operon* để giải thích sự điều hòa.

Một số gen hoạt động thường xuyên cung cấp sản phẩm liên tục, số khác có biểu hiện ở những giai đoạn nhất định trong chu trình sống và có thể chỉ có hoạt động trong điều kiện môi trường không bình thường. Một số protein cần được tổng hợp với số lượng lớn, số khác chỉ cần một ít phân tử. Do vậy, hoạt tính của mỗi gen điều hòa bởi nhiều cơ chế khác nhau để có hiệu quả tốt nhất trong việc sử dụng nguồn năng lượng của tế bào.

I. CÁC HIỆN TƯỢNG ĐIỀU HÒA

Để duy trì nội cân bằng (homeostasis) và sự phát triển của cơ thể, các sinh vật có các cơ chế điều hòa khác nhau. Các kiểu điều hòa đều bắt nguồn từ sự biểu hiện của các gen.

1. Điều hòa thích nghi

Một số amíp biểu hiện sự thay đổi hình thái và sinh lí đặc biệt đáp lại các điều kiện môi trường khác nhau. Khi các amíp được cho vào nước, chúng chuyển từ dạng amíp sang dạng có lông để bơi. Khi môi trường dinh dưỡng thiếu chúng có thể tạo thành các dạng tương tự mô biểu bì. Các biến đổi này thuận nghịch.

Vì khuẩn trong môi trường dinh dưỡng tối thiểu có khả năng tổng hợp amino acid. Nhưng nếu cho amino acid thẳng vào môi trường nuôi, vi khuẩn sẽ ngừng tổng hợp amino acid. Lúc nguồn amino acid từ ngoài cho vào đã hết, tế bào vi khuẩn lại tự tổng hợp amino acid cho bản thân.

Các *biến đổi* kể trên đều *thuận nghịch* chứng tỏ sự thay đổi chức năng ở đây *không do biến dị di truyền*. Các sự kiện trên còn cho thấy sự xuất hiện hay biến mất các cấu trúc mới không làm ảnh hưởng tiềm năng di truyền sẵn có. Có thể cho rằng có trường hợp một số gen hoạt động, trường hợp khác ngừng biểu hiện. Các hiện tượng nêu trên đều do hiện tượng điều hòa gọi là *điều hòa thích nghi*.

2. Hoạt động nối tiếp của các gen

Khi phage xâm nhập vi khuẩn, DNA của phage lúc đầu sao chép, sau đó các protein khác nhau mới được tổng hợp nên. Như vậy có các gen "*sớm*", sớm tạo *enzyme* sao chép DNA và các gen "*muộn*" xác định các thành phần của vỏ. Trong quá trình nhiễm vi khuẩn thì nhóm gen đầu hoạt động trước, nhóm thứ hai hoạt động tiếp theo. Như vậy có cơ chế điều hòa chức năng của gen *diễn ra theo trình tự* nghiêm ngặt. Đây là kiểu *điều hòa nối tiếp* (sequencial regulation).

Hoạt động nối tiếp của các gen còn thể hiện rõ trong quá trình phát triển cá thể của các sinh vật khác như các *Eukaryotae* đa bào.

3. Biệt hóa tế bào (*Differentiation*)

Nhiều sinh vật bậc cao như con người chứa nhiều tỉ tế bào bắt nguồn từ một hợp tử do chia nguyên nhiễm. Từ một hợp tử ban đầu đến khi trưởng thành cơ thể người có khoảng *200 loại tế bào khác nhau* (tế bào tim, gan, thận, da...). Mỗi loại tế bào chỉ *biểu hiện một phần thông tin* của mình. Quá trình *chuyên môn hóa chức năng* của tế bào được gọi là *sự biệt hóa*.

Tuy có sự biệt hóa, nhưng tế bào vẫn *giữ nguyên vẹn khả năng di truyền* của mình. Một ví dụ rất rõ là nuôi cấy mô tế bào thực vật : từ một phần mô phân sinh người ta có thể nuôi trong môi trường dinh dưỡng đến tạo thành cây và ra hoa.

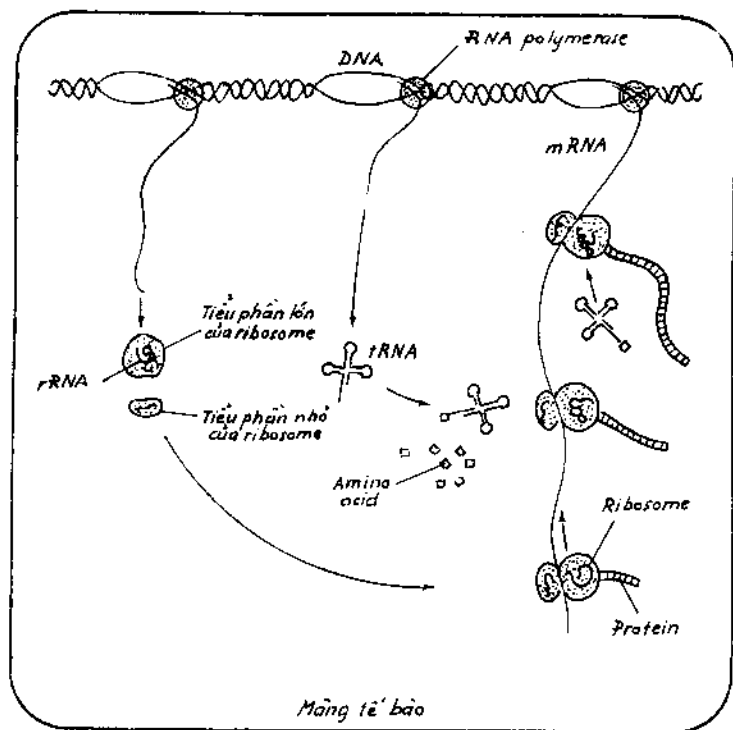
4. Khái quát về điều hòa ở *Prokaryotae* và *Eukaryotae*

Có sự khác nhau đáng kể giữa *Prokaryotae* và *Eukaryotae* trong điều hòa sự biểu hiện của các gen. Các tế bào *Eukaryotae* có cấu tạo phức tạp hơn nhiều nên sự điều hòa có nhiều mức độ và chi tiết khác hơn ở *Prokaryotae*.

a) Sự biểu hiện của gen ở *Prokaryotae*

Bộ máy di truyền của sinh vật tiến nhân là một DNA vòng tròn chứa một số lượng gen giới hạn được phiên mã ở trạng thái tiếp xúc trực tiếp với tế bào chất (hình 7.1).

Chu trình tế bào ngắn (20'-30') và **không có sự biệt hóa tế bào**. Do đó hoạt động của các gen được điều hòa do các nhu cầu của tế bào khi cần thiết. Tác động của các nhân tố môi trường làm những gen tương ứng được mở để phiên mã, dịch mã tổng hợp protein hay có hiệu quả ngược làm dừng lại.



Hình 7.1. Sự biểu hiện của gen ở *Prokaryotae*

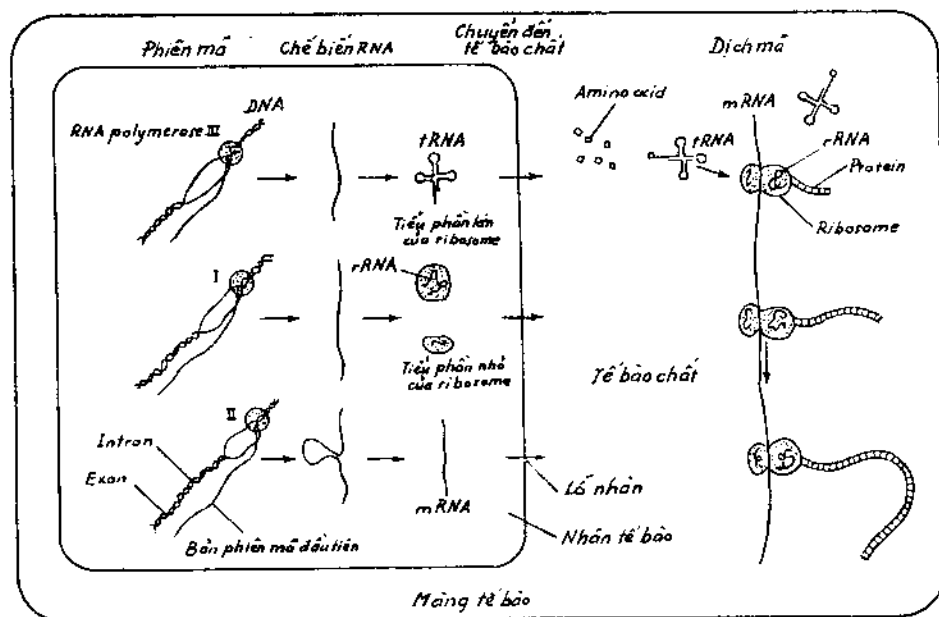
Các gen tổng hợp rRNA và tRNA để tham gia dịch mã.

Sự phiên mã và dịch mã được thực hiện ngay trong tế bào chất.

b) Sự biểu hiện của gen ở *Eukaryotae*

Khác với các *Prokaryotae*, **nhễm sắc thể** của *Eukaryotae* có cấu trúc phức tạp. Ngay trên cấu trúc nhiễm sắc thể có sự tham gia của các protein histone có vai trò điều hòa biểu hiện của gen. Sự điều hòa biểu hiện của gen *Eukaryotae* phải qua nhiều mức điều hòa phức tạp hơn so với *Prokaryotae* và qua nhiều giai đoạn như : nhiễm sắc thể tháo xoắn, phiên mã, biến đổi sau phiên mã, mRNA rời nhân ra tế bào chất, dịch mã và biến đổi sau dịch mã (hình 7.2).

Ngoài ra, đa số *Eukaryotae* có cơ thể **đa bào** và mỗi tế bào có biểu hiện sống không phải tự do, mà chịu sự **biệt hoá** theo các chức năng chuyên biệt trong mối quan hệ hài hòa với cơ thể.



Hình 7.2. Sự biểu hiện của gen ở *Eukaryotae*

Sự biểu hiện của gen qua nhiều bước :

- Sự phiên mã : tạo ra các bản phiên mã đầu tiên của RNA.
- Chế biến RNA : các bản phiên mã đầu tiên của RNA qua splicing.
- Sự vận chuyển các RNA và các đơn vị ribosome ra tế bào chất.
- Sự dịch mã ở tế bào chất với sự tham gia của các yếu tố từ nhân.

Các vi khuẩn thường phản ứng trực tiếp với môi trường và sự biểu hiện gen thuận nghịch như có đường lactose thì mở operon để phân hủy, khi hết đường thì operon đóng lại. Trong khi đó, các tế bào *Eukaryotae* có những con đường biệt hóa khác nhau và thường sự chuyên hóa là ổn định thường xuyên trong đời sống cá thể. Ngoài sự biệt hóa tế bào, các cơ thể *Eukaryotae* đa bào còn trải qua quá trình **phát triển cá thể** với nhiều giai đoạn phức tạp nối tiếp nhau, trong đó có những gen chỉ biểu hiện ở phôi rồi dừng hẳn.

Tất cả những điểm nêu trên cho thấy sự điều hòa biểu hiện gen của *Eukaryotae* phức tạp hơn nhiều, mà hiện nay lại được biết ít hơn so với ở *Prokaryotae*.

II. CÁC MỨC ĐIỀU HÒA

Các cơ chế điều hòa sự biểu hiện của gen có thể tác động ở một hay nhiều mức độ khác nhau. Sự điều hòa có thể ở mức độ ngay bản thân gen bằng sự kiểm soát thời gian và tốc độ phiên mã. Các cơ chế khác có thể hoạt động lúc dịch mã hoặc sau dịch mã. Sơ đồ 7.3 mô tả các mức điều hòa khác nhau trong sự biểu hiện của bộ gen.

1. Mức chất nhiễm sắc (*Chromatine*)

Ngay trên sợi nhiễm sắc có thể thực hiện các kiểu :

- Sự cắt bởi ***DNase I*** ở một số vùng trên DNA bộ gen làm tháo xoắn để các gen có biểu hiện (1) của h. 7.3. Hai vùng được lưu ý : các điểm ***nhạy cảm*** (*sensible*) và ***siêu nhạy cảm*** (*hypersensible*).

Các vùng nhạy cảm có liên quan đến các gen có ***hoạt tính cao*** và những gen đã qua biểu hiện rồi (như các gen hoạt động ở phôi). Các vùng siêu nhạy cảm liên quan đến các gen có ***hoạt tính rất cao*** (như các gen histone).

- ***DNA Z*** là dạng cấu trúc siêu xoắn có thể liên quan đến đóng mở gen (2).

- ***Sự methyl hóa*** các base (3). Ở các *Prokaryotae* sự methyl hóa có thể thực hiện đối với A và C, ở *Eukaryotae* sự methyl hóa thực hiện với C vị trí 5. Sự methyl hóa làm gen ngừng hoạt động. Ví dụ: nhiễm sắc thể X bất hoạt ở người thuộc loại siêu methyl hóa.

- ***Sự thay đổi cấu hình*** (*reconfiguration*) có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen.

2. Mức phiên mã (*Transcriptionel*)

Đây là sự điều hòa ảnh hưởng trực tiếp đến việc ***mở*** hoặc ***đóng*** của gen. Kiểu điều hòa này thường gặp trong ***điều hòa trao đổi chất***, cũng như các quá trình ***biệt hóa tế bào***.

- Sự tác động của các ***trình tự cis*** (đều phía) nằm trên cùng mạch DNA như ***enhancer*** (đoạn tăng cường) (4) làm tăng sự phiên mã.

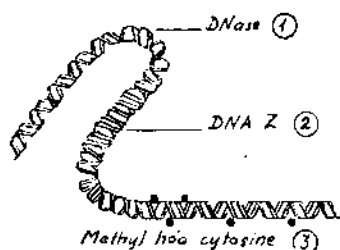
- Điều hòa bởi các ***nhân tố trans*** (lệch phía) do các nhân tố không nằm cùng trên một mạch DNA (5).

- ***Chọn lựa promoter*** thích hợp (6).

- ***Attenuation*** (sự giảm bớt tính tiết)

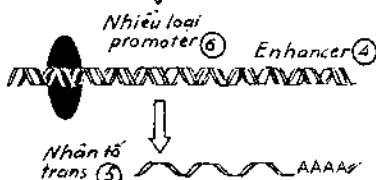
I. Mức Chromatine

- DNase I và các điểm siêu nhạy ①
- DNA Z ②
- Methyl hóa cytosine ③
- Tái cấu hình



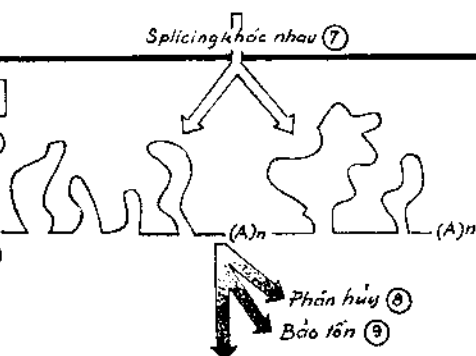
II. Mức Phiên mã

- Điều hòa vị trí cis (Enhancer) ④
- Điều hòa vị trí trans ⑤
- Chọn promoter ⑥
- Atténuation



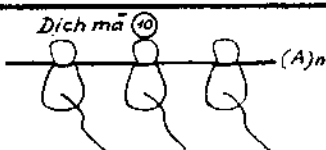
III. Mức Sau phiên mã

- Splicing khác nhau ⑦
- Thêm polyadenin hóa
- Đột biến trên mRNA
- Bản chu kỳ phân hủy ⑧
- Bảo tồn ⑨



IV. Mức Dịch mã

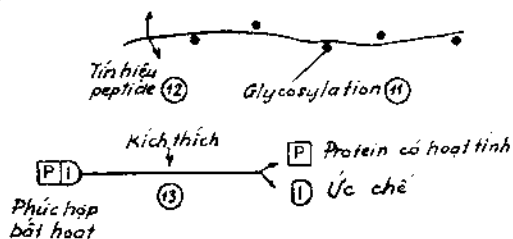
- Biến đổi các nhân tố khởi sự ⑩



V. Mức Sau dịch mã

- Glycosylation v.v... ⑪
- Tín hiệu peptide ⑫
- Phosphoryl hóa protein
- Khôi phục hợp ⑬

Biến đổi sau dịch mã Các protein



Hình 7.3. Sơ đồ về các mức điều hòa khác nhau
(Giải thích trong bài)

3. Mức sau phiên mã (*Post-transcriptionel*)

Sự điều hòa có thể biểu hiện ở mức tác động lên mRNA thông tin, chúng ta đã gặp trường hợp trên khi mRNA thông tin bị cắt bỏ các intron và gắn các exon lại với nhau để tạo mRNA thông tin trưởng thành. Như vậy các hệ thống ảnh hưởng đến *sự trưởng thành của mRNA* thông tin có thể kiểm tra gián tiếp biểu hiện của gen tương ứng. Các mRNA của *Eukaryotae* còn có *những đoạn không mã hóa* liên quan tới thời gian tồn tại và ra khỏi nhân vào tế bào chất.

- *Splicing khác nhau* (7).
- *Điểm polyadenine hóa* khác nhau (polyadenilation).
- *Đột biến* trên phân tử mRNA.
- *Bán chu kì phân hủy* của mRNA (8).
- Sự bảo tồn các RNA trong tế bào (9).

4. Mức dịch mã (*Transductionel*)

- Sự biến đổi của các *nhân tố khởi sự IF* (10).

5. Mức sau dịch mã (*post-transductionel*)

Ở đây có sự điều hòa hoạt tính của protein. Sau khi mạch polypeptid được tổng hợp nên, các protein nhiều khi chịu các *biến đổi thứ cấp* trước khi biểu hiện hoạt tính. Ví dụ : trypsin là *enzyme* phân giải protein trong dạ dày chỉ có được hoạt tính sau khi chất tiền thân của nó (*proenzyme* không có hoạt tính) bị cắt mất một đoạn polypeptide.

Các protein có thể chịu những *biến đổi lập thể* (allosteric) như sự kết hợp các enzyme với một số sản phẩm đặc biệt có thể làm thay đổi cấu trúc không gian của chúng dẫn đến mất hoạt tính.

- *Glycosylation, phosphorylation...* (11) : gắn thêm các nhóm chất như đường, phosphore để protein có hoạt tính.

- *Tín hiệu peptide* (12) là đoạn gồm khoảng 20 amino acid nằm gần phía đầu N của polypeptide, có vai trò gắn polypeptide và ribosome đang tổng hợp mạch này với lưới nội chất. Trong bộ Golgi, polypeptide được phóng thích ra ngoài.

- Sự phóng thích ra protein có hoạt tính từ một phức hợp, như từ proinsulin thành insulin.

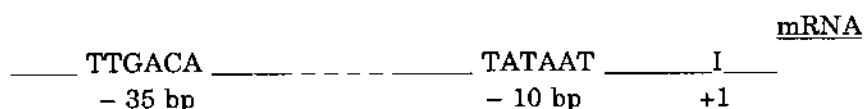
III. ĐIỀU HÒA HOẠT TÍNH GEN CỦA *PROKARYOTAE*

Các gen được phiên mã tạo RNA, được gọi là các *gen cấu trúc*. Các protein được dịch mã từ mRNA có thể là enzyme hoặc không enzyme. Trong số các protein không enzyme có các *protein điều hòa* (regulatory protein), chúng tương tác với các trình tự DNA đặc hiệu để kiểm soát hoạt tính phiên mã của các gen cấu trúc. Các gen tổng hợp các protein điều hòa được gọi là các *gen điều hòa* (regulatory gene). Phía trước mỗi gen cấu trúc (hoặc một nhóm gen) có một trình tự promoter, nơi RNA polymerase nhận biết.

1. Cấu trúc của promoter

Thực chất của khởi sự phiên mã là quan hệ tương tác giữa *RNA polymerase* với *promoter*. Khi RNA polymerase gắn vào promoter, nó sẽ phiên mã tạo phân tử RNA.

Phần lớn promoter ở *E.coli* về căn bản có cùng một cấu trúc :



Nếu base đầu tiên được phiên mã ra mRNA (luôn là purine, thường là adenin) được đánh số +1, và tất cả các base phía 5' hay "phía trước" so với nó không được phiên mã, là số trừ (-). Ngay phía trước +1 có 6 base thường với trình tự *TATAAT* ở xung quanh -10. Không phải tất cả promoter có đúng trình tự này, chúng được gọi là *trình tự nhất trí* (consensus sequence), (bảng 7.1) đôi khi gọi là *hộp Pribnow* (Pribnow box).

Bảng 7.1. So sánh vùng -35 và -10 của một số promoter vi khuẩn

Promoter			Hộp Pribnow		Khởi điểm dịch mã
	-35	---	-10	---	+1
Nhất trí (consensus)	TTGACA		TATAAT		A
lac P	TTTACA	18bp	TATGTT	6bp	A
gal P1			TATGTT	6bp	A
gal P2	GTCACA	16bp	TATGCT	6bp	A
araC	TAGACG	17bp	TGTCAT	6bp	G
araBAD	CTGACG	18bp	TACTGT	8bp	A
trp	TTGACA	17bp	TTAACT	7bp	A

Xung quanh trình tự -35 có trình tự nhất trí *TTGACA*.

Cả 2 trình tự phối hợp nhau cho phép RNA-polymerase gắn vào và khởi sự dịch mã, trình tự -35 tạo điều kiện đầu tiên cho sự gắn vào.

2. Cấu trúc của operon

Operon là *đơn vị phiên mã* gồm ít nhất 1 promoter và mRNA kế cận mã hóa cho các trình tự của một hay nhiều mạch polypeptide. Tuy nhiên, operon có thể có một hay nhiều hơn các điểm điều hòa khác với promoter. Các gen không chịu sự điều hòa do tác động môi trường, tạo sản phẩm thường xuyên, được gọi là các *gen cơ cấu* (constitutive). Số lượng sản phẩm của các gen này có thể dao động phụ thuộc vào ái lực tương đối của các promoter của chúng đối với RNA polymerase. Các promoter có *ái lực mạnh* tạo ra nhiều sản phẩm của gen hơn các promoter có ái lực yếu. Các gen mà sản phẩm protein của chúng được tổng hợp đáp lại với các nhân tố môi trường, thường được điều khiển bởi một hay nhiều protein điều hòa. Trình tự DNA bên trong operon, nơi mà *protein ức chế* (repressor protein) gắn vào, được gọi là *operator* (điểm điều hành). Sự gắn protein ức chế lên operator ngăn trở sự phiên mã của tất cả các gen cấu trúc trên cùng một operon. Sự kiểm soát như vậy đối với gen gọi là *kiểm soát âm* (negative control). Các operon của vi khuẩn thường tạo ra các mRNA đa gen (polycistronic), nhưng mRNA của *Eukaryotae* chỉ 1 gen.

Các protein cần thiết cho sự biểu hiện của gen được gọi là *chất hoạt hóa* (activator). Chúng có thể gắn với các *điểm khởi sự* (initiator site) nằm bên trong promoter của operon hay *điểm tăng cường* (enhancer site) hoặc có thể gắn ở những trình tự xa operon. Sự gắn của protein điều hòa vào initiator hay enhancer, kích thích sự phiên mã của các gen cấu trúc, được gọi là cơ chế *kiểm soát dương* (positive control). Sự kích thích để các gen điều hòa phản ứng có thể là từ các phân tử tương đối nhỏ (như đường, amino acid) đến các phân tử lớn hơn như các phức hợp hormone steroid và các protein thể nhận (protein receptor). Chất làm cho gen phiên mã được gọi là *chất cảm ứng* (inducer), có tác động ngược với *chất kìm hãm*. Các *gen cảm ứng* (inducible gene) thường tham gia vào các phản ứng *thoái dưỡng* (catabolic reaction), như phân hủy các polysaccharide thành đường đơn. Các gen ức chế (repressible gene) thường tham gia vào các phản ứng *biến dưỡng* (anabolic) thực hiện việc tổng hợp các chất như amino acid từ các tiền chất đơn giản hơn.

Như vậy, có thể xảy ra 4 kiểu tổ hợp để kiểm soát sự phiên mã :

- âm, cảm ứng (negative, inducible control).
- âm, ức chế (negative, repressive control).

- dương, cảm ứng (positive, inducible control).
- dương, ức chế (đến nay chưa có ví dụ về kiểu này).

3. Điều hòa thoái dưỡng : Kiểm soát âm, cảm ứng

Trong thoái dưỡng, các chất thức ăn được phân hủy để tạo năng lượng hoặc các chất cần thiết cho quá trình tổng hợp. Cơ chế điều hòa ở đây là *sự có mặt của cơ chất* (ví dụ lactose) dẫn tới *tổng hợp các enzyme* phân hủy.

Ví dụ điển hình cho trường hợp này là operon lactose của *E.coli*. β -galactosidase là enzyme có chức năng đôi. Chức năng đầu tiên của nó là thoái dưỡng lactose thành glucose và galactose. Chức năng thứ hai của nó là chuyển liên kết 1-4 của glucose và galactose thành liên kết 1-5 của allolactose. Bình thường enzyme này không hiện diện với nồng độ cao trong tế bào, khi vắng mặt lactose trong môi trường. Ngay sau khi cho lactose vào môi trường nuôi khi không có glucose, enzyme này được bắt đầu tạo ra. Sự vận chuyển lactose xuyên qua màng tế bào có hiệu quả nhờ protein vận chuyển *galactoside permease*. Protein cũng xuất hiện với nồng độ cao khi có lactose trong môi trường.

Sự điều hòa của operon lactose còn phụ thuộc vào nồng độ glucose trong môi trường. Mức glucose này lại kiểm soát mức nội bào của phân tử nhỏ *AMP - vòng* (cyclic AMP), là chất bắt nguồn từ ATP và làm tín hiệu báo động cho tế bào. Tế bào có xu hướng sử dụng glucose hơn là lactose để làm nguồn carbon vì glucose được biến dưỡng trực tiếp cung cấp C và tạo năng lượng. Các enzyme biến dưỡng glucose thuộc loại cơ cấu và tế bào tăng trưởng tối đa với nguồn glucose. Khi nguồn glucose cạn, tế bào phản ứng lại bằng cách tạo ra c-AMP. Sự tăng nồng độ c-AMP trong tế bào gây nên hàng loạt sự kiện, trong sự hiện diện của lactose, dẫn đến sự phiên mã các gen cấu trúc của operon lactose.

a) Cấu trúc của operon lactose

Hệ thống lactose (lactose system) bình thường (h.7.4) gồm có gen điều hòa (i^+ hoặc R) và operon mang trình tự *promoter* (p^+) locus operator (o^+) và 3 *gen cấu trúc* cho β -galactosidase (Z^+), permease (y^+) và transacetylase (a). Nhiều đột biến ở các locus này đã được phát hiện.

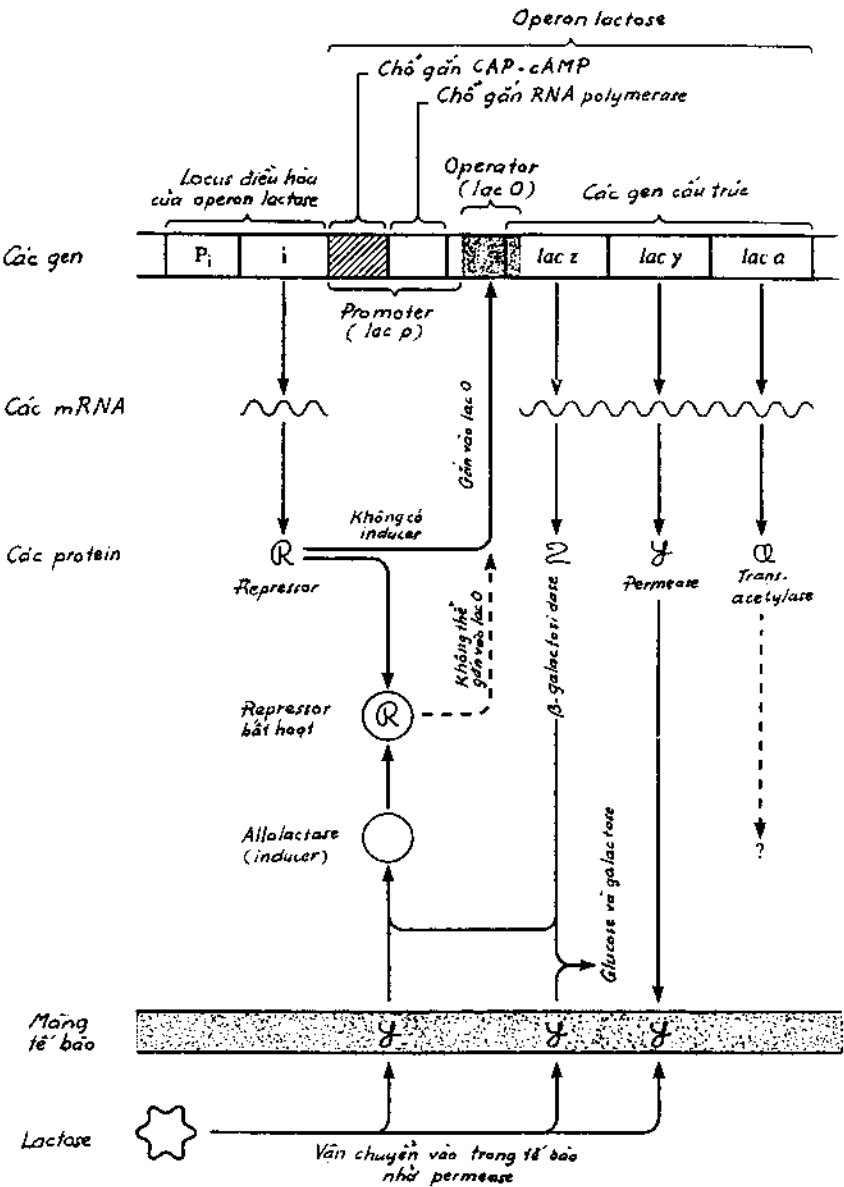
Sau đây là danh sách các allele của hệ thống lactose.

1. Các allele của promoter

p^+ = promoter hoang dại, ái lực bình thường với RNA polymerase

p^- = promoter đột biến không gắn được RNA polymerase; không có gen cấu trúc nào của operon lactose được phiên mã.

P^s = ái lực tăng hơn để nhận biết RNA polymerase; tăng mức phiên mã của operon.



Hình 7.4. Operon lactose và hoạt động của nó

2. Các allele của operator

o^+ = khi vắng mặt repressor, operator “mở” các gen cấu trúc để có thể tổng hợp protein operator này nhạy cảm với repressor. Repressor gắn vào operator làm “đóng” các gen cấu trúc của operon.

o^c = operator cơ cấu (constitutive) không nhạy cảm với repressor và thường xuyên mở các gen cấu trúc của operon lactose.

3. Các allele của galactosidase

Z^+ = tạo ra β -galactosidase nếu operon được “mở”

Z^- = đột biến sai nghĩa tạo ra sản phẩm mất hoạt tính gọi là C_z protein.

Z^{ns} = đột biến vô nghĩa (có codon kết thúc) làm dừng dịch mã từ phía sau điểm đột biến (phía sau không tạo ra protein).

4. Các allele của permease

y^+ = tạo ra permease của β -galactoside nếu operon được “mở”.

y^- = không phát hiện được permease, có lẽ do đột biến vô nghĩa.

5. Các allele của gen điều hòa (regulator)

i^+ = tạo protein ức chế hoạt tính của bất kì operator o^+ nào của operon khi không có đường lactose; khi có lactose, repressor bị bất hoạt.

i^- = gen điều hòa bị hỏng, mất khả năng tạo chất kim hãm có hoạt tính.

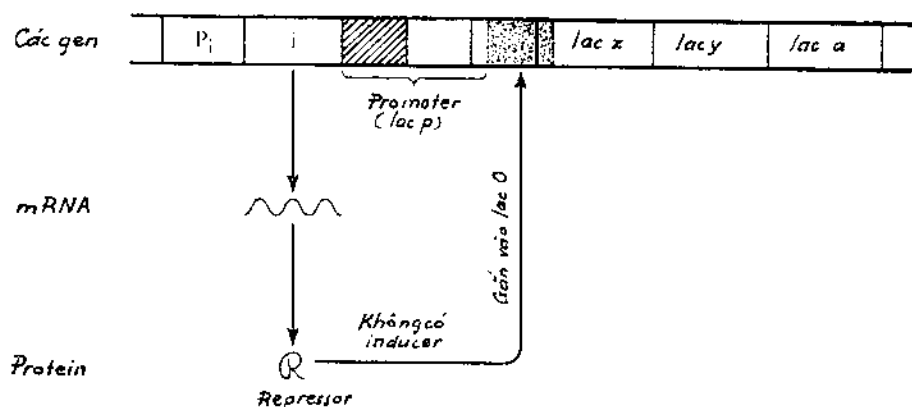
i^s = tạo ra chất **siêu kim hãm** (superrepressor) không nhạy cảm với lactose và không làm bất hoạt bất kì o^+ nào của operon.

b) Hoạt động của hệ thống

Điều kiện cảm ứng : Có lactose. Lactose được chuyển vào tế bào rất yếu vì chỉ có vài phân tử permease làm việc. Khi vào trong tế bào, một số lactose (liên kết β -1,4) được chuyển thành **allolactose** (liên kết β -1,6) nhờ **β -galactosidase**. Allolactose là **chất cảm ứng** (inducer), nó gắn vào protein kim hãm và gây biến đổi cấu hình tạo **phức hợp allolactose-repressor**. Phức hợp này mất khả năng gắn với operator. Lúc này operon được mở, RNA polymerase bắt đầu phiên mã các gen cấu trúc. Toàn bộ sự kiện diễn ra như trên hình 7.4.

Điều kiện không cảm ứng : Không có lactose, gen điều hòa của operon thường xuyên tổng hợp **protein ức chế** (repressor protein) ở mức thấp, vì nó

có promoter ít hiệu quả. Sự tổng hợp các protein này bị tác động do nồng độ lactose trong tế bào. Ngược lại, promoter bình thường của operon lac gắn với RNA polymerase rất có hiệu quả. Khi không có đường lactose protein kim hãm có hoạt tính (tạo ra do i^+ hay R) gắn vào promoter hay “đọc” trình tự operator vì protein kim hãm chiếm đoạn này. Như vậy, sự phiên mã của tất cả các gen cấu trúc của operon lac bị dừng (hình 7.5)



Hình 7.5. Operon lactose không cảm ứng

Số lượng permease tăng nên lactose vào tế bào với số lượng lớn và được phân hủy bởi β -galactosidase. Khi lactose được sử dụng cạn, các protein repressor gắn trở lại vào operator làm operon bị đóng; sự phiên mã các gen cấu trúc bị dừng.

Bản thân gen điều hòa R chỉ có 1 promoter (P_i) và gen cấu trúc của protein kim hãm. Promoter này yếu, khi các protein kim hãm có số lượng cao, nó bị các protein này gắn vào làm dừng phiên mã.

4. Điều hòa biến dưỡng : Kiểm soát âm, ức chế

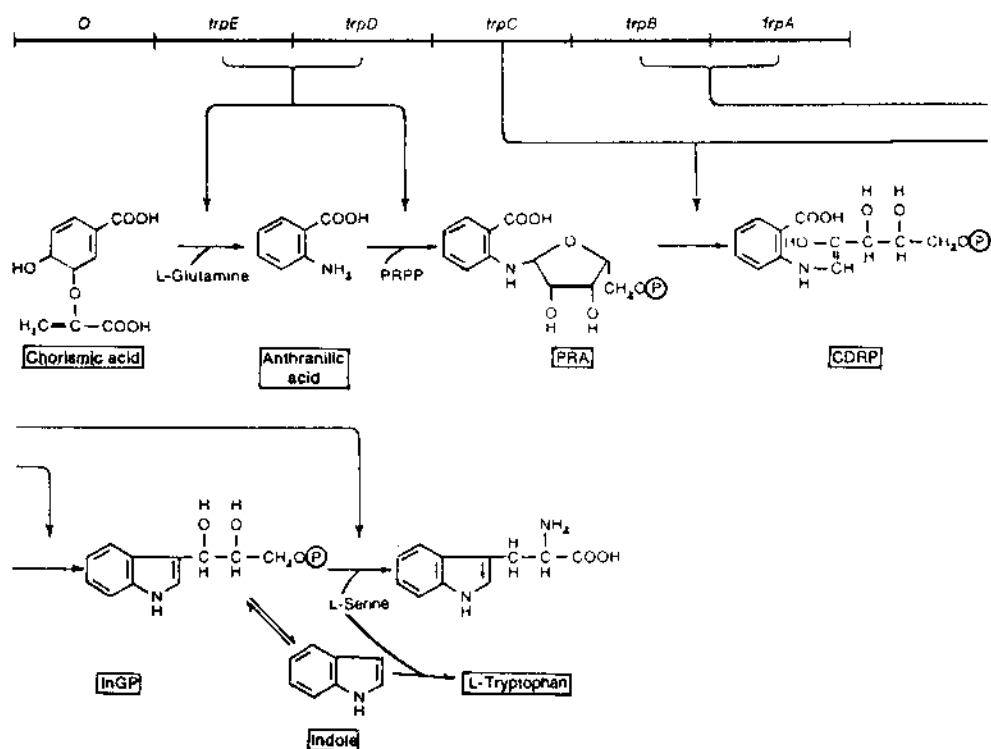
Biến dưỡng (anabolism) là quá trình tổng hợp nên các chất cần thiết cho tế bào. Ví dụ: tổng hợp các amino acid.

Quá trình tổng hợp tryptophan bắt đầu từ tiền chất chorismique acid, trải qua 5 giai đoạn kế tiếp do 5 enzyme xúc tác. Hệ thống tổng hợp amino acid tryptophan ở *E.coli* là ví dụ điển hình về operon bị kim hãm do sự kiểm soát âm.

a) Cấu trúc và hoạt động

Hệ thống tryptophan cũng có cấu trúc tương tự hệ thống lactose gồm gen điều hòa R và operon tryptophan (promoter, operator và 5 gen cấu trúc). Các gen cấu trúc xác định 5 enzyme được xếp theo thứ tự tương

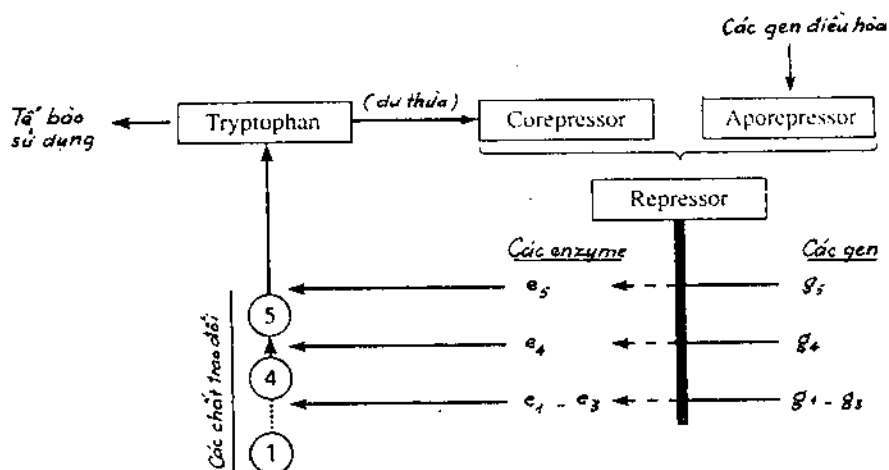
ứng với chức năng xúc tác theo trình tự các phản ứng của chuỗi biến dưỡng tryptophan (h.7.6).



Hình 7.6. Operon tryptophan

Sự khác nhau căn bản với hệ thống lactose là ở **gen điều hòa**. Gen điều hòa của hệ thống tryptophan tổng hợp thường xuyên **protein aporepressor**, là chất kìm hãm mà riêng nó không có hoạt tính. Khi tryptophan dư thừa nó trở thành chất **corepressor (đồng kìm hãm)** và kết hợp với aporepressor thành **phức hợp kìm hãm (holorepressor)** có hoạt tính. Phức hợp này gắn vào operator của operon tryptophan (*trp*) làm dừng phiên mã các gen cấu trúc. Khi nồng độ tryptophan thấp, nó tách khỏi phức hợp kìm hãm và aporepressor mất hoạt tính. Lúc này các operator lại được mở và RNA polymerase dịch mã 5 gen cấu trúc để tổng hợp 5 enzyme tạo tryptophan (hình 7.7). Sự điều hòa kiểu này còn gọi là **điều hòa ngược (retro-inhibition)** do sản phẩm cuối cùng có mối **liên hệ nghịch (feed-back)**.

Như vậy, hoạt động của hệ thống ngược lại với hệ thống lactose: khi có tryptophan thì operon bị đóng, thiếu tryptophan thì gen được mở.



Hình 7.7. Sự kiểm soát âm đối với operon tryptophan của *E.coli*

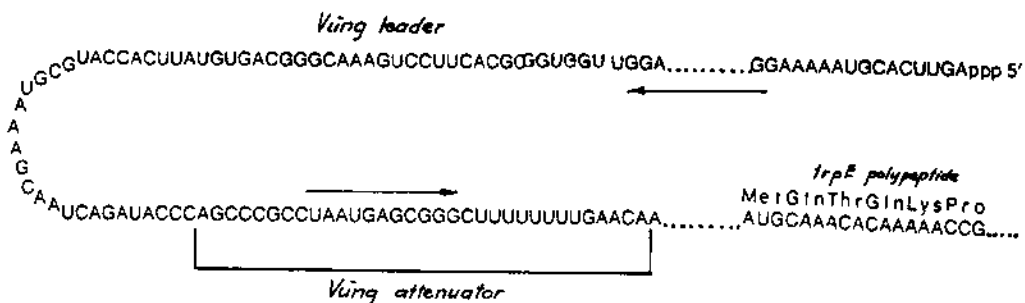
b) Attenuation

Kiểu điều hòa thứ hai được phát hiện ở operon tryptophan được gọi là **attenuation** (sự giảm bớt tính tiết). Ở đầu 5' của mRNA đa gen (polycistronic) của operon này có 162 base nằm phía trước đoạn mã hóa cho 5 enzyme. Đoạn này được gọi là **trình tự leader** (trình tự lãnh đạo). Một phần của trình tự này được phiên mã tạo leader peptide gồm 14 amino acid, mà chức năng đến nay chưa rõ.

Cơ chế kiểm tra, mà trong đó sự tổng hợp mRNA được bắt đầu nhưng kết thúc sớm với chiều dài mRNA ngắn hơn được gọi là **attenuation**. Ví dụ, các tế bào *E.coli* đang tăng trưởng trong môi trường thiếu một amino acid nào đó, nhưng chứa đủ các enzyme cần có cho sự tổng hợp của tất cả 20 amino acid cần thiết để tạo ra protein. Nhưng sự thêm 1 amino acid như tryptophan vào môi trường sẽ làm giảm đáng kể sự tổng hợp của các enzyme cần cho sự tạo amino acid đó. Phản ứng này có tính thích ứng và duy trì các nguồn enzyme, bởi vì các enzyme không còn cần nữa khi sản phẩm cuối của chuỗi sinh tổng hợp (tryptophan) đang có trong tế bào (ức chế ngược).

Operon tryptophan có phương thức điều hòa hoạt động gen thứ hai, hoàn toàn **độc lập** với hệ thống repressor - operator (chất kìm hãm - đoạn điều hành). Ở operon tryptophan, sự tổng hợp mRNA bắt đầu từ 161 base trước codon khởi sự của *trpE*, enzyme cấu trúc đầu tiên được phiên mã (hình 7.8). Đột biến do mất đoạn DNA ngay phía trước *trpE*, giải phóng *trpE* khỏi sự kìm hãm của phức hợp repressor - operator. Các đột biến này làm tăng mức biểu hiện của cả operon lên gấp 6 lần. Sự tinh sạch các DNA được phiên mã in vitro cho thấy phần lớn mRNA kết thúc ở ngay **base 139** và không bao giờ đạt tới *trpE*. Ở đây có sự **kìm hãm phiên mã** ngay trước gen cấu trúc và

khi mất nó sự biểu hiện của gen có hiệu quả hơn. Đoạn dài của mRNA nằm trước *trpE* được gọi là *leader* (*trpL*) và đoạn kìm hãm phiên mã gọi là *attenuator* (*trpa*, chứ không phải *trpA*). Cuối cùng, quan sát cho thấy sự kết thúc dịch mã (attenuation) dao động theo nồng độ của tryptophan. Trong các điều kiện nồng độ tryptophan thấp, nhiều phân tử mRNA được tạo ra hơn vượt qua attenuator và toàn bộ operon được phiên mã. Attenuation là một phương thức khác kiểm soát sự biểu hiện của gen.



Hình 7.8. Một đoạn của operon *trp* có leader, attenuator và một phần *trpE*

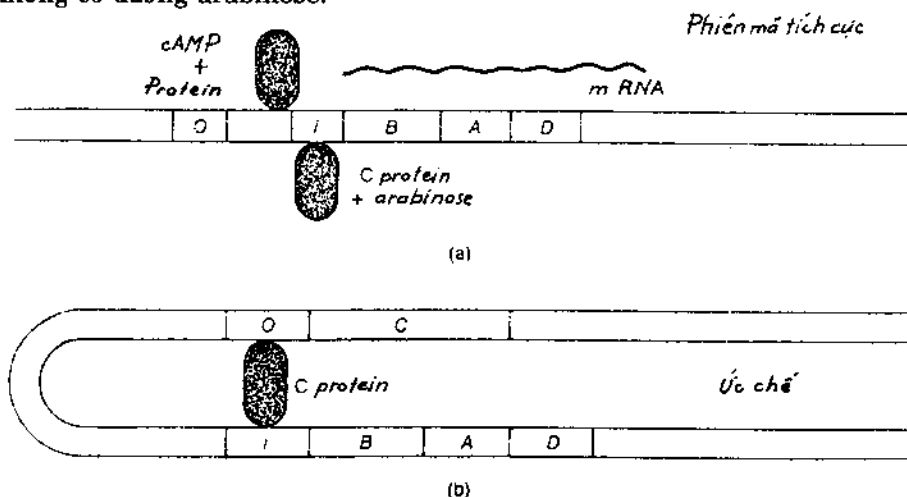
Cơ chế attenuation thực hiện sự kết hợp giữa phiên mã và dịch mã. RNA polymerase bắt đầu phiên mã các gen mã hóa cho các enzyme sinh tổng hợp cần thiết để tạo ra tryptophan. Ví dụ, khi hiện diện tryptophan nó nhanh chóng đạt tới điểm, trên RNA mới được tổng hợp, gọi là *attenuator* và dừng phiên mã tại đây.

Attenuator có chức năng như điểm kết thúc chỉ khi tryptophan hiện diện. Vì sao như vậy? Cần nói thêm rằng các trình tự do codon lặp lại ở phía trước mRNA, được gọi là trình tự *leader* (dẫn). Sự phiên mã dừng khi trình tự leader đạt attenuator. Nếu có đủ tryptophan trong tế bào, sự dịch mã của các codon được thực hiện, và cả phiên mã và dịch mã được thực hiện trơn tru cho đến lúc RNA polymerase đạt đoạn attenuator, nơi kết thúc sự phiên mã. Khi không có tryptophan, dịch mã ngừng và phần leader của mRNA cuộn lại sao cho attenuator không thực hiện chức năng. Trong trường hợp này, sự tổng hợp của mRNA toàn vẹn cho operon tryptophan có thể thực hiện hoàn toàn, tất cả các enzyme trao đổi chất tryptophan được tạo ra. Với sự hiện diện của các enzyme đó, tryptophan được trữ với số lượng lớn trong tế bào. Attenuation là *dạng tinh tế* của sự ức chế, điều hòa hoạt động gen, tạo đặc hiệu cho sự tổng hợp amino acid trong tế bào.

Cơ chế repressor điều hòa thô hệ thống tryptophan, trong khi đó cơ chế attenuation kiểm soát nồng độ tryptophan một cách tinh tế. Attenuation của operon *Trp* cũng nhạy cảm với nồng độ của một số amino acid khác với tryptophan. Các operon liên quan đến các amino acid như histidine và leucine, có lẽ được điều hòa chỉ bởi attenuation.

5. Kiểm soát dương và cảm ứng

Cơ chế điều hòa dương, cảm ứng được tìm thấy ở *operon arabinose* của *E.coli* (hình 7.9). Arabinose là chất đường, cần ba enzyme (được mã hóa do các gen *araB*, *araA* và *araD*) cho sự biến dưỡng. Hai gen khác nằm xa operon góp phần đưa arabinose vào tế bào. Gen điều hòa *araC* nằm gần các gen *BAD*. Sản phẩm của gen *araC* là **chất ức chế** (repressor) của operon khi không có đường arabinose.



Hình 7.9. Điều hòa dương tính, cảm ứng của operon arabinose

a) Khi hiện diện arabinose, protein *araC* gắn vào vùng *araI* và đồng thời *cAMP* và protein gắn vào vùng kế cận. Hoạt động này kích thích sự phiên mã của các gen *araB*, *araA* và *araD*.

b) Khi không có arabinose, protein *araC* gắn cả vào 2 vùng *araI* và *araO*, làm dừng phiên mã các gen *araB*, *araA* và *araD*.

Tuy nhiên, khi có đường arabinose trong tế bào, nó gắn với repressor (protein *araC*) hình thành nên **phức hợp activator** (hoạt hóa) tạo thuận tiện cho sự phiên mã của RNA polymerase.

Trên thực tế, các nghiên cứu cho thấy cơ chế điều hòa này rất phức tạp. Ví dụ : *cAMP* (cyclic adenosine monophosphate) và protein hoạt hóa thoái dưỡng (Catabolite gene activator protein) còn được gọi là *CRP* (cyclic AMP receptor protein - protein thể nhận *cAMP*) đều tham gia vào sự điều hòa của hệ thống arabinose.

IV. ĐIỀU HÒA HOẠT TÍNH GEN CỦA *EUKARYOTAE*

Các cơ chế điều hòa ở *Eukaryotae* có thể xảy ra ở 5 - 6 mức độ khác nhau, được mô tả trên sơ đồ hình 7.3 phía trên. Trong phần này chỉ nhấn mạnh thêm một số đặc điểm của điều hòa hoạt động gen ở *Eukaryotae* :

– Ở các operon của *Prokaryotae*, các gen điều hòa và các promoter thường nằm gần nhau, nhưng ở *Eukaryotae* các gen điều hòa ít khi nằm gần các promoter do chúng kiểm soát.

– Các enhancer là những trình tự cùng nằm trên một phân tử với các promoter có thể có hàng trăm cặp base ở phía trước hoặc ở phía sau promoter mà chúng kích thích.

– Trình tự điều hòa 5' ở phía trước có promoter ở *Eukaryotae* thường rất dài, có khi hàng chục Kb.

– Có nhiều kiểu điều hòa ở dạng các nhân tố có tác động *trans* là các protein.

Sự phiên mã có thể được kích thích bởi các tín hiệu khác nhau. Sự điều hòa hoạt động gen ở *Prokaryotae* phần lớn đáp lại *tín hiệu bên ngoài* (exogenous signal). Phần lớn sự điều hòa ở *Eukaryotae* là đáp lại các *tín hiệu bên trong*.

1. Các promoter

Tương tự như ở vi khuẩn, các promoter của *Eukaryotae* cũng nằm phía trước điểm xuất phát của mRNA và có những trình tự được bảo tồn trong tiến hóa. Hộp *TATA*, định hướng cho RNA polymerase bắt đầu phiên mã, nằm khoảng dưới 30 bp ở động vật có vú và 60 đến 120 ở nấm men. Hộp *TATA* hoạt động có hiệu quả cùng với hai trình tự tương ứng phía trước khoảng 40 bp là *CCAAT* và 110 bp là trình tự giàu GC.

_____ GGGCGGG _____ CCAAT _____ TATA _____ <u>mRNA</u>
– 110 bp – 40 bp – 30 bp 1

Sự thay đổi hộp *TATA* làm giảm tốc độ phiên mã. Hiệu quả của tốc độ phiên mã được đo bằng sự thay đổi của từng base trong promoter. Các thay đổi base ngoài hộp *TATA* và các trình tự phía trước không gây hiệu quả đối với độ phiên mã, trong khi đó các thay đổi ở những phần tử được nêu trên làm giảm đáng kể tốc độ phiên mã. Khác với promoter của *Prokaryotae*, các promoter của *Eukaryotae* khó đảm bảo sự nhận biết các tín hiệu một cách đầy đủ để RNA polymerase khởi sự phiên mã in vivo. Hộp *TATA* và các trình tự phía trước phải được nhận biết bởi các protein điều hòa, và chính các protein này gắn với các điểm nhất định trên chúng và hoạt hóa sự phiên mã.

2. Các enhancer

Enhancer (trình tự tăng cường) là các trình tự có tác động *cis* (đều phía), chúng tăng tốc độ phiên mã đáng kể từ các promoter nằm ngay trên cùng một phân tử DNA. Tính độc đáo của các enhancer là ở chỗ chúng có khả năng thực hiện hiệu quả của chúng ở khoảng xa có khi đến vài nghìn cặp base. Ngoài ra, chúng có hoạt động chức năng ở bất kì hướng nào, dù ở phía trước hay phía sau promoter.

Xét một số mặt nào đó, các enhancer tương tự promoter. Cụ thể, chúng được tổ chức gồm một dãy các trình tự có tác động *cis* để nhận biết các nhân tố tác động *trans* (hình 7.12 phía sau).

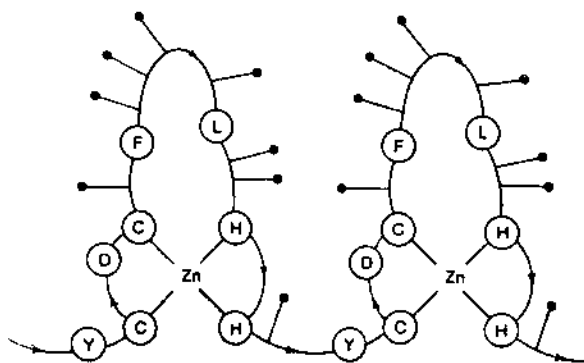
3. Các protein là nhân tố có tác động *trans*

Một vài protein, nhận biết hộp CCAAT, đã được xác định ở tế bào động vật có vú. Các nhân tố này có thể được phân biệt giữa các đơn vị của các phân tử CCAAT. Các hộp GC được nhận biết bởi những nhân tố phụ. Các ví dụ về *tác động trans* (trans - acting factor) đã tìm thấy ở nấm men và động vật có vú. Các nhân tố trans có đặc điểm chung là gồm ít nhất hai vùng cấu trúc và chức năng chính :

- Vùng gắn nhân tố *trans* vào DNA.
- Vùng tác động lên sự phiên mã.

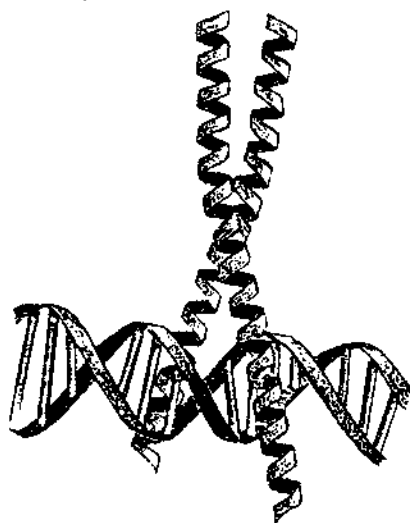
Các nhân tố trans có bốn kiểu tác động như :

- “ngón tay kẽm” (zinc-finger) (hình 7.10).
- “xoắn-vòng - xoắn” (helix-turn-helix)
- “xoắn-nút-xoắn” (helix-loop-helix)
- “dây kéo leucine” (leucine-zipper) (hình 7.11).



Hình 7.10. Tương tác “ngón tay kẽm”

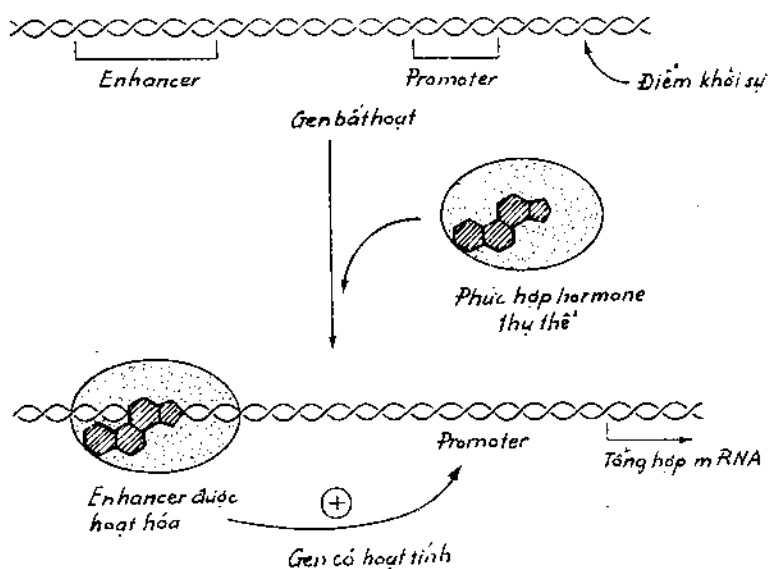
Các ion Zn gắn các đầu mút với nhau, làm 12 gốc ở giữa tạo thành vòng gắn DNA như “ngón tay”. Các chấm đen có thể là các điểm gắn với DNA.



Hình 7.11. Tương tác “dây kéo leucine”

Đặc tính chung của các cấu trúc vừa kể là chúng luôn luôn gắn lên các trình tự *cis* dưới dạng dimer (gồm hai monomer).

Giữa trình tự *cis* và nhân tố *trans* thường có các tương tác đặc hiệu do những liên kết yếu hình thành giữa các phân tử của nhân tố *trans* với các base của trình tự *cis*. Ví dụ, trường hợp tương tác giữa các hormone steroid với các enhancer (hình 7.12).



Hình 7.12. Sự tương tác của hormone steroid với trình tự enhancer

Hormone glucocorticoid gắn vào protein thụ thể hòa tan.

Phức hợp này lại gắn vào các trình tự enhancer kích thích sự phiên mã.

Nhiều protein có tác động *trans* tham gia vào tiến trình phát triển của cơ thể *Drosophila*, chúng có vai trò đặc biệt trong xác định sự sắp xếp các đoạn thân của ruồi.

Như vậy, các gen của *Eukaryotae* được hoạt hóa bởi hai trình tự DNA có tác động *cis* là **promoter** và **enhancer**, chúng được nhận biết các nhân tố protein có **tác động trans**. Các nhân tố *trans* này cho phép RNA polymerase khởi sự phiên mã và đạt tốc độ phiên mã tối đa.

4. Hormone

Ví dụ rõ nhất về các chất điều hòa nội tại của hoạt tính gen là các hormone. Đó là những chất được tạo ra do một loạt tế bào mà có hiệu quả đến các tế bào khác. Các hormone thường được vận chuyển đến các phần của cơ thể nhưng chỉ tác động đến các tế bào có các thụ thể (receptor) tương ứng.

Sự tương tác giữa hormone với thụ thể gây ra tín hiệu tác động đến các vùng đặc hiệu của DNA, làm **hoạt hóa gen** hoặc nhóm gen tương ứng.

Các hormone có thể kích thích phiên mã bởi một trong các cơ chế sau :

- Hormone có thể làm cho DNA tách khỏi histone và tạo điều kiện cho RNA polymerase bắt đầu phiên mã.

- Có thể làm **chất cảm ứng** (inducer) gây bất hoạt phân tử receptor.

- Có thể gắn trực tiếp với đoạn DNA đặc hiệu tạo thuận lợi cho sự gắn RNA polymerase hoặc protein là nhân tố phiên mã (protein transcription factor).

- Có thể **hoạt hóa effector protein** làm thành phức hợp gắn lên DNA và kích thích sự gắn RNA polymerase.

- Có thể gắn với protein tạo **phức hợp hoạt hóa** kích thích sự gắn RNA polymerase.

Tác động của hormone cái estrogen là một ví dụ về tín hiệu hormone. Ở ống dẫn trứng của gà, protein lòng trắng ovalbumin được tổng hợp đặc biệt để đáp lại estrogen, là chất làm tăng phiên mã của gen ovalbumin. Phân tử estrogen hoạt hóa phiên mã bằng cách gắn vào DNA ở điểm enhancer, đồng thời với thụ thể protein (protein receptor) trước đó, thụ thể nhận biết estrogen trong tế bào chất và vận chuyển nó vào nhân tế bào.

5. Sự kiểm soát các chất thường gặp trong nhân

Một số nhóm phân tử hiện diện rất nhiều trong mỗi tế bào *Eukaryotae*, như các histone, các chất của bộ máy dịch mã, các cấu phần của màng, và tương tự. Vài chương trình khác nhau được thực hiện để duy trì số lượng đủ lớn của chúng trong tế bào. Các chương trình đó gồm:

- Sự phiên mã liên tục và lặp lại trong chu trình tế bào.

- Sự lặp lại các gen.

- Sự khuếch đại ngoài nhiễm sắc thể của các trình tự gen đặc hiệu.

a) Sự đổi đào

Các gen mã hoá cho rRNA và tRNA đã được nghiên cứu kĩ. Sự lai đơn giản DNA - RNA cho thấy nhiễm sắc thể của loài lưỡng cư *Xenopus* có vùng tổ chức hạch nhân (nucleolus organizer) chứa 450 bản sao của DNA mã hóa cho rRNA 18 S và 28 S. Ngược lại, trong mỗi nhân có

20.000 bản sao của các gen mã hóa cho rRNA 5 S và các gen này không nằm ở vùng tổ chức hạch nhân.

Các gen mã hóa cho histone cũng có với nhiều bản sao được lặp lại hàng trăm lần.

Sự dồi dào của các gen nêu trên đảm bảo đủ số lượng cần thiết cho dịch mã khi phải tổng hợp hàng triệu phân tử protein lúc cần.

b) Sự khuếch đại gen

Một ví dụ về sự khuếch đại gen trong nhân là các **chỗ phình** (puff) của nhiễm sắc thể khổng lồ hay đa sợi (polytene chromosome) ở tuyến nước bọt của *Drosophila*. Ở các chỗ phình này, **DNA nguyên nhiễm sắc** (euchromatic) được khuếch đại khoảng nghìn lần.

Trong nhân tế bào trứng của loài lưỡng cư *Xenopus*, có hàng trăm **nhân con ngoài nhiễm sắc thể** (extrachromosome nucleoli) với kích thước khác nhau. Mỗi nhân con chứa các vòng tròn rDNA kích thước khác nhau, mà vai trò đến nay chưa rõ. Các DNA vòng tròn này sản sinh nhiều rRNA để ráp thành nhiều ribosome.

Nhìn chung, sự biểu hiện của các gen ở *Eukaryotae* rất phức tạp. Vấn đề lớn hiện nay của sự kiểm soát phiên mã là làm sao hiểu được bằng cách nào mà hàng nghìn promoter được điều hòa để tạo ra các mRNA ở mức hợp lí. Nhiều vấn đề được nêu rõ hơn ở các chương sau.

V. SỰ BIỆT HÓA TẾ BÀO

Biệt hóa tế bào là vấn đề rất phức tạp cần có sự tham gia nghiên cứu của nhiều bộ môn sinh học như phôi học (Embryology), sinh hóa học (Biochemistry), sinh học phân tử và di truyền học. Các nghiên cứu về cơ chế điều hòa giúp làm sáng tỏ được nhiều vấn đề căn bản.

1. Các tế bào biệt hóa chứa thông tin như nhau

Ở các sinh vật bậc cao cũng như ở người, cơ thể trưởng thành gồm nhiều loại tế bào khác nhau. Các tế bào này đều bắt nguồn từ một hợp tử ban đầu, nhưng đã qua quá trình biệt hóa làm các chức năng khác nhau. Tuy nhiên thực nghiệm xác định rằng **số lượng nhiễm sắc thể, số lượng DNA** và cả **tỉ số A+ T/G+C** của các tế bào thuộc các mô khác nhau của cùng một cơ thể đều **giống nhau**. Sử dụng kĩ thuật **lai DNA** cho thấy DNA từ những tế bào của các mô khác nhau của cùng một cá thể không bị biến đổi trong quá trình biệt hóa, chúng có thể tự hồi tính (renaturation) với nhau.

Thí nghiệm **ghép nhân** tế bào ruột ếch vào tế bào trứng bị hỏng nhân (do chiếu tia tử ngoại) cho thấy 1% tế bào có ghép nhân phát triển đến ếch trưởng thành. Điều này chứng tỏ tế bào ruột tuy đã biệt hóa vẫn giữ **nguyên vẹn thông tin** di truyền tạo ra ếch trưởng thành.

Tóm lại, số lượng DNA của các tế bào biệt hóa về căn bản giống với của hợp tử ban đầu và chứa nguyên thông tin di truyền đủ để phát triển thành cá thể nguyên vẹn .

2. Các tế bào biệt hóa tổng hợp các nhóm protein khác nhau

Để hiểu được sự khác nhau giữa các tế bào biệt hóa, cần xét nhiều vấn đề sau.

Thứ nhất, nhiều quá trình là chung cho tất cả các tế bào nên có nhiều protein giống nhau. Những protein này gồm số có số lượng nhiều, dễ phân tích như phần lớn các **protein cấu trúc** của vách tế bào và nhiễm sắc thể ; một số **protein căn bản** của các bào quan (lưới nội chất, bộ Golgi, các ribosome,...) . Nhiều protein có số lượng không nhiều như **các enzyme** khác nhau, tham gia vào **các phản ứng trung tâm** của quá trình trao đổi chất, đều hiện diện như nhau ở tất cả các kiểu tế bào.

Thứ hai, một số protein có số lượng dồi dào ở một số tế bào **chuyên hóa** mà việc phát hiện chúng cần có thử nghiệm riêng. Ví dụ, hemoglobin chỉ có thể phát hiện ở tế bào máu.

Thứ ba, nếu như hơn 2000 loại protein có số lượng dồi dào được so sánh giữa các kiểu tế bào biệt hóa của cùng một sinh vật với nhau bằng điện di hai chiều trên gen polyacrylamide (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis), một số khác biệt đáng kể được tìm thấy. Dù sự so sánh giữa 2 dòng tế bào nuôi cấy (như các dòng tế bào cơ và thần kinh) hay giữa các tế bào của cùng một mô của chuột (như gan và phổi), đại đa số các protein được phát hiện đều được tổng hợp ở cả 2 loại tế bào và với tốc độ tổng hợp có thể khác nhau đến 10^5 ; chỉ có vài phần trăm protein hiện diện với số lượng khác nhau đáng kể ở hai kiểu tế bào.

Các nghiên cứu cho thấy các tế bào *Eukaryotae* bậc cao tổng hợp từ 10.000 đến 20.000 protein khác nhau. Phần lớn chúng có số lượng rất ít và khó phát hiện. Nếu các **protein hiếm** (minor protein) này khác nhau giữa các tế bào với mức độ tương tự như các protein dồi dào, thì chỉ một số lượng nhỏ của chúng cũng đủ tạo nên nhiều khác biệt chuyên hóa lớn về hình thái và sinh lí của tế bào.

Tế bào có thể thay đổi sự biểu hiện gen của chúng để đáp lại tín hiệu bên ngoài.

Phần lớn các *tế bào chuyên hóa* của sinh vật đa bào có khả năng thay đổi phương thức biểu hiện của gen để đáp lại tác động bên ngoài. Ví dụ, nếu tế bào gan bị tác động bởi glucocorticoid hormone, thì sự tổng hợp một số protein chuyên biệt được tăng vọt. Glucocorticoid được phóng thích ra trong lúc đói hay hoạt động mạnh và báo hiệu cho gan tăng cường tạo ra glucose từ amino acid hay các phân tử nhỏ khác. Các protein, được tạo ra do các enzyme cảm ứng như tyrosine aminotransferase hỗ trợ biến tyrosine thành glucose. Khi hormone không còn nữa, sự tổng hợp các protein này hạ xuống mức bình thường.

Các loại tế bào khác nhau phản ứng với glucocorticoid bằng nhiều cách khác nhau. Ví dụ ở tế bào mỡ, sự tổng hợp tyrosine transferase giảm, trong khi đó một số loại tế bào khác hoàn toàn không có phản ứng với glucocorticoid. Các ví dụ này minh họa cho tính chất chung của biệt hóa là các kiểu tế bào biệt hóa khác nhau thường phản ứng lại cùng một tín hiệu bên ngoài bằng nhiều cách khác nhau. Trên cơ sở đó, mỗi kiểu tế bào biệt hóa có một đặc tính ổn định thường xuyên. Các tính chất đó phản ánh sự biểu hiện lâu bền của các nhóm gen khác nhau.

Như vậy, các tế bào biệt hóa chỉ sử dụng một phần thông tin. Nhiều loại *tế bào chuyên hóa* tổng hợp chủ yếu một số protein, ngoài các protein cấu trúc và các protein cần bản sử dụng cho các quá trình sinh lí bình thường. Ví dụ: Tế bào cơ tổng hợp nhiều myosin, một protein quan trọng trong co cơ, hay tế bào biểu bì (epithelial) tổng hợp nhiều keratine. Như vậy cùng chứa thông tin di truyền như nhau, nhưng mỗi loại tế bào biệt hóa chỉ sử dụng *một phần thông tin* : tổng hợp chủ yếu một số loại protein.

3. Sự điều hòa ở mức phiên mã là nguồn gốc căn bản của các sai khác giữa những tế bào biệt hóa

Nếu những sự biệt hóa giữa các kiểu tế bào khác nhau phụ thuộc vào các gen chuyên biệt mà tế bào biểu hiện, thì sự kiểm soát biểu hiện gen được thực hiện ở mức nào ?

Giả thuyết được chấp nhận hiện nay là trong các tế bào biệt hóa một số gen phiên mã, còn các gen khác thì không. Không có sự kiện nào mâu thuẫn với giả thuyết này và nó giải thích hợp lí hơn cả tình trạng biệt hóa của các tế bào. Đối với phần lớn gen, sự *kiểm soát phiên mã* có tầm quan trọng hàng đầu, vì chỉ nó mới đảm bảo cho sự tổng hợp không dư thừa các chất trao đổi trung gian.

Việc phát hiện các gen điều hòa và các gen đóng hay mở giúp hiểu được sự điều hòa quá trình phát triển cá thể và biệt hóa tế bào. Bộ gen đơn bội của tế bào người có số lượng DNA nhiều hơn gấp 1000 lần so với bộ gen

của vi khuẩn. Tuy nhiên, số lượng gen cấu trúc ở người chỉ gấp hơn 10 lần số gen cấu trúc vi khuẩn. Điều đó cho thấy rất nhiều gen ở người tham gia vào các cơ chế điều hòa.

Tóm lại, bộ gen của tế bào chứa các trình tự nucleotide của DNA thông tin để tạo ra hàng nghìn các protein và phân tử RNA khác nhau. Tế bào chỉ biểu hiện điển hình một nhóm gen của nó và các kiểu tế bào biệt hóa khác nhau ở sinh vật đa bào được sản sinh ra do các nhóm gen khác nhau có sự biểu hiện không giống nhau. Hơn thế nữa, các tế bào có thể thay đổi **phương thức biểu hiện các gen** của chúng để đáp lại những thay đổi của môi trường, các tín hiệu đó từ các tế bào khác. Mặc dù tất cả các bước trong sự biểu hiện của gen về căn bản đều được điều hòa, nhưng đối với phần lớn các gen việc khởi sự phiên mã là điểm kiểm soát quan trọng nhất.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các quá trình điều hòa trong cơ thể hết sức phức tạp. Sự điều hòa biểu hiện gen được thực hiện ở nhiều mức khác nhau : ở sợi chromatine, phiên mã, sau phiên mã, dịch mã, sau dịch mã. Bộ máy di truyền không những có các **gen cấu trúc** mà còn có cả các **gen điều hòa**. Có những **gen cơ cấu** hoạt động thường xuyên, có những **gen chịu sự điều hòa**.

Nhiều gen cấu trúc tập hợp trong các **operon** đảm bảo cho một **chuỗi phản ứng** nhất định. Các **promoter** giữ vai trò quan trọng trong các cơ chế điều hòa. Việc điều hòa thoái dưỡng và biến dưỡng có thể được thực hiện theo kiểu tác động **âm** hay **dương** và **ức chế** hay **kích thích**.

Ở các **Eukaryotae** có nhiều cơ chế điều hòa phức tạp như : các **nhân tố cis** (enhancer), các **nhân tố trans**, các hormone. Ngoài ra còn có sự di chuyển của một số gen và sự khuếch đại một số gen cần thiết cho hoạt động của tế bào. **Sự biệt hóa tế bào** được thực hiện chủ yếu **sự điều hòa ở mức phiên mã**.

Nhờ các cơ chế điều hòa, cơ thể thực hiện đều đặn và hợp lý chương trình phát triển cá thể và thích nghi với điều kiện ngoại cảnh.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Sự biểu hiện của gen ở *Prokaryotae* và *Eukaryotae* có các đặc điểm gì ?
2. Giải thích vì sao đột biến I⁻ trong hệ thống lac bình thường là lặn đối với I⁺ và vì sao I⁺ là lặn đối với các đột biến I^s.

3. Chúng ta có ngụ ý gì khi nói đột biến ở O^c trong hệ thống *lac* là trội *cis* ?
4. Hãy kể các kiểu điều hòa chủ yếu.
5. Operon tryptophan hoạt động như thế nào ?
6. Giải thích sự khác nhau căn bản giữa kiểm soát âm và dương.
7. Các đột biến *lac I*⁻ mất khả năng tổng hợp β-galactosidase. Tuy nhiên, thậm chí khi *lac I* nguyên vẹn, β-galactosidase không được tiếp tục tạo ra, khi thêm lactose vào môi trường. Giải thích điều này như thế nào ?
8. Attenuation có ý nghĩa gì ?
9. Nêu ví dụ về tác động *cis*.
10. Hormone có tác động như thế nào ?
11. Có sự tương đồng nào giữa các nhân tố phiên mã tác động *trans*, mà chúng hoạt hóa sự biểu hiện của gen ở *Eukaryotae* và *Prokaryotae* ? Nêu ví dụ.
12. So sánh sự sắp xếp các điểm có tác động *cis* trong các vùng kiểm soát ở *Eukaryotae* và *Prokaryotae*.
13. Vì sao từ một hợp tử ban đầu dần dần hình thành khoảng 200 loại tế bào khác nhau ở người ?
14. Các tế bào biệt hóa có chứa thông tin như nhau không ?
15. Vì sao nói sự biệt hóa tế bào xảy ra ở mức phiên mã ?

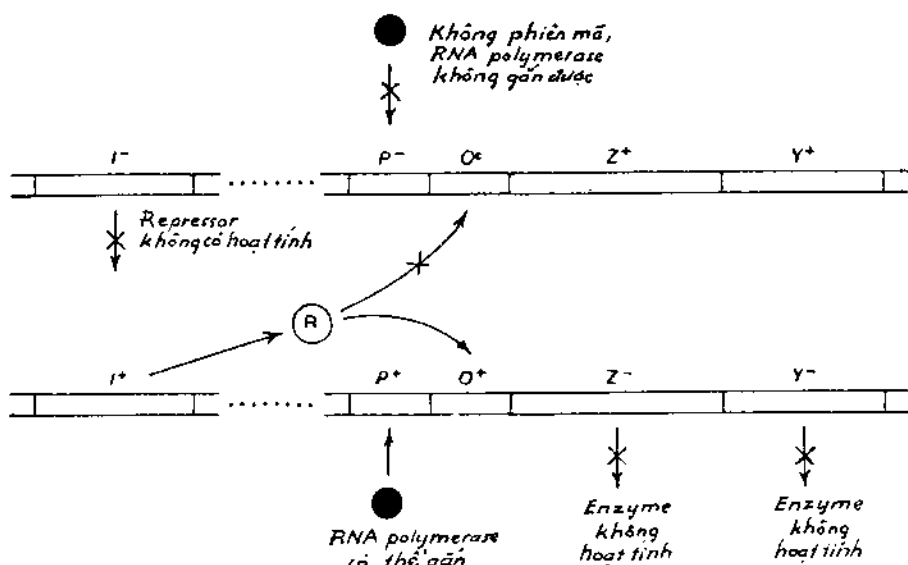
BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Một sinh vật lưỡng bội có kiểu gen :
$$\frac{I^-P^-O^CZ^+Y^+}{I^+P^+O^+Z^-Y^-}$$

Hãy xác định sản phẩm của gen Z và Y được tạo ra trong sự hiện diện hay vắng mặt của chất cảm ứng.

Lời giải

Trước tiên mô tả mỗi đoạn nhiễm sắc thể riêng lẻ ở dạng sơ đồ sau :



Hình 7.13

Nhiệm sắc thể thứ nhất là P^- , nên enzym *lac* không được tổng hợp. Nhiệm sắc thể thứ hai có O^+ nên có thể phiên mã, và sự phiên mã này là ức chế (repressible). Tuy nhiên, các gen cấu trúc gắn với promotor tốt đều bị hỏng. Do vậy, sản phẩm có hoạt tính của Z hay Y không thể được tạo ra.

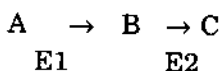
BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Bản đồ của operon *lac* là IPOZY, vùng promoter (P) là điểm xuất phát của phiên mã do RNA polymerase gắn vào trước khi tổng hợp mRNA. Các đột biến (P^-) làm RNA polymerase không gắn vào được. Có thể dự kiến những tình huống nào có thể xảy ra do tác động của các đột biến P. Sử dụng các dự kiến đó và kết hợp với sự hiểu biết về hệ thống lactose, hãy điền vào bảng sau, với dấu - khi enzyme không được tạo ra.

Mẫu	Kiểu gen	β -galactosidase		Permease	
		có lactose	không lactose	có lactose	không lactose
Ví dụ	$I^- P^+ O^+ Z^+ Y^+ / I^- P^- O^+ Z^+ Y^+$	+	-	+	-
a	$I^- P^- O^+ Z^+ Y^+ / I^- P^+ O^+ Z^- Y^+$				
b	$I^- P^- O^- Z^- Y^- / I^- P^- O^+ Z^- Y^-$				
c	$I^- P^+ O^+ Z^- Y^- / I^- P^- O^+ Z^- Y^-$				
d	$I^- P^- O^+ Z^- Y^- / I^- P^- O^+ Z^- Y^-$				

e	$I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+ / I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+$				
f	$I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+ / I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+$				
g	$I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+ / I^+ P^+ O^+ Z^+ Y^+$				

2. Ở một sinh vật *Eukaryotae* đơn bội, chúng ta nghiên cứu 2 enzyme thực hiện các phản ứng nối tiếp chuyển hóa chất dinh dưỡng A :



Khi xử lý tác nhân gây đột biến đối với các tế bào, có 3 loại đột biến khác nhau theo chức năng được tạo ra. Các thể đột biến nhóm I không có chức năng E1. Tất cả đột biến nhóm I này nằm trên 1 locus của nhiễm sắc thể II. Các thể đột biến nhóm II không có chức năng E2 và nằm trên một locus của nhiễm sắc thể VIII. Các thể đột biến nhóm III không có chức năng của cả E1 và E2 và nằm trên 1 locus của nhiễm sắc thể I.

a) So sánh hệ thống này với operon lac ở *E.coli* và chỉ ra sự giống nhau và khác nhau.

b) Nếu tăng cường tìm thêm đột biến, có thể phát hiện thêm kiểu đột biến khác theo sơ đồ giải thích của bạn vừa nêu trên không ? Giải thích.

3. Ở *Neurospora*, tất cả các thể đột biến có tác động đến các enzym carbamyl phosphate synthetase và aspartate transcarbamylase, thuộc locus *pyr-3*. Nếu gây tạo các đột biến *pyr-3* bằng PCR-170 – tác nhân gây đột biến hóa chất tạo đột biến mất xen đoạn (frame-shift mutation), sẽ thấy cả 2 chức năng của enzym đều mất hoặc chỉ mất chức năng của transcarbamylase không có trường hợp nào hoạt tính synthetase bị mất khi hiện diện hoạt tính transcarbamylase.

Giải thích kết quả theo quan điểm operon.

4. Đối với các thể lưỡng bội từng phần sau đây, xác định xem sự hình thành enzym là cơ cấu hay cảm ứng :

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| a) $i^+ / i^+, o^+ / o^+$ | d) $i^+ / i^-, o^+ / o^+$ |
| b) $i^+ / i^+, o^+ / o^-$ | e) $i^- / i^-, o^+ / o^+$ |
| c) $i^+ / i^+, o^- / o^-$ | |

5. Repressor của operon cảm ứng có hai điểm gắn.

- Tính đặc hiệu của 2 điểm gắn đó như thế nào?
- Kể 4 kiểu đột biến gen có thể làm thay đổi chức năng của repressor đó.

6. Kể 2 kiểu đột biến gen có thể làm thay đổi chức năng của operator.

PHẦN III

BIẾN DỊ

Biến dị biểu hiện ở *sự khác nhau* giữa các cá thể. Nhờ có biến dị, chủ yếu là các đột biến, chúng ta mới nghiên cứu được các cơ chế di truyền.

Biến dị là quá trình phản ánh mối tương quan của cơ thể với môi trường. Xét từ quan điểm di truyền học, biến dị cũng là kết quả của phản ứng giữa kiểu gen trong quá trình phát triển cá thể đối với các điều kiện của môi trường ngoài.

Biến dị là một trong ba nhân tố tiến hóa chủ yếu. Nó cũng là nguồn *nguyên liệu* cho chọn lọc tự nhiên và chọn lọc nhân tạo.

Ngay sau khi các quy luật Mendel được phát minh lại, năm 1903 De Vries đã nêu danh từ *đột biến* (mutation) để chỉ các biến dị di truyền xảy ra đột ngột. Ông cũng đã xây dựng lên "*Thuyết đột biến*".

Năm 1925, hai nhà khoa học của Viện Phóng xạ ở Leningrad là G.A.Nadson và G.S.Philopov lần đầu tiên trên thế giới đã nhận được các đột biến ở nấm men dưới ảnh hưởng của phóng xạ radi. Năm 1927, G.Muller đã chứng minh tia X làm tăng đáng kể tần số đột biến ở ruồi giấm. Năm 1928, Stadler đã nhận được các đột biến tia X ở bắp và đại mạch.

Vào những năm 40, tác dụng gây đột biến của một số hóa chất được chứng minh. Việc thu nhận các đột biến nhân tạo góp phần thúc đẩy nhanh sự phát triển của di truyền học và phần nào đó ứng dụng vào công tác chọn giống.

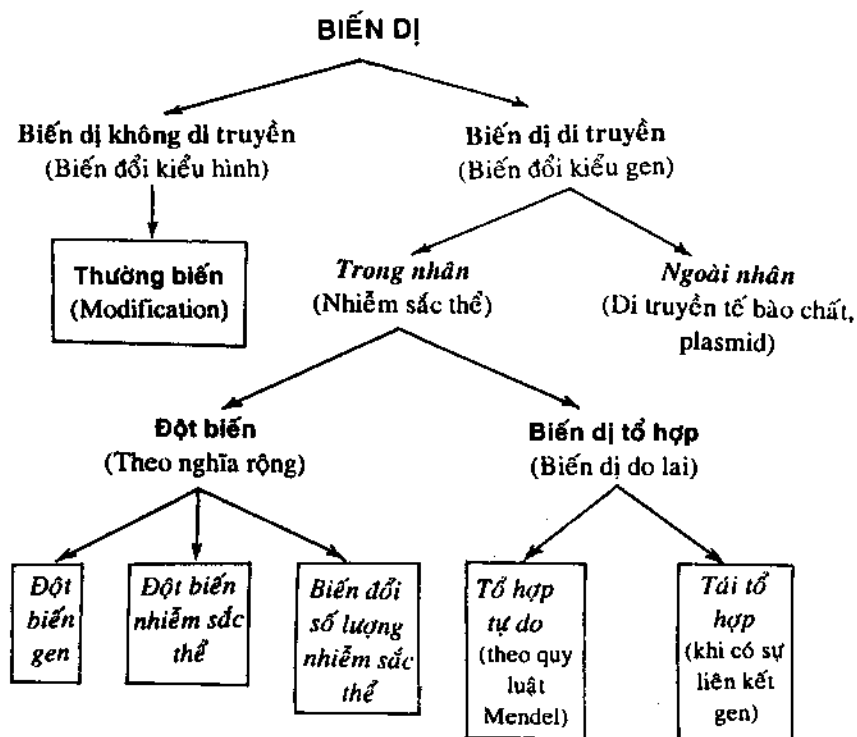
ĐỘT BIẾN GEN

Trong chương này, những vấn đề chung của biến dị và đột biến gen được trình bày. Việc phân loại các đột biến sẽ cho thấy đột biến có thể hiểu từ nhiều khía cạnh khác nhau. Các đột biến gen bắt nguồn từ những biến đổi phân tử trên DNA. Con người có thể sử dụng các tác nhân vật lí và hóa học gây nên các *đột biến nhân tạo* hay *cảm ứng*.

I. BIẾN DỊ KHÔNG DI TRUYỀN VÀ DI TRUYỀN

1. Sơ đồ khái quát

Thông thường, biến dị được chia thành biến dị di truyền và không di truyền. Biến dị di truyền là các *biến dị của kiểu gen* và được truyền cho các thế hệ sau. Biến dị không di truyền là *biến đổi của kiểu hình*, không được duy trì ở thế hệ sau. *Thường biến* là một kiểu biến dị không di truyền.



Hình 8.1. Sơ đồ các loại biến dị

Các biến dị di truyền phần lớn liên quan đến những biến đổi nhiễm sắc thể *trong nhân* tế bào, một số rất ít ở *ngoài nhân* (tế bào chất). Biến dị trong nhân có thể chia thành *biến dị tổ hợp* (do lai) và *biến dị đột biến*. Biến dị tổ hợp gồm 2 loại :

– *Tổ hợp tự do* khi các gen nằm trên các cặp nhiễm sắc thể tương đồng khác nhau.

– *Tái tổ hợp* khi có trao đổi chéo giữa các nhiễm sắc thể tương đồng.

Có thể biểu thị các loại biến dị theo sơ đồ trang 239 .

2. Thường biến

Thường biến (Modification) là những *biến dị không di truyền*, thường có tính *định hướng* do một tác động biết được và xảy ra đồng thời trên *nhiều cá thể*, Darwin gọi là *biến dị xác định*. Ví dụ : Trong chăn nuôi cung cấp nhiều thức ăn tốt thì các động vật nuôi to béo, tăng trọng nhanh.

Thường biến không di truyền nhưng mức độ biến đổi xảy ra trong một giới hạn nhất định gọi là *phạm vi phản ứng* (reaction norme). Ví dụ : Heo mọi nếu được cung cấp dư thừa thức ăn tốt cũng không lớn được bằng heo giống nhập nội. Phạm vi phản ứng do kiểu gen xác định nên cuối cùng các biến dị không di truyền vẫn chịu sự kiểm soát của các gen.

3. Biến dị tổ hợp

Biến dị tổ hợp có được do sự sắp xếp lại các gen khi lai. Sự sắp xếp lại đó có thể do tổ hợp tự do các gen khi chúng nằm trên các cặp nhiễm sắc thể khác nhau, có thể do tái tổ hợp khi các gen liên kết với nhau.

Biến dị tổ hợp là cơ sở của sự khác nhau giữa các cá thể sinh sản hữu tính cùng loài. Ví dụ: Tế bào người có 23 cặp NST. Với số lượng nhiễm sắc thể này, nếu không có tái tổ hợp thì ở người giảm phân sẽ tạo ra 2^{23} loại giao tử. Số tổ hợp từng ấy loại giao tử khi gặp nhau một cách ngẫu nhiên trong thụ tinh là 4^{23} (mà $4^{20} = 1.099.511.627.776$). Nếu thêm vào đây biến dị do tái tổ hợp thì con số sẽ lớn vô cùng. Do đó ta hiểu vì sao hiếm gặp 2 người hoàn toàn giống nhau, trừ sinh đôi cùng trứng.

Biến dị tổ hợp giữ vai trò quan trọng nhất trong tiến hóa vì chính nó tạo nên sự đa dạng di truyền đến mức không có hai cá thể hoàn toàn giống nhau.

Công tác lai tạo giống chủ yếu tạo ra nhiều biến dị tổ hợp để chọn lựa các dạng tốt nhất làm giống.

4. Quá trình đột biến tự nhiên

Đột biến theo nghĩa rộng chỉ các biến đổi di truyền xảy ra đột ngột. Từ xa xưa, con người đã nhận thấy nhiều đột biến tự nhiên. Nhiều giống cây trồng và vật nuôi bắt nguồn từ các đột biến. Một ví dụ thường được nhắc tới là giống cừu chân ngắn Ankon bắt nguồn từ dạng đột biến, được sinh ra năm 1791 ở nông trại Ankon bang Massachusettes (Mỹ).

Ở *Drosophila*, đột biến đầu tiên nhận được là mắt trắng *White*, sau đó hàng trăm đột biến khác được phát hiện.

Đột biến gen là đột biến được hiểu theo nghĩa hẹp, là chỉ những biến đổi xảy ra bên trong cấu trúc gen. Mỗi đột biến gen dẫn đến sự thay đổi trình tự nucleotide tạo ra các allele khác nhau. Đột biến có thể xảy ra do biến đổi nhiều nucleotide, có thể do 1 nucleotide. Đột biến gen không phát hiện được khi quan sát tế bào học.

Trong tự nhiên, dù giữ trong điều kiện nào, tất cả các gen đều có đột biến, được gọi là **đột biến tự nhiên** hay **ngẫu nhiên** (spontaneous mutation). Các đột biến tự nhiên thường xuất hiện rất ít. Khái niệm **tần số đột biến** được dùng để đánh giá mức độ xuất hiện nhiều hay ít đột biến ở một gen. Có người phân biệt **tần số** (frequency) với **tốc độ** (rate) đột biến.

Các gen khác nhau của cùng 1 sinh vật có thể có tần số đột biến khác nhau. Nhưng **tần số đột biến tự nhiên** đối với mỗi gen là một số **ổn định**.

Tần số đột biến được đánh giá theo các căn cứ khác nhau như: trên 1 lần sao chép, 1 lần phân bào hay trên 1 giao tử và trên 1 tế bào / 1 thế hệ (bảng 8.1):

BẢNG 8.1 : Tần số đột biến ngẫu nhiên của một số gen

Sinh vật	Đột biến	Tần số	Căn cứ đánh giá
Bacteriophage T2	Kìm hãm tan $r \rightarrow r^+$	1.10^{-8}	đột biến gen/1 lần sao chép
<i>E.coli</i>	Lên men lactose $lac \rightarrow lac^+$	2.10^{-7}	các tế bào đột biến / 1 lần phân bào
	$leu \rightarrow leu^+$	7.10^{-10}	đột biến /1 tế bào
	$arg^+ \rightarrow arg$	4.10^{-9}	đột biến /1 tế bào
	$trp^+ \rightarrow trp$	6.10^{-8}	đột biến /1 tế bào
	$ara^+ \rightarrow ara$	2.10^{-6}	đột biến /1 tế bào
	Kháng Streptomycine $Str^S \rightarrow Str^R$	4.10^{-10}	đột biến /1 tế bào

Sinh vật	Đột biến	Tần số	Căn cứ đánh giá
<i>Neurospora crassa</i>	adenine $ade^- \rightarrow ade^+$	4.10^{-8}	đột biến/ 1 bào tử vô tính
Bắp	$R \rightarrow r$ (đỏ $\rightarrow$ trắng) $C \rightarrow c$ (màu $\rightarrow$ trắng) $Wx \rightarrow wx$ (tẻ $\rightarrow$ nếp) $Y \rightarrow y$ (vàng $\rightarrow$ trắng)	$4,92.10^{-8}$ $2,2.10^{-6}$	đột biến/ 1 giao tử đột biến/ 1 giao tử đột biến/ 1 giao tử đột biến/ 1 giao tử
<i>Drosophila</i>	$W \rightarrow w$ $e^+ \rightarrow e$ $ey^+ \rightarrow ey$ (có mắt $\rightarrow$ không mắt)	1.10^{-6} 2.10^{-5} 6.10^{-5}	đột biến/ 1 giao tử đột biến/ 1 giao tử đột biến/ 1 giao tử

Để dễ hiểu các số trên có thể tính đảo ngược lại. Ví dụ 1 : Ở ruồi giấm thân xám bình thường (e^+) đột biến sang có thân màu đen hổ phách e (ebony) với tần số 2.10^{-5} , tức trong 10^5 giao tử có 2 đột biến từ $e^+ \rightarrow e$. Ví dụ 2 : Ở *E.coli* đột biến từ nhạy cảm với streptomycine sang kháng tức $Str^S \rightarrow Str^R$ với tần số 4.10^{-10} đột biến tính trên 1 tế bào/1 thế hệ. Để dễ hiểu ta có thể tính ngược lại tức trong 10 tỉ tế bào của một thế hệ có 4 đột biến Str^R (resistance) kháng streptomycine xuất hiện ngẫu nhiên.

Tuy tần số đột biến của từng gen là rất thấp, nhưng tổng các đột biến của nhiều gen là một số đáng kể, có ý nghĩa quan trọng cho tiến hóa.

Đột biến ảnh hưởng đến mọi tính trạng khác nhau của sinh vật và tác động theo mọi hướng.

Quần thể tự nhiên có nhiều sinh vật mang các đột biến lặn. Sự giao phối gần hoặc cận huyết dễ làm xuất hiện các đột biến lặn.

II. PHÂN LOẠI ĐỘT BIẾN

Việc phân loại các đột biến sẽ giúp hiểu rõ hơn về loại biến dị này. Các đột biến có thể phân loại theo nhiều nguyên tắc khác nhau. Bảng phân loại sau đây cho thấy rõ các khía cạnh và biểu hiện của đột biến :

A. MỨC ĐỘ BIẾN ĐỔI CỦA BỘ GEN

1. Đột biến gen hay đột biến điểm

Biến đổi rất nhỏ trên một đoạn DNA, thường liên quan đến 1 nucleotide hay 1 cặp nucleotide.

a) **Đột biến đồng nghĩa** (Same-sense) còn gọi là **trung tính** (neutral) hay **im lặng** (silent), khi codon mã hóa cho một amino acid bị biến đổi, thường ở base thứ ba nên vẫn mã hóa cho amino acid đó (do tính suy thoái của mã di truyền).

b) **Đột biến vô nghĩa** (Non-sense) khi codon mã hóa cho một amino acid biến thành một trong ba codon **UAA**, **UAG** và **UGA** là các **codon kết thúc** không mã hóa cho amino acid nào.

c) **Đột biến sai nghĩa** (Mis-sense) : Khi codon của amino acid này biến thành codon mã hóa cho amino acid khác, làm thay đổi amino acid tương ứng trên phân tử protein.

d) **Đột biến lệch khung** : Sự thêm 1 base hay làm mất 1 base dẫn đến các codon sai nghĩa hay vô nghĩa so với codon tương ứng ban đầu từ điểm biến đổi về sau, sự dịch mã bị lệch khung có tính dây chuyền từ bộ ba bị sai.

2. Đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể

Các đột biến nhiễm sắc thể hay còn gọi là sai hình nhiễm sắc thể được phát hiện bằng phương pháp tế bào học.

a) **Biến đổi trên 1 nhiễm sắc thể** : mất đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn.

b) **Biến đổi giữa các nhiễm sắc thể** : chuyển đoạn, nhiễm sắc thể đều (isochromosome), chuyển đoạn Robertson.

3. Đột biến bộ gen (genome mutation)

Đa bội thể (Polyploidy) hiểu theo nghĩa rộng là sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể.

a) **Đa bội thể nguyên** (Polyploidy hay Euploidy) : Sự tăng nguyên lần bộ nhiễm sắc thể đơn bội của một loài được gọi là đa bội thể nguyên hay thuần. Đây là đa bội thể hiểu theo nghĩa hẹp, và trong sách này đa bội thể thường dùng với nghĩa này. Nếu có cá thể $2n$ nhiễm sắc thể thì dạng $3n$, $4n$, $5n$ là các dạng đa bội thể.

b) **Đa bội thể lai** còn gọi là **đi bội thể** (Allopolyploidy) : Đa bội thể lai có được khi cả hai bộ nhiễm sắc thể của 2 loài khác nhau cùng đứng chung trong một tế bào ($2n A + 2n B$).

c) **Đa bội lệch** (Aneuploidy), hay **đa nhiễm** : Thay đổi số lượng nhiễm sắc thể của từng cặp (ví dụ : $2n + 1$ hoặc $2n - 1$).

B. BIẾN ĐỔI CHẤT LƯỢNG CỦA GEN

1. Các biến đổi vi cấu trúc

Các thay đổi thành phần nucleotide của gen.

a) **Các đột biến thay thế** : Thay một nucleotide này bằng nucleotide khác.

– **Đồng chuyển** (Transition) khi pirimidine được thay thế bởi pirimidine hay purine bởi purine. Ví dụ : T thay cho C hoặc ngược lại.

– **Đảo chuyển** (Transversion) khi pirimidine được thay thế bởi purine hay purine bởi pirimidine. Ví dụ : T hay C thay cho A hoặc G và ngược lại.

b) **Mất nucleotide** (Deletion) : Mất một phần nucleotide của gen.

c) **Đột biến xen nucleotide** (Insertion mutant) : Thêm 1 hay nhiều nucleotide vào gen.

2. Các đột biến do xếp lại vị trí gen (*Rearrangement mutations*).

Sự thay đổi vị trí gen thường gây “hiệu quả vị trí”.

a) **Xếp lại trong gen** : Hai đột biến có thể có hiệu quả khác nhau khi ở vị trí *cis* hay *trans*.

b) **Sự dời chỗ gen** (Transposition) : Sự dời chỗ gen (ví dụ, vào vùng di nhiễm sắc) có thể làm thay đổi biểu hiện kiểu hình.

c) **Thay đổi số bản sao** của gen đối với một NST : Nếu số bản sao của gen khác thường có thể làm thay đổi biểu hiện kiểu hình.

C. NGUỒN GỐC CÁC ĐỘT BIẾN

1. **Đột biến ngẫu nhiên** : Các đột biến xảy ra trong tự nhiên một cách ngẫu nhiên với tần số nhất định và không xác định được nguồn gốc.

2. **Đột biến do nhân tố di truyền kiểm soát** : Các gen gây đột biến (*mutator*) làm thay đổi tần số đột biến của các gen khác. Có các gen gây đột biến chuyên biệt đối với một locus và *mutator* không chuyên biệt đối với nhiều locus.

3. **Đột biến nhân tạo hay cảm ứng** (*Induced mutation*) được tạo ra do các tác nhân gây đột biến (*mutagens*).

a) Phóng xạ ion hóa. Các tia phóng xạ α , β , γ hoặc tia X, các chùm tia neutron hoặc proton làm bắn các điện tử gây ion hóa và biến đổi DNA.

b) Phóng xạ không ion hóa : Tia tử ngoại (UV) hoặc nhiệt làm tăng mức năng lượng của nguyên tử . Tia tử ngoại thường tạo dimer thymine gắn hai thymine kề nhau của một mạch.

c) Các tác nhân gây đột biến hoá học

– Tạo sai hỏng khi sao chép : Các chất đồng đẳng của base (ví dụ brom-uracil hay 2-amino purine) gắn vào sai khi sao chép có chúng. Các chất màu acridine có thể gắn vào giữa các base của mạch xoắn kép làm mất hay thêm vào một base.

– Tác động trực tiếp lên gen khi không có các sao chép có thể gây các đột biến điểm hay các biến đổi A - T $\rightarrow$ G - C hoặc G-C $\rightarrow$ A-T.

D. CÁC ĐỘT BIẾN ẢNH HƯỞNG ĐẾN KIỂU HÌNH

1. Các đột biến hình thái

Các biến đổi ảnh hưởng đến hình dạng, màu sắc và kích thước.

2. Đột biến sinh hóa

a) Các đột biến khuyết dưỡng (Auxotrophe mutation) làm mất khả năng tổng hợp các chất.

b) Các đột biến có điều kiện : Các đột biến có thể không có biểu hiện trong những điều kiện giới hạn nhất định (restrictive condition) và có biểu hiện trong các điều kiện cho phép (permissive condition) . Ví dụ, các đột biến nhạy cảm với nhiệt độ cao có biểu hiện ở nhiệt độ tương ứng.

c) Đột biến đề kháng : Các biến đổi sinh hóa giúp kháng lại được các tác nhân bất lợi.

3. Sức sống

a) Các đột biến kém sức sống (Subvital) : Sức sống của dòng đột biến kém hơn dòng hoang dại, khoảng 10 - 90% sức sống của dòng hoang dại.

b) Nửa gây chết (Semi - lethal) : Gây hiệu quả chết cao hơn 90% nhưng thấp hơn 100%.

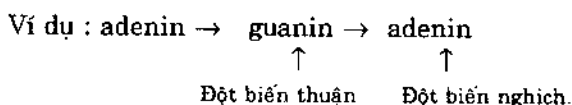
c) **Gây chết (Lethal)** : Không có cá thể nào sống đến giai đoạn trưởng thành.

E. HƯỚNG ĐỘT BIẾN

1. **Đột biến thuận hay trực tiếp (Direct mutation)** : Biến đổi từ kiểu hình hoang dại sang khác thường.

2. **Hồi biến (Reversion)** : Đột biến từ kiểu hình đột biến quay về kiểu hình hoang dại.

a) **Hồi biến thật hay đột biến nghịch**. Biến đổi trở lại y như ban đầu.



b) **Đột biến ức chế hay kim hãm (Suppressor)** : Đột biến ở một điểm khác. Cả hai cùng tạo kiểu hình gần như hoang dại.

– Đột biến *kim hãm ngoài gen* : Xảy ra ở gen khác với gen bị đột biến.

– Đột biến *kim hãm trong gen* : Xảy ra ở nucleotide khác trong gen đưa gen trở về trạng thái tạo kiểu hình hoang dại.

F. CÁC TẾ BÀO BỊ TÁC ĐỘNG

1. Các đột biến soma hay sinh dưỡng

Đột biến ở tế bào sinh dưỡng bình thường (tế bào soma) của cơ thể, thường tạo kiểu hình thể khảm (mosaic hay chimera).

2. Đột biến giao tử

Xảy ra ở tế bào sinh dục và là biến đổi di truyền.

Nói chung, các đột biến là các *biến đổi rất đa dạng* của vật chất di truyền và có *nhiều tác động* khác nhau.

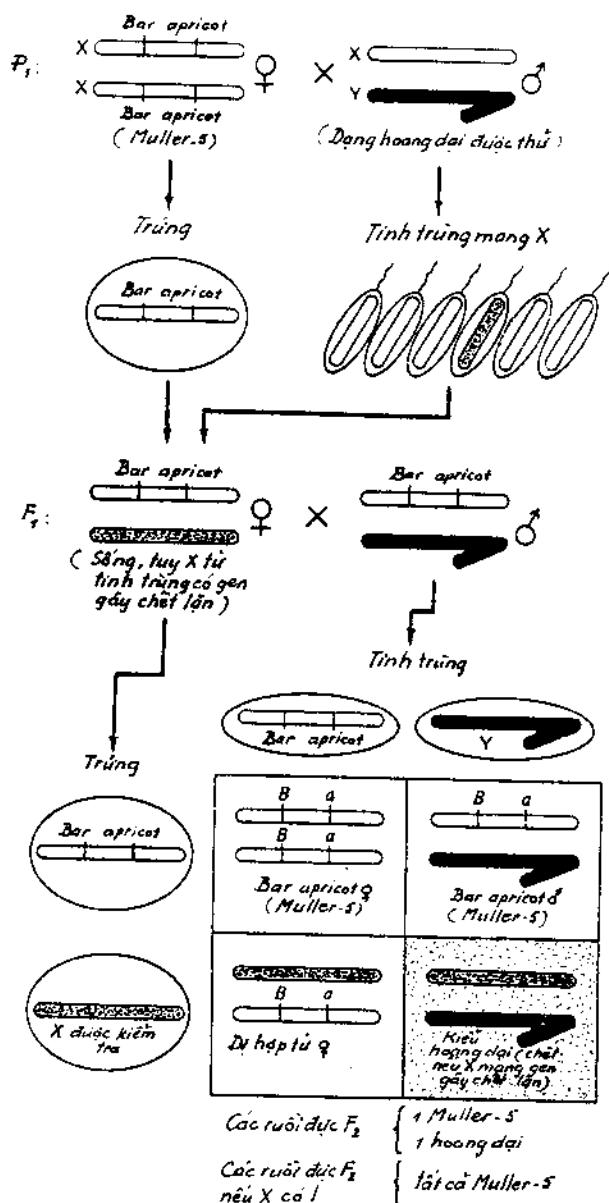
III. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN

Để nghiên cứu chi tiết về các đột biến, cần có các phương pháp phát hiện chúng một cách tương đối đầy đủ và chính xác. Đây là công việc khó khăn vì đa số đột biến ở trạng thái lặn và nhiều dạng đột biến khó phát hiện.

Sự hoàn thiện các phương pháp phát hiện đột biến đã góp phần đáng kể cho sự phát triển của di truyền học và sinh học.

1. Phương pháp phát hiện đột biến ở *Drosophila*

Ở *Drosophila*, lúc đầu Morgan và các cộng sự đã thu được hàng trăm đột biến khác nhau. Nhưng việc thu nhận chúng một cách có hệ thống và chủ động thì chưa thực hiện được.



Hình 8.2. Phương pháp Muller-5

G. Muller là người đầu tiên có công to lớn xây dựng nên các phương pháp phát hiện và đánh giá tần số đột biến và nhờ đó có thể đánh giá hiệu quả gây tạo đột biến bằng các tác nhân vật lí và hóa học khác nhau. Phương pháp đầu tiên nêu ra là phương pháp *ClB*, dùng để phát hiện **đột biến gây chết** (*l* - lethal) trên nhiễm sắc thể X của ruồi giấm đục.

Về sau, phương pháp cải tiến **Muller-5** được sử dụng rộng rãi hơn (hình 8.2). Phương pháp này cũng nhằm phát hiện **đột biến gây chết** (*l* - lethal) trên nhiễm sắc thể X. Các ruồi cái dòng Muller-5 có 2 nhiễm sắc thể X, mà mỗi cái đều mang một **đào đoạn** ngăn không cho xảy ra trao đổi chéo (xem chương IX). Ngoài ra, cả hai X đều có 1 gen lặn đồng hợp tử *W^a* (apricot - mắt màu trái đào chín) và 1 gen trội đồng hợp *Bar* (mắt hình thoi) để làm dấu theo dõi khi lai. Khi đem ruồi đục bình thường lai với dòng Muller-5 :

— Nếu không có đột biến gây chết *l* xảy ra trên nhiễm sắc thể X thì tỉ lệ ruồi con sẽ là 2 đực : 2 cái như bình thường.

— Nếu có đột biến thì 1/2 ruồi đục chết do mang *X^l*. Tỉ lệ ruồi con sẽ là 1 đực : 2 cái.

Ngoài các đột biến liên kết với X, phương pháp này còn đã phát hiện các đột biến gây chết trên nhiễm sắc thể thường số 2 của *Drosophila*.

2. Phương pháp phát hiện đột biến lặn ở bắp

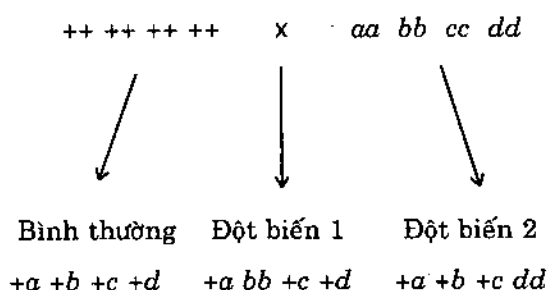
Các đột biến trội thường có biểu hiện kiểu hình nên việc phát hiện chúng không phải là vấn đề khó. Năm 1920, L.Stadler đã xây dựng phương pháp phát hiện đột biến lặn *c* có kiểu hình nội nhũ không màu từ allele trội *C* có màu.



Hình 8.3. Phát hiện đột biến hạt trắng trên nền các hạt có màu
(Đột biến từ *C* sang *c* trên trái bắp)

Stadler đã lấy cây cái có kiểu gen *cc* lai với cây đực *CC*. Hạt có nội nhũ với kiểu gen *Ccc* đều có màu vàng đỏ do sự biểu hiện của gen trội *C*. Nếu có đột biến từ *C* thành *c*, thì hạt có màu trắng. Việc quan sát các trái bắp vàng đỏ để phát hiện các đột biến màu trắng (hình 8.3).

Ở đây, để phát hiện đột biến cần có hệ thống sàng lọc số lượng lớn mẫu và tìm dạng đột biến hiếm hoi. Từ phương pháp trên có thể xây dựng nguyên tắc chung để phát hiện đột biến ở các locus khác nhau. Ví dụ:



3. Các hệ thống chọn lọc đột biến ở vi sinh vật

Muốn phát hiện các đột biến có hiệu quả cần có hệ thống chọn lọc để tìm thấy các đột biến hiếm hoi trong khối rất lớn các dạng không đột biến. Các hệ thống chọn lọc đột biến có nhiều và phụ thuộc vào các đột biến khác nhau. Bảng 8.1 nêu các cách phát hiện 3 dạng đột biến.

BẢNG 8.1: Cơ sở phát hiện các kiểu hình đột biến của 3 loại đột biến căn cứ kiểu hình

Kiểu gen	Đột biến có điều kiện (nhạy cảm nhiệt độ)		Đột biến khuyết dưỡng		Đột biến đề kháng	
	Nhiệt độ thường	Nhiệt độ cao	Không bổ sung	Có bổ sung	Không tác nhân	Có tác nhân
Kiểu hoang dại	Bình thường	Bình thường	Tăng trưởng	Tăng trưởng	Tăng trưởng	Không
Đột biến	Bình thường	Đột biến	Không	Tăng trưởng	Tăng trưởng	Tăng trưởng

Khái niệm **lực phân giải** (resolving power) được dùng để chỉ khả năng phát hiện các đột biến rất hiếm so với không đột biến. Lực phân giải càng lớn khi phát hiện được các đột biến càng hiếm. Ví dụ, các đột biến đề kháng có độ phân giải cao vì khi cấy số lượng rất lớn tế bào lên môi trường chọn lọc có chứa tác nhân thì phần lớn tế bào chết, chỉ số rất ít tế bào có đột biến đề kháng mọc thành khuẩn lạc.

a) Phương pháp để kháng : Ở vi khuẩn, các tác nhân chọn lọc thường là thuốc và phage. Các đột biến dễ dàng được phát hiện trên môi trường agar có thuốc hay phage ở dạng các khuẩn lạc được mọc lên.

b) Phương pháp làm giàu chậm (Default enrichment method): Việc phát hiện các *đột biến khuyết dưỡng* khó khăn hơn. Dung dịch vi khuẩn pha loãng được cấy lên bề mặt môi trường agar tối thiểu để mọc rồi thành khuẩn lạc. Một lớp môi trường tương tự được đổ lên trên, phủ lớp mỏng. Hộp Pétri được ủ để các khuẩn lạc bình thường mọc lên. Sau đó, đổ phủ lên thêm một lớp môi trường dinh dưỡng có bổ sung và ủ tiếp cho chất bổ sung khuếch tán. Các đột biến khuyết dưỡng sẽ mọc sau, khi có chất bổ sung, nên khuẩn lạc nhỏ hơn do mọc chậm.

c) Phương pháp làm giàu hạn chế (Limited enrichment method) là dạng đơn giản hơn của phương pháp làm giàu chậm. Các vi khuẩn được cấy trên môi trường tối thiểu có một ít bổ sung. Trong điều kiện đó, các đột biến khuyết dưỡng mọc đến khi hết chất dinh dưỡng bổ sung thì dừng, nên tạo khuẩn lạc nhỏ. Các vi khuẩn bình thường tiếp tục mọc tạo khuẩn lạc to.

d) Phương pháp làm giàu nhờ penicilline được áp dụng cho các vi khuẩn. Penicilline có tác động diệt các vi khuẩn bình thường khi phân chia. Các vi khuẩn được cho vào môi trường tối thiểu có penicilline. Các vi khuẩn đang tăng trưởng bị diệt, chỉ các tế bào đột biến không tăng trưởng còn sống sót. Sau đó, hỗn hợp được cấy lên môi trường không có penicilline thì các đột biến khuyết dưỡng mọc lên với tỉ lệ tương đối cao hơn .

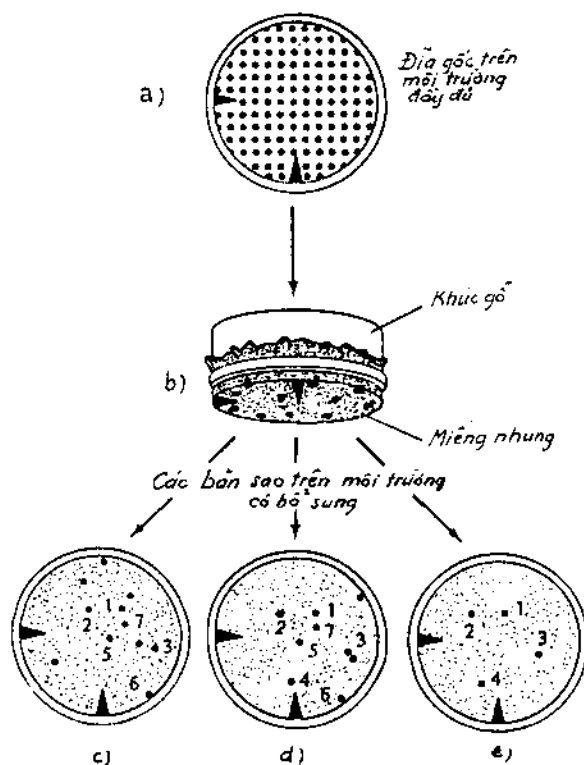
e) Phương pháp lọc được sử dụng để chọn lựa các đột biến khuyết dưỡng ở nấm sợi.

Dung dịch các bào tử được nuôi trong môi trường dinh dưỡng thiếu chất bổ sung. Các đột biến thiếu chất bổ sung không mọc được, các dạng bình thường mọc ra nhiều sợi. Khi lọc qua màng lọc sợi thủy tinh, các dạng bình thường nhiều sợi bị giữ lại, các dạng đột biến đi qua màng lọc. Dung dịch có nhiều dạng đột biến được cấy lên môi trường có chất bổ sung và kiểm tra tìm các dạng đột biến.

f) Trong phương pháp in, các vi khuẩn được cấy để mọc rồi từng khuẩn lạc trên môi trường có dinh dưỡng. Dùng miếng nhung (có nhiều lông mịn) in đúng các vị trí khuẩn lạc trên môi trường tối thiểu. Các khuẩn lạc đột biến không mọc lên được. Căn cứ vị trí khuẩn lạc không mọc ở bản sao tách các đột biến khuyết dưỡng (hình 8.4).

Ngoài các phương pháp nêu trên còn có các phương pháp chuyên biệt để phát hiện nhiều loại đột biến khác.

Nhiều phương pháp chọn lọc đột biến được sử dụng cho việc chọn lọc đột biến ở các tế bào nuôi cấy mô của sinh vật bậc cao.



Hình 8.4. Phương pháp in

- a) Đĩa gốc trên môi trường đầy đủ
- b) Khúc gỗ bọc miếng nhung
- c) Môi trường có bổ sung chất A+B
- d) Môi trường có bổ sung chất A+B+C
- e) Môi trường có bổ sung chất A+C

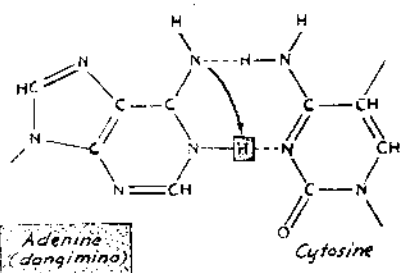
IV. CƠ CHẾ PHÂN TỬ CỦA ĐỘT BIẾN

1. Các sai hỏng trong sao chép DNA

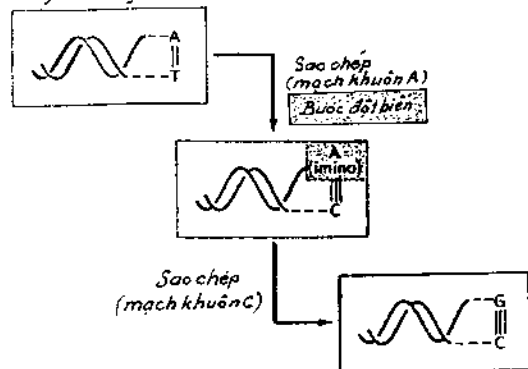
Chúng ta đã biết trên phân tử DNA có thể xảy ra các biến đổi, đa số các biến đổi được sửa sai, tuy nhiên vẫn có các đột biến xảy ra. Các đột biến có thể xảy ra do sai lầm khi sao chép DNA.

Mỗi base tồn tại ở 2 dạng cấu trúc được gọi là tautomer. Ví dụ, adenine bình thường mang nhóm NH_2 cung cấp nguyên tử hydrogen cho sự bắt cặp bổ sung với dạng *keto* ($C = O$ - keto form) của thymine. Khi có biến đổi tautomer, adenine chuyển sang cấu trúc hiếm là *dạng imino NH* sẽ bắt cặp bổ sung với cytosine. Thymine có thể chuyển sang *dạng enol* (COH) không có trong DNA bình thường và bắt cặp với guanine. Khả năng bắt cặp sai của base với tautomer không đúng đã được Watson và Crick nêu lên khi xây dựng mô hình chuỗi xoắn kép.

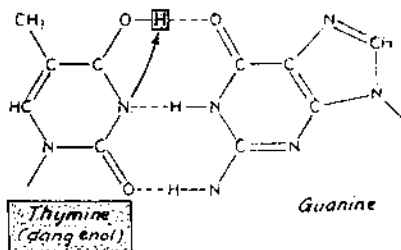
Khả năng bắt cặp sai của các base được nêu trên hình 8.5 và 8.6.



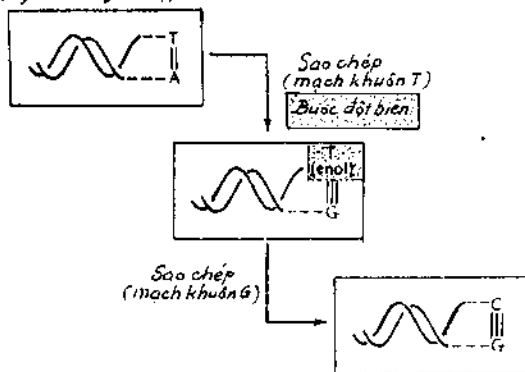
Thay đổi trong bắt cặp base:



Hình 8.5. Sự bắt cặp sai do dạng tautomer của pirimidine : C với A..

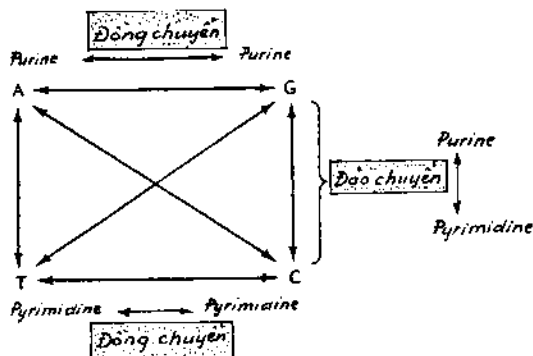


Thay đổi trong bắt cặp base:

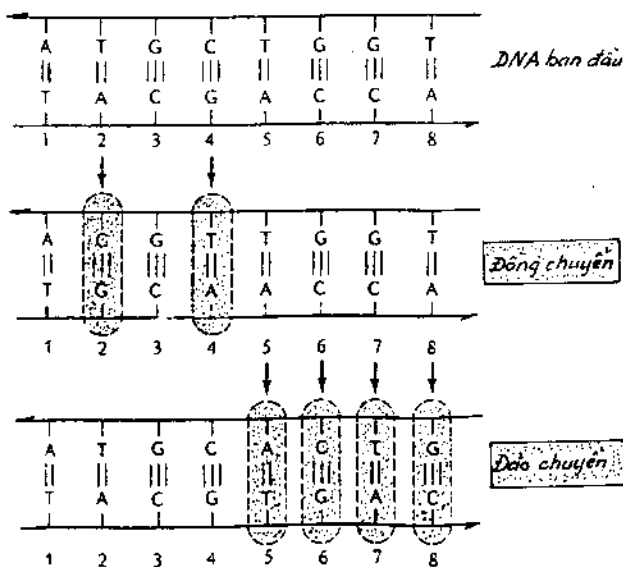


Hình 8.6. Sự bắt cặp sai do dạng tautomer của purine : G với T..

Sự bắt cặp sai này có thể là các đột biến đồng chuyển (hình 8.7), trong đó purine thay bằng purine khác và pirimidine thay bằng pirimidine khác.



a)



b)

Hình 8.7. Các kiểu thay đổi các base trên phân tử DNA

a) Sơ đồ chung

b) Ví dụ cụ thể

Mặc dù, các DNA polymerase III với hoạt tính sửa sai có khả năng nhận biết những chỗ bất cặp sai và cắt bỏ, làm giảm đáng kể các sai hỏng, nhưng vẫn không hết.

Các sai hỏng trên có thể dẫn đến hai kiểu biến đổi : đồng chuyển hay đảo chuyển.

Các biến đổi trên, ngoài việc thay thế các nucleotide trên mạch DNA còn có thể làm tăng thêm hay khuyết các nucleotide gây nên các kiểu đột biến ảnh hưởng đến sinh tổng hợp protein.

2. Ảnh hưởng của đột biến gen đến sinh tổng hợp protein

a) Đột biến lệch khung

Sau khi tìm hiểu quá trình dịch mã và mã di truyền, cần lưu ý đến biến đổi ảnh hưởng đến nghĩa của codon và vị trí biến đổi ở đầu hay cuối mạch polypeptide.

Hai kiểu đột biến có hiệu quả nặng là *thêm base* (addition) và *mất base* (deletion). Các biến đổi này thường làm enzyme mất hoạt tính. Sự thêm 1 base hay làm mất 1 base dẫn đến *sự dịch mã lệch khung*. Từ điểm biến đổi về sau, từ bộ ba bị sai cái sai sẽ kéo dài liên tục đến cuối mạch polypeptide. Sự tổng hợp mạch polypeptide có thể bị kết thúc sớm nếu sự lệch khung dẫn đến codon kết thúc.

b) Đột biến thay thế (Base substitution)

Đột biến thay thế base nếu là đột biến sai nghĩa (mis-sense) sẽ có hiệu quả thay đổi từ amino acid này thành amino acid khác trong mạch polypeptide, còn nếu là đột biến vô nghĩa (non-sense) hay đột biến trung tính (hay im lặng) sẽ không ảnh hưởng đến mạch polypeptide.

3. Sai hỏng ngẫu nhiên

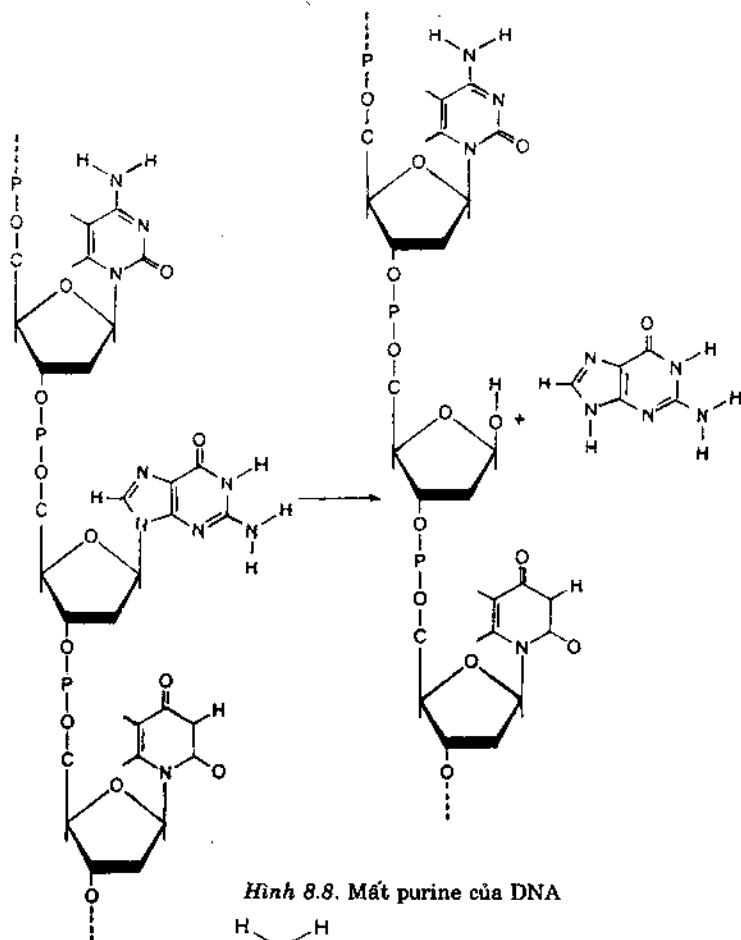
Ngoài các sai hỏng trong sao chép, phân tử DNA còn chịu các sai hỏng ngẫu nhiên có thể dẫn đến đột biến. Hai kiểu sai hỏng ngẫu nhiên thường gặp là mất purine (depurination) và mất amin (desamination). Mất purine là kiểu sai hỏng thường hơn, xảy ra khi liên kết glycosidic giữa C1 của pentose với base bị đứt và làm mất A hoặc G (hình 8.8).

Tế bào động vật có vú có thể mất 10.000 purine trong vòng 20 giờ của một thế hệ tế bào ở 37°C. Sự mất purine này dẫn đến không có bắt cặp bổ sung ở điểm mất nên dễ tạo ra đột biến qua sao chép.

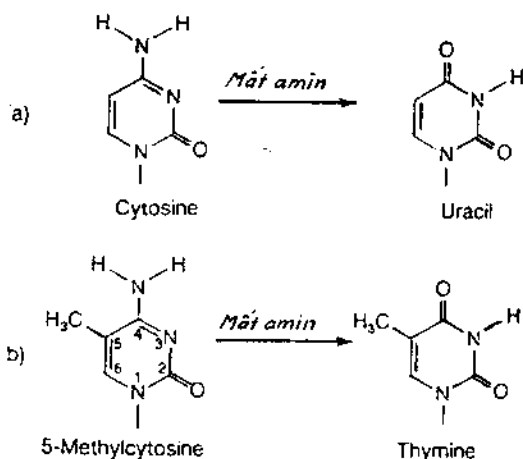
Sự mất amin của cytosine tạo ra uracil (hình 8.9a). Các gốc U không được sửa sai sẽ bắt cặp bổ sung với A trong sao chép, gây ra đồng chuyển G-C→A-T. Trong các enzyme sửa sai, uracil DNA-glycosylase nhận biết đặc hiệu uracil trên DNA và cắt rời tạo lỗ hỏng, sau đó được tổng hợp lại đúng theo mạch bổ sung.

Trên phân tử DNA, một số cytosine được methyl hóa thành 5-methyl cytosine, chất này mất nhóm amin biến thành thymine (hình 8.9b). Sai hỏng

này không bị uracil-DNA-glycolase phát hiện nên không được sửa lại. Sự chuyển C → T do mất amin thường xảy ra ở các điểm có 5-methyl cytosine. Kiểu biến đổi này có ở cả vi khuẩn và tế bào sinh vật bậc cao.



Hình 8.8. Mất purine của DNA



Hình 8.9. Mất amin

V. ĐỘT BIẾN NHÂN TẠO HAY CẢM ỨNG

Các tác nhân làm *tăng tần số đột biến* cao hơn mức tự nhiên được gọi là các *tác nhân gây đột biến (mutagen)*. Các tác nhân vật lý như phóng xạ, tia X, tia tử ngoại gây đột biến. Nhiều hóa chất là tác nhân gây đột biến như các đồng đẳng của các base nitric, HNO_2 (nitrous acid), các chất alkyl hóa mạch...

Các đột biến loại này được gọi là đột biến *nhân tạo* hay đột biến *cảm ứng* (induced mutation).

1. Tác động gây đột biến của bức xạ ion hóa

Tia X, các tia *phóng xạ α , β , γ* , các *neutron* và cả *tia tử ngoại* đều là các tác nhân gây đột biến. Trừ tia tử ngoại có khả năng xuyên thấu yếu nên chỉ tác động lên các sinh vật đơn bào và giao tử, các tia khác đều có tác dụng gây đột biến lên tất cả các dạng sinh vật. Tác dụng gây đột biến của phóng xạ có 2 đặc điểm :

- Không ngưỡng tác dụng, tức không có liều lượng vô hại.
- Số lượng đột biến tỉ lệ thuận với liều lượng phóng xạ, không phụ thuộc cường độ và thời gian chiếu xạ.

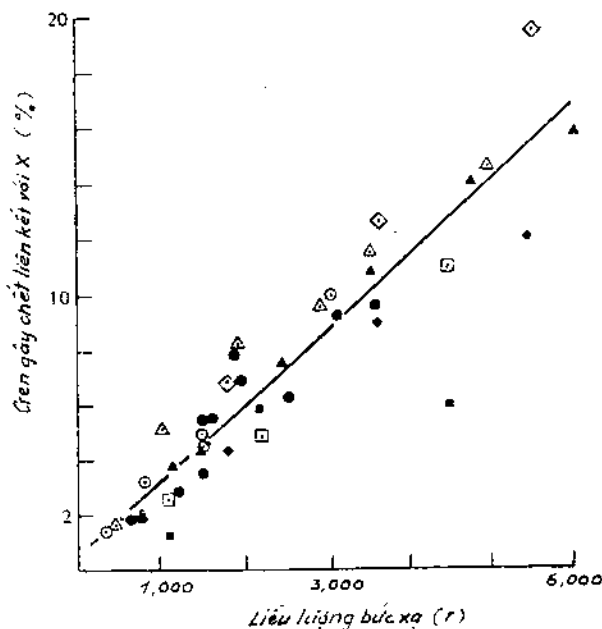
a) Bức xạ ion hóa (Ionizing radiation)

Ánh sáng nhìn thấy chỉ là một phần nhỏ của phổ sóng điện từ. Sóng có bước sóng càng ngắn thì có chứa năng lượng càng lớn và khả năng xuyên thấu càng mạnh. So với ánh sáng nhìn thấy (bước sóng khoảng 10^{-4} μm), các tia X, tia γ , tia vũ trụ có bước sóng từ 1 nm và ngắn hơn, được gọi là bức xạ ion hóa. Các bức xạ này được tạo ra nhờ các máy chiếu tia X, proton, neutron và được phát ra từ các nguồn phóng xạ như radium, cobalt-60,... tạo các tia alpha, beta và gamma.

Roentgen (r) là đơn vị đo bức xạ ion hóa. 1r tạo ra 1 đơn vị tính điện trong 1 cm^3 không khí. Đơn vị khác là *rad*, được tính theo năng lượng được hấp thu bởi vật liệu. Trong nước hay mô, gần 2 ion hóa tạo 1r trong 1cm^3 . Các bức xạ không ion hóa như tia tử ngoại (uv-ultraviolet) ít có khả năng xuyên thấu và không tạo vật ion.

b) Ảnh hưởng của liều lượng (dose) và cường độ bức xạ (radiation intensity)

Các thí nghiệm sau năm 1927 với bức xạ năng lượng cao cho thấy các đột biến gây tạo (còn gọi là cảm ứng) phụ thuộc rất lớn vào liều lượng: liều càng lớn tần số đột biến càng cao (hình 8.10).



Hình 8.10. Sự phụ thuộc của tần số các đột biến vào liều lượng bức xạ

Sự phụ thuộc giữa số phần trăm của đột biến gây chết liên kết với X ở *Drosophila* và các liều lượng tia X được tính bằng roentgen (1000r, 3000r và 6000r). Các số liệu được tổng hợp từ nhiều nguồn khác nhau-theo Shultz.

Đồ thị trên hình là một đường thẳng, thể hiện rõ mối tương quan tỉ lệ thuận và có sự tăng tần số đột biến tương ứng với sự tăng liều lượng phóng xạ: tăng 3% tần số đột biến / 1000r.

Mối quan hệ đơn giản giữa liều lượng phóng xạ và tần số đột biến được Timofeeff - Ressovsky, Lea, Catcheside và những người khác giải thích bằng **giả thuyết "bia"** (target hypothesis). Theo thuyết này, mỗi "va đập" của bức xạ vào gen hay nhiễm sắc thể (như bia để tập bắn) có xác suất gây đột biến cao. Liều lượng phóng xạ càng lớn, các va đập càng nhiều và xuất hiện nhiều đột biến.

Sự phụ thuộc thẳng chỉ ở một giới hạn nhất định. Khi liều lượng quá cao sự phụ thuộc có phức tạp hơn, có thể do nhiều tế bào bị chết.

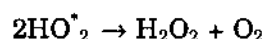
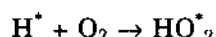
Giả thuyết bia được củng cố thêm khi bức xạ được thực hiện với cường độ khác nhau. Sự tăng tần số đột biến phụ thuộc vào liều lượng, ít phụ thuộc vào cường độ cao (thực hiện 1 lần với mật độ bức xạ cao) và cường độ thấp (thực hiện nhiều lần với cường độ thấp).

Điểm đáng lưu ý, nhiều nghiên cứu cho thấy các bức xạ ion hóa có hiệu quả gây đột biến ở tất cả các sinh vật và không có liều lượng ngưỡng, có nghĩa là dù liều lượng thấp vẫn có khả năng gây đột biến. Loài người đầu

tranh ngăn chặn việc thử vũ khí hạt nhân chính vì sự gia tăng độ phóng xạ trên Quả Đất sẽ làm tăng tần số đột biến ở người.

c) Hiệu quả của oxygen và của môi trường

Các nghiên cứu ở đậu *Vicia faba* cho thấy nồng độ oxygen thấp khi chiếu xạ làm giảm tần số đột biến. Ở *Drosophila* tần số các đột biến gây chết liên kết với X ở 4000r có thể dao động từ 8 đến 16% phụ thuộc nồng độ oxygen. Có thể khi hiện diện oxygen, bức xạ tạo ra nhiều hơn các gốc peroxide :



Các peroxide là những phân tử có phản ứng mạnh, chúng dễ tạo các đột biến.

Ngoài ra, sự xuất hiện đột biến còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố môi trường khác nhau và các trạng thái sinh lí tùy thuộc vào giai đoạn của sự phát triển cá thể. Các gen "mutator" là các gen có thể làm tăng tần số đột biến.

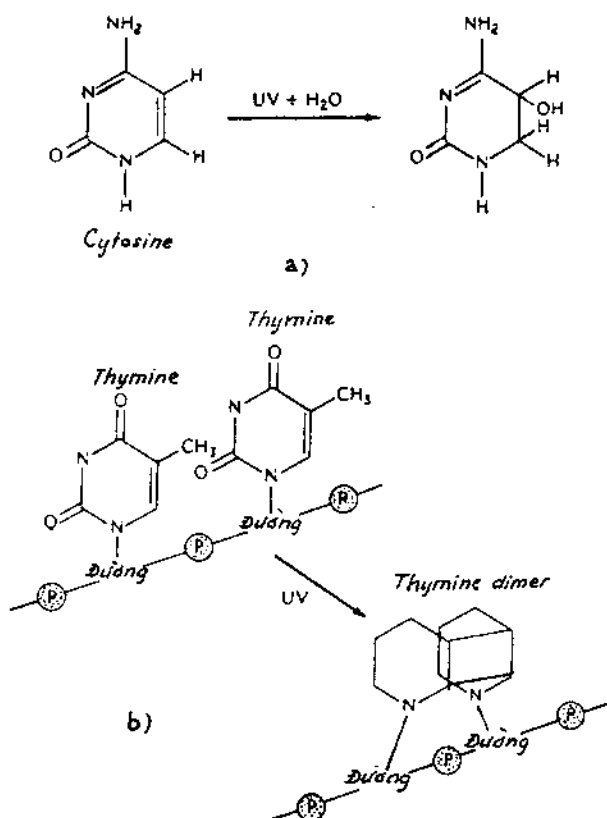
2. Tác động của tia tử ngoại

Tia tử ngoại có bước sóng dài (10^{-5} - 10^{-6} cm) nên khó tạo ion, có lẽ chỉ tác động đến những chất hấp thu nó trực tiếp. Trong tế bào, các chất hữu cơ có mạch vòng chủ yếu như purine và pyrimidine hấp thu trực tiếp tia tử ngoại. Mối liên quan chặt chẽ giữa tia tử ngoại và các cấu phần của DNA đã được chứng minh. DNA hấp thu tia tử ngoại mạnh nhất ở bước sóng 2537 Å, đây chính là bước sóng làm tăng tần số đột biến ở hạt phấn cây bắp.

Dưới tác động của tia tử ngoại, cytosine gắn thêm phân tử nước vào liên kết C = C của mạch vòng (hình 8.11) và thymine bị đứt liên kết C = C mạch vòng nối 2 phân tử thành thymine dimer.

Stone và các cộng sự đã nhận thấy tần số đột biến tăng lên ở *Staphylococcus aureus* khi môi trường nuôi chúng được chiếu tia UV trong thời gian ngắn trước khi cấy vào. Đây là tác động gián tiếp của tia tử ngoại.

Hiện tượng **quang phục hồi** (photoreactivation) là một đặc điểm trong tác động của tia UV. Sau khi chiếu tia tử ngoại lên tế bào, nếu để ngoài ánh sáng, thì các sai hỏng phần lớn được phục hồi. Ánh sáng có tác động hoạt hóa enzyme sửa sai, cắt đứt các thymine dimer.



Hình 8.11. Tác động của tia tử ngoại lên các pyrimidine

- a) Sự thủy giải của cytosine.
b) Sự thủy giải của thymine.

3. Các tác nhân gây đột biến hóa chất

Ngay từ đầu những năm 1930, Xakharov và Lobashov (Liên Xô) đã tiến hành thử nghiệm gây đột biến bằng hóa chất, nhưng hiệu quả chưa rõ. Vào những năm 40, trong thế chiến thứ hai ở Anh, Auerbach và Robson đã chứng minh hơi ngạt nitrogen và sulfur có khả năng gây đột biến ở *Drosophila* (thời này Đức bán hơi ngạt sang nước Anh, nên họ phải nghiên cứu tác động sinh học của các chất độc này). Về sau, nhiều nhóm hóa chất gây đột biến đã được tìm ra.

Có nhiều hóa chất gây biến dị di truyền, đến nay tìm ra những hóa chất cho hiệu quả đột biến cao hơn cả phóng xạ.

Các hóa chất gây đột biến có đặc điểm là có thể chỉ gây hiệu quả đột biến đối với một số lượng ít đối tượng.

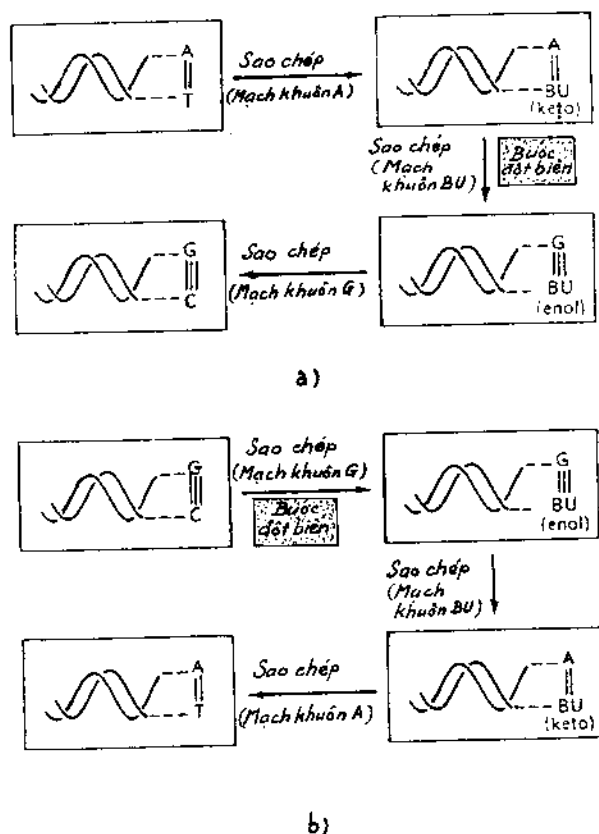
Ví dụ : Streptomycine chỉ gây đột biến ở tảo đơn bào và một số vi sinh vật, không gây đột biến trên nhiều đối tượng khác.

Các tác nhân gây đột biến hóa học có thể chia thành các nhóm sau:

- **Nhóm 1** : Các chất ức chế tổng hợp nitrogenous base trong cấu trúc DNA như coffein, ethyl uretan...

- **Nhóm 2** : Các chất đồng đẳng với nitrogenous base như coffein, 5-bromuracil, các chất gần giống với nitrogenous base, nên nó làm DNA gần nhầm khi tổng hợp.

Ví dụ : Bromodeoxiuridine (BUdR) và 5-bromuracil (BU) là các base đồng đẳng của thymine. Chúng thường ở dạng keto, nhưng ngẫu nhiên đôi khi chuyển sang dạng enol và có khả năng bắt cặp với guanine. Như vậy, BU có thể xâm nhập và bắt cặp bổ sung với A (A-BU) và ở vòng sao chép tiếp theo gần bắt cặp với G (BU-G), A-T được thay thành G-C. (hình 8.12a). BU như vậy có thể xâm nhập sai, khi gần thay chỗ cho cytosine tạo G-BU, tiếp theo A bắt cặp với BU tạo A-BU và vòng sao chép tiếp A bắt cặp với T thành A-T (hình 8.12b). Trong cả hai trường hợp, chất đồng đẳng bromuracil (BU) đều có khả năng tạo thay đổi trên DNA, cặp A-T $\rightarrow$ G-C và ngược lại G-C $\rightarrow$ A-T.



Hình 8.12. Tác động gây đột biến của 5-bromuracil

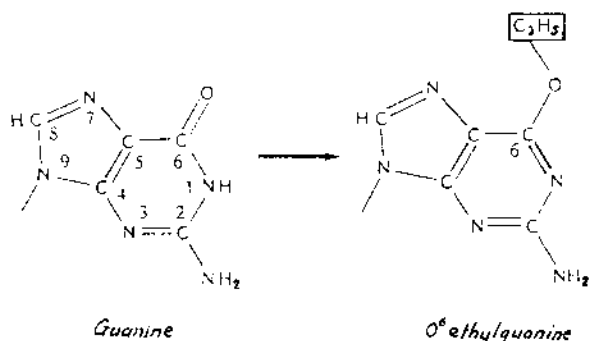
– **Nhóm 3** : Các chất alkyl hóa làm đứt mạch DNA như ethyl methanesulfonate (EMS), methyl methanesulfonate (MMS), ethylene imine (EI), nitrosoguanidine (NG),... (hình 8.13).

Các tác nhân alkyl hóa (alkylating agent) như khí ngạt nitrogen và ethyl methanesulfonate có thể gây đột biến ít nhất bằng 3 cách:

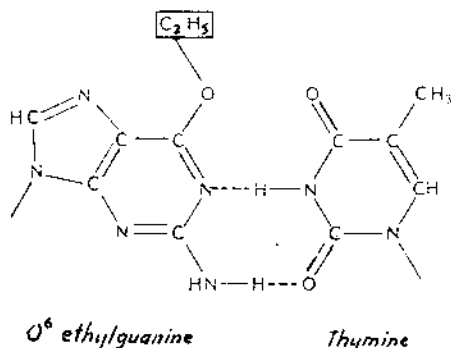
+ Thêm nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) hay ethyl ($-\text{C}_2\text{H}_5$) vào guanine tạo ra base đồng đẳng của adenine dẫn đến bất cặp bổ sung sai (hình 8.13).

+ Mất guanine đã bị alkyl hóa (mất purine) tạo lỗ hổng trên DNA, khi sao chép có thể làm đứt mạch.

+ Liên kết chéo giữa các mạch của một hoặc các phân tử DNA khác nhau làm mất nucleotide.



Sự bất cặp của O⁶ethylguanine với thymine:



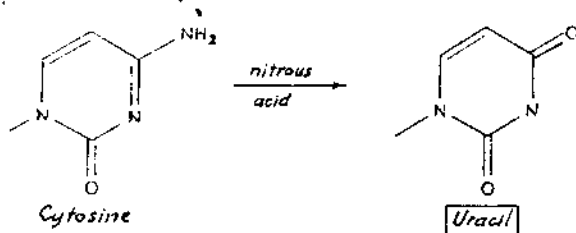
Hình 8.13. Hiệu quả dự đoán khi xử lý guanine với tác nhân alkyl hóa (EMS hoặc MMS)

– **Nhóm 4** : Các chất khác như nhóm oxy hóa, khử.

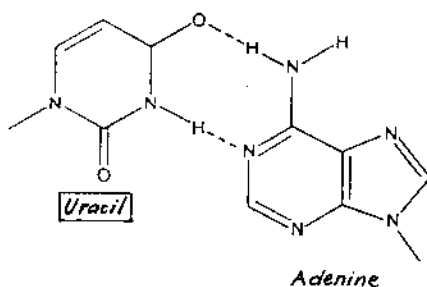
Ngược với sai hỏng sao chép, các tác nhân gây đột biến như nitrous acid và khí ngạt nitrogen (nitrogen mustard) có thể gây biến đổi trực tiếp

trên DNA. Theo Schuster và một số khác, nitrous acid tác động trước hết tách nhóm amino (mất amine - desamination) khỏi adenine và cytosine và tương ứng biến các base này thành hypoxanthine (H) và uracil (U). Sau biến đổi, H có thể bắt cặp với C và U với A, các vòng sao chép tiếp theo làm G thay chỗ A và T thay C (hình 8.14).

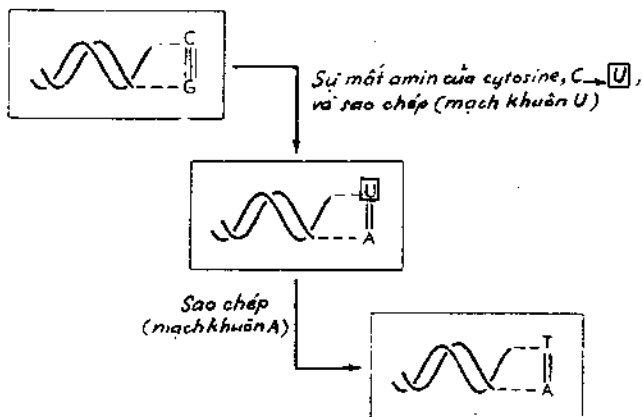
Sự mất amin của cytosine:



Sự bắt cặp của uracil với adenine:



Thay cặp C-G bằng T-A:



Hình 8.14. Tác động của nitrous acid lên cytosine (làm cặp C-G chuyển thành T-A)

Các chất khác như hydroxygenamine (H_2NOH) và các chất cho nhóm OH có thể gây nên đồng chuyển. Theo Freese và các cộng sự, hydroxygenamine có lẽ là chất có tính đặc hiệu cao nhất trong các tác nhân gây đột biến, nhờ đó có thể chuyển cytosine sang dạng bắt cặp được với adenine.

— **Nhóm 5 : các chất chèn vào DNA**

Nhóm các chất gồm proflavin, màu acridine và các chất được gọi là ICR (ICR compound) là những chất có phân tử mặt phẳng tương tự cặp base. Chúng có thể chèn vào phân tử DNA làm thêm hoặc mất base. Chúng thường gây đột biến lệch khung do thêm hay mất base.

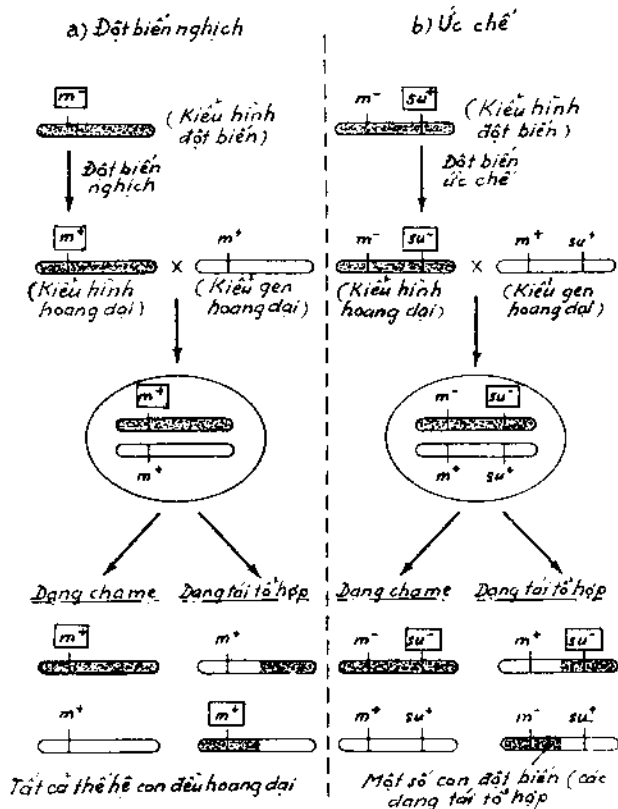
Tất cả các tác nhân gây đột biến đều là tác nhân gây ung thư (carcinogen), nhưng các tác nhân gây ung thư không phải đều gây đột biến. Hiện nay nhiều tác nhân gây đột biến được sử dụng trong chọn giống nhằm tăng nguồn biến dị. Bên cạnh đó với nạn ô nhiễm trên thế giới người ta phát hiện nhiều tác nhân đột biến hóa học mới xuất hiện trong môi trường.

VI. HỒI BIẾN

Quá trình đột biến, nói chung, có tính thuận nghịch, nghĩa là nếu một gen A đột biến thành a ($A \rightarrow a$) thì, ngược lại allele a cũng có thể đột biến quay lại thành A ($a \rightarrow A$). Thông thường một dạng được gọi là đột biến khi nó mang kiểu hình khác với dạng hoang dại. Ví dụ, ruồi giấm hoang dại được bắt từ thiên nhiên vào phòng thí nghiệm có mắt đỏ. Trong quá trình nuôi xuất hiện dạng đột biến mắt trắng. Đột biến từ mắt đỏ hoang dại sang mắt trắng gọi là *thuận* vì từ hoang dại thành đột biến. *Hồi biến* là trường hợp từ trạng thái đột biến do biến dị di truyền quay trở về kiểu hình hoang dại như đột biến từ mắt trắng trở lại thành mắt đỏ. Hồi biến do *đột biến nghịch* (back mutation) hoặc do *đột biến ức chế* hay *kìm hãm* (suppression).

1. Các đột biến nghịch

Đột biến nghịch có được khi gen đột biến có sự biến đổi quay trở lại có y cấu trúc như gen hoang dại ban đầu. Trường hợp này khó xảy ra và khi lại trở lại với dòng hoang dại thì thế hệ con tất cả đều có kiểu hình hoang dại (hình 8.15).



Hình 8.15. Đột biến nghịch và ức chế

a) Đột biến nghịch : $m^- \rightarrow m^+$, khi lai với dạng hoang dại cho thế hệ con đều hoang dại

b) Đột biến ức chế : $m^- su^- \rightarrow m^- su^+$, khi lai với dạng hoang dại trong thế hệ con sẽ có một ít kiểu hình đột biến.

2. Đột biến ức chế

Đột biến ức chế (Suppressor mutation) là đột biến có tác động ngược lại hay kìm hãm của một đột biến khác. Các đột biến ức chế có những tính chất sau :

– Đột biến ức chế xảy ra ở điểm khác với đột biến bị ức chế. Khi lai thể hồi biến (revertant) với dạng hoang dại sẽ xuất hiện dạng đột biến bị ức chế do tái tổ hợp làm tách rời không bị kìm hãm bởi đột biến ức chế (hình 8.15).

– Đột biến ức chế có thể xảy ra trong cùng một gen, ngoài gen hoặc ở gen khác.

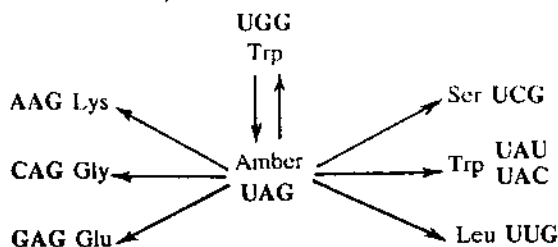
– Các đột biến ức chế có thể thực hiện tác động bằng nhiều cách khác nhau. Ví dụ, các đột biến ức chế có thể tác động lên sự phiên mã, dịch mã hay những biểu hiện sinh lý khác của tế bào.

Đột biến kìm hãm thường gặp hơn, nó có được do 1 đột biến thứ hai làm cho biểu hiện kiểu hình của đột biến không biểu hiện ra được nên có kiểu hình hoang dại. Đột biến kìm hãm có thể xảy ra ngay trên cấu trúc gen. Ví dụ : đột biến thuận mất một nucleotide, đột biến kìm hãm xảy ra gần chỗ đó thêm vào một nucleotide. Đột biến kìm hãm có thể do sự bổ sung trong chu trình trao đổi chất. Sai hỏng do đột biến thứ hai tạo sản phẩm bù trừ được đột biến thứ nhất.

Vào năm 1962, S.Benzer và Chemp mô tả đột biến được gọi là đột biến *amber* ở locus *rII* của phage T4. Chúng có thể trở về kiểu hình hoang dại do đột biến khác (đột biến ức chế) ở bộ gen của tế bào chủ. Các đột biến ức chế được phát hiện ở nhiều gen khác của phage T4 và *E.coli*. Các nghiên cứu sử dụng hệ thống gen- enzyme cho thấy, các đột biến *amber* dẫn đến sự kết thúc sớm hơn bình thường sự mọc dài của mạch polypeptide và ở trong các tế bào chỉ các đoạn có đầu NH₂ của các polypeptide tương ứng được tổng hợp. Nhờ các đột biến ức chế sự tổng hợp mạch polypeptide được hồi phục.

A.Haren, khi nghiên cứu sự kiểm soát di truyền đối với tổng hợp enzyme phosphatase kiềm ở *E.coli*, đã so sánh thành phần các gốc amino acid trên phân tử enzyme của dạng hoang dại và ở các thể hồi biến trong gen mã hóa cho enzyme. Kết quả trên hình 8.16 cho thấy các ức chế đối với *amber* liên quan đến một thay thế nucleotide trong codon.

Trên cơ sở các số liệu này đã xác định được codon - *amber* là UAG. Sau đó, 2 codon chấm dứt khác được tìm ra là *ochre* UAA và *opal* UGA.



Hình 8.16. Sự thay thế các amino acid do các đột biến ức chế đối với các đột biến *amber* ở gen cấu trúc của enzyme phosphatase kiềm

Các biến dị ức chế được dùng để nghiên cứu sâu hơn về cơ chế dịch mã. Ví dụ, các đột biến ảnh hưởng tới anticodon của tRNA, làm thay đổi tính đặc hiệu mã hóa của nó, có thể tạo khả năng ức chế đột biến khác ở mức phiên mã. Các đột biến ức chế đối với codon vô nghĩa (nonsense-suppressor) thường xảy ra trên các tRNA, mà anticodon của nó có thể bị biến thành anticodon bổ sung với codon kết thúc do sự thay thế một nucleotide. Các nonsense-suppressor như vậy thường là trội.

Có thể xảy ra các đột biến *ức chế* đối với các *đột biến nhầm nghĩa*. Ví dụ, tRNA^{gly} của amino acid glycine có anticodon CCC thường bắt cặp với GGG (gly) trên mRNA. Sự biến đổi đột biến của anticodon thành CUC dẫn đến chỗ tRNA^{gly} đột biến bắt cặp với GAG (glutamic acid). Như vậy, nếu như đột biến thuận ở một gen cấu trúc nào đó biến codon GGG (glycine) thành GAG (glutamic acid) của đột biến nhầm nghĩa (missens mutation), thì sự ức chế đối với đột biến này có thể do đột biến của tRNA^{gly} với anticodon CUC sẽ gắn glycine vào chỗ bị đột biến (ở đột biến nhầm nghĩa là glutamic acid).

Các đột biến xảy ra trên tRNA có thể là đột biến *ức chế* đối với các đột biến lệch khung.

Sự ức chế ở mức phiên mã có thể xảy ra do các đột biến trên các gen mã hóa một số protein của *ribosome*.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Biến dị di truyền là các *biến đổi của kiểu gen*, nó có nhiều loại và số lượng rất lớn, cung cấp *nguyên liệu* thường xuyên cho quá trình tiến hóa. Nhiều *phương pháp phát hiện* và *chọn lọc* các đột biến khác nhau được xây dựng nên. Chúng góp phần đáng kể cho các nghiên cứu di truyền. Các thay đổi thêm, mất hay thay thế các nucleotide trên phân tử DNA dẫn đến các biến đổi phân tử, gây ra các đột biến gen như : lệch khung, sai hay nhầm nghĩa và im lặng. Phát minh ra các *tác nhân gây đột biến vật lí* và hóa học làm tăng đáng kể nguồn đột biến phục vụ cho nghiên cứu và chọn giống. Con người có thể tăng nguồn biến dị bằng lai tạo hay sử dụng các tác nhân gây đột biến.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Tại sao nói thường biến cũng được xác định di truyền ?
2. Đột biến gen có tính đặc hiệu hay đa hiệu ?
3. Tần số đột biến được tính như thế nào ?
4. Có người phân biệt tần số (frequency) với tốc độ (rate) đột biến. Sự phân biệt này có thể dựa trên các yếu tố nào ?
5. Vì sao phần lớn các đột biến ảnh hưởng đến các gen cấu trúc thì lặn so với các allele hoang dại ?
6. Thời gian và cường độ phóng xạ có ảnh hưởng như thế nào ?

7. Xét từ góc độ di truyền học các vụ thử vũ khí hạt nhân và nguyên tử nguy hiểm như thế nào ?
8. Hãy kể một số ví dụ về ứng dụng đột biến vào thực tiễn ?
9. Các hóa chất gây đột biến có đặc điểm gì ?
10. Làm thế nào phân biệt giữa đột biến nghịch với đột biến ức chế.
11. Trình bày các kiểu đột biến ức chế đối với sự dịch mã.
12. Ngay trên cùng một gen, tổng các đột biến nói chung ít nhất nhiều hơn một bậc so với các hồi biến. Vì sao ?

CÁC BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

1. Tần số xuất hiện đột biến a^- (mất khả năng tổng hợp chất a) là 2×10^{-6} cho một thế hệ và tần số đột biến b^- là 8×10^{-5} . Nếu thể đột biến mang đồng thời hai đột biến a^-b^- thì nó sẽ xuất hiện với tần số bao nhiêu ?

Lời giải

(Tần số đột biến ở vi sinh vật được tính trên 1 tế bào, 1 thế hệ. Để dễ hiểu ta có thể đảo ngược như sau :

- Trong 10^6 tức 1 triệu tế bào có 2 tế bào đột biến a^- xuất hiện.
- Trong 10^5 tức 100.000 tế bào có 8 tế bào đột biến b^- xuất hiện.

Các đột biến khác nhau là những sự kiện xảy ra độc lập, nếu đồng thời xảy ra thì xác suất này sẽ bằng tích của xác suất mỗi sự kiện riêng lẻ. Đột biến kép a^-b^- sẽ xuất hiện với tần số :

$$f = [2 \times 10^{-6}] \times [8 \times 10^{-5}] = 2 \times 8 \cdot 10^{-6} \times 10^{-5} = 1,6 \times 10^{-10}$$

Có thể hiểu đảo ngược là trong 10^{10} tế bào sẽ có 1,6 tế bào xuất hiện đột biến a^-b^- .

2. Bốn gen *Kyu A*, *Kyu B*, *Kyu C* và *Kyu Q* được biết là cần cho tổng hợp chất Q và mỗi phản ứng sinh hóa đã được phát hiện. Trình tự phản ứng như sau: chất P $\rightarrow$ B $\rightarrow$ C $\rightarrow$ A $\rightarrow$ Q trong đó sản phẩm của gen *kyu X* cần cho tổng hợp chất X. Ở trạng thái bình thường nếu thêm chất đồng vị phóng xạ P - C^{14} vào thì sẽ nhận được Q - C^{14} .

a) Tìm được đột biến mà khi thêm P - C^{14} vào thì có chất A - C^{14} nhưng không tạo ra Q - C^{14} . Đột biến này ở gen nào ?

b) Một đột biến khác không biến P - C^{14} thành chất khác. Hơn nữa thêm A - C^{14} cũng không tạo ra Q - C^{14} . Đột biến này thuộc loại nào ?

Lời giải

a) Khi thêm P - C^{14} vào tạo được A - C^{14} chứng tỏ các gen *Kyu B*, *Kyu C* và *Kyu A* đều bình thường. Nhưng Q - C^{14} không được tạo thành chứng tỏ đột biến xảy ra ở *Kyu Q*.

b) Theo chuỗi phản ứng sinh hóa mô tả $P \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow Q$ khi P - C^{14} không biến thành chất Q có thể nghĩ rằng sai hỏng xảy ra ở P. Nếu chỉ sai hỏng ở P thì khi thêm vào B, C hoặc A đều có thể tạo ra Q, nhưng thực tế thêm A - C^{14} cũng không tạo ra Q - C^{14} chứng tỏ sai hỏng xảy ra nhiều hơn, không riêng gì ở P. Có lẽ đột biến xảy ra ở gen điều hòa làm sai hỏng cả hệ thống chứ không phải từng gen riêng lẻ.

3. Một lò ruồi đục nhận liều phóng xạ 2500R (roentgens). Trong 723 ruồi con, 54 con mang đột biến. Khi liều phóng xạ là 4000R, có 78 đột biến trong số 649 ruồi con. Có bao nhiêu đột biến xuất hiện trong số 1000 ruồi con từ các ruồi đục bị phóng xạ 6000R?

Lời giải

Số lượng các đột biến do gây tạo bởi phóng xạ ion hóa tỉ lệ thuận với liều lượng phóng xạ.

$$78/649 = 12,02\% \quad \text{ở } 4000R$$

$$54/723 = 7,47\% \quad \text{ở } 2500R$$

Sự khác nhau = 4,55% đối với 1500R

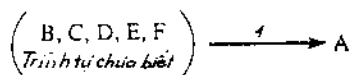
Ở liều 6000R sẽ tìm thấy: $1000 (6000/1500) \times 0,0455 = 182$ đột biến /1000 ruồi con.

4. Bốn chủng đột biến của *Neurospora* mất khả năng mọc trên môi trường tối thiểu, trừ khi người ta thêm vào môi trường tối thiểu một hoặc nhiều trong số 6 chất được xếp từ A tới F. Bảng dưới đây mô tả khả năng mọc (+) và không mọc (0) của các chủng trên môi trường tối thiểu có bổ sung các chất A, B, C, D, E, F. Các chủng 2 và 4 chỉ mọc được khi thêm đồng thời vào môi trường tối thiểu hoặc E + F hay C + F. Hãy mô tả chuỗi sinh tổng hợp có tính đến các kết quả thu được và chỉ rõ mức kìm hãm ở mỗi một đột biến.

Các chất bổ sung vào môi trường tối thiểu						
Chủng	A	B	C	D	E	F
1	+	0	0	0	0	0
2	+	0	0	+	0	0
3	+	0	+	0	0	0
4	+	0	0	0	0	0

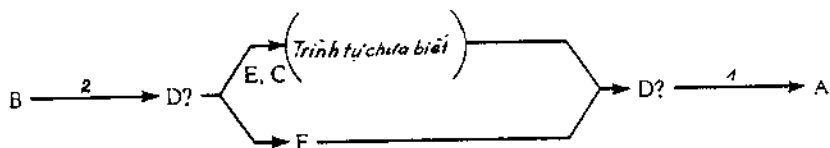
Bài giải

+ **Chứng 1** : Chứng này chỉ mọc được khi cung cấp chất A, sự thêm các chất B, C, D, E, F không có hiệu quả nào. Như vậy, đột biến ảnh hưởng đến gen đặc hiệu cho enzyme can thiệp vào chuỗi sinh tổng hợp trước khi hình thành chất A và sau các gen tạo các chất B, C, D, E, F. Nói cách khác, đột biến này gây ra sự kìm hãm trao đổi chất ở giai đoạn cuối cùng của sinh tổng hợp chất A - chất cuối cùng của chuỗi sinh tổng hợp.



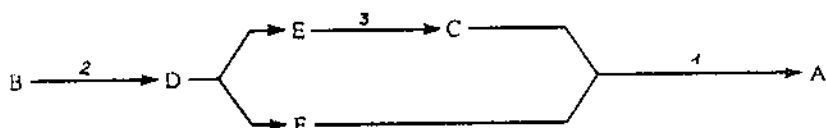
+ **Chứng 2** :

Chứng chỉ mọc khi cung cấp A hay D, nhưng thêm B không có kết quả. Thêm vào hỗn hợp E + F hay C + F làm cho chứng này mọc, cho phép suy ra rằng trình tự trung gian chia thành 2 nhánh, cả hai đều cần cho sinh tổng hợp chất A : E và C ở một nhánh, còn F ở nhánh kia. Vị trí của chất D chưa xác định được : nó có thể là chất tiền thân chung cho cả hai nhánh, hoặc được tổng hợp sau khi hai nhánh chấp lại. Vị trí cuối cùng của sản phẩm A đã được khẳng định và sự kìm hãm enzyme được can thiệp trực tiếp sau B.



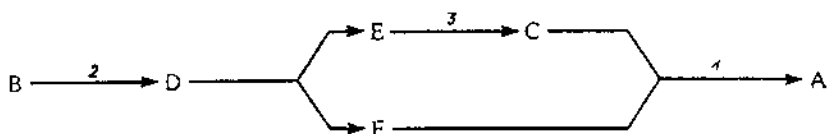
+ **Chứng 3** :

Chứng chỉ mọc khi cung cấp A và C, nhưng thêm D không có hiệu quả. Điều này giải thích sự bất định trước đây: D không thể nằm trực tiếp trước A. Nói cách khác, sự kìm hãm trao đổi chất can thiệp ở đây trước khi hình thành C, nhưng sau E.



+ **Chứng 4** :

Chứng chỉ mọc với sự bổ sung E + F hay C + F; nó không thể mọc nếu chỉ thêm D. Đột biến tác động làm cản sự phân nhánh D thành E và F.



CÁC BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Việc nghiên cứu đột biến với nhiệt độ ở gen *mem-A* cho thấy không có hoạt tính của enzyme *mem-A* ở 40°C mặc dù hoạt tính có ở 34°C. Enzyme được chiết sạch từ tế bào mọc ở 34°C và thử ở 42°C, nó vẫn có hoạt tính ở nhiệt độ này. Có thể rút ra kết luận gì về mối quan hệ giữa gen *mem-A* và enzyme *MemA* ?

2. Người ta thu nhận được vài trăm các đột biến nhằm nghĩa (missense) độc lập với nhau ảnh hưởng đến protein A của enzyme tryptophane synthetase. Lúc đầu, người ta hi vọng sẽ tìm được ít nhất một đột biến ảnh hưởng đến một trong số 186 vị trí amino acid của phân tử protein. Tuy nhiên chỉ một ít trong 30 vị trí được biểu hiện do một hay nhiều hơn các thể đột biến. Nêu vài khả năng giải thích vì sao vị trí các đột biến nhằm nghĩa đã bị hạn chế ít như vậy ?

3. Giải thích cơ sở đột biến của các tác nhân gây đột biến sau : 5-bromuracil, 2-aminopurin, acid nitro HNO_2 và màu acridine vàng cam. Đồng thời xác định xem chúng tạo đồng chuyển (transition), ví dụ AT $\rightarrow$ GC hay ngược lại, hay đảo chuyển (tranversion), ví dụ AT $\rightarrow$ TA hay ngược lại hoặc lệch khung (frameshift).

4. Ở bắp gen *Dt* ("dotted", có đốm) là một gen mutator (gen gây đột biến) tác động lên tổng đột biến từ *a* $\rightarrow$ A, gen lặn *a* cho nội nhũ không màu và gen trội A cho nội nhũ có màu. Trong tổ hợp lai giữa cây đục (phấn hoa) *Dt/Dt*, *a/a* và một cây cái *dt/dt*, *a/a* người ta quan sát thấy trung bình có 7,2 đốm màu (đột biến) trên một hạt. Trong tổ hợp lai ngược lại, người ta tìm thấy 22,2 đốm/hạt. Giải thích sự khác nhau.

5. Ở bắp, tần số đột biến của locus *R* (màu của cây) rất cao : 492 đột biến trên 10^6 giao tử. Gen tạo màu đỏ của nội nhũ *Pr* có tần số đột biến 11 trên 10^6 giao tử. Cần phải phân tích bao nhiêu cây mới tìm được một đột biến kép ngẫu nhiên?

6. Biết một cặp nucleotide. Hãy viết ra :

a) Tất cả các đồng chuyển có thể xảy ra.

b) Tất cả các dị chuyển (traversions) có thể xảy ra.

c) Giả sử trong quá trình tiến hóa purine và pirimidine có khả năng chuyển đổi ngẫu nhiên : tỉ lệ đảo chuyển/ đồng chuyển sẽ như thế nào?

d) Nghiên cứu các gốc tương đồng của hemoglobin và myoglobin ở các loài khác nhau, chúng tỏ rằng trong quá trình tiến hóa 293 đồng chuyển có

lẽ đã xảy ra so với 548 đảo chuyển. Các kết quả này phù hợp hay không với giả thuyết “một đồng chuyển trên hai đảo chuyển” ? Thử X^2 .

7. Ở *Neurospora*, nhiều dòng đột biến được phân lập, chúng không mọc được trên môi trường tối thiểu nếu không được thêm vào các chất trao đổi biến dưỡng đặc biệt. Căn cứ vào số liệu kê ở bảng dưới đây (+ là mọc, 0 là không mọc) tìm lại các con đường sinh tổng hợp của dòng hoang dại ban đầu và chỉ rõ sự kìm hãm ở mỗi thể đột biến. (Giả sử rằng mỗi đột biến chỉ ảnh hưởng tới một gen).

a)

Chủng đột biến	Các chất bổ sung vào môi trường tối thiểu				
	Citrulline	Glutamic semialdehyde	Arginine	Ornithine	Glutamic acid
1	+	0	+	0	0
2	+	+	+	+	0
3	+	0	+	+	0
4	0	0	+	0	0

b)

Dòng đột biến	Các nhân tố phát triển			
	A	B	C	D
1	0	0	+	+
2	0	0	0	+
3	+	0	+	+
4	0	+	+	+

c)

Dòng đột biến	Các chất biến dưỡng			
	E	F	G	H
1	+	0	0	+
2	0	0	+	+
3	0	0	0	+
4	0	+	0	+

CHƯƠNG IX

ĐỘT BIẾN CẤU TRÚC VÀ SỐ LƯỢNG NHIỄM SẮC THỂ

Lĩnh vực *di truyền tế bào* (cytogenetics) nghiên cứu các biến đổi *cấu trúc* và *số lượng* nhiễm sắc thể gây ra các kiểu hình đột biến. Có nhiều kiểu biến đổi cấu trúc nhiễm sắc thể khác nhau như : mất đoạn, tăng đoạn, đảo đoạn và chuyển đoạn. Sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể có thể ở cả bộ như đa bội thể nguyên, đa bội thể lai hay dị bội thể hoặc ở từng cặp (đa bội thể lệch).

Các đột biến *cấu trúc* nhiễm sắc thể (change in chromosome structure) còn gọi *sai hình* nhiễm sắc thể (chromosome aberration) hay *cấu trúc lại* nhiễm sắc thể (chromosome rearrangement) được phát hiện bằng phương pháp tế bào học. Các đột biến loại này thực chất là *sắp xếp lại các gen* hoặc giảm hay tăng liều lượng gen. Lúc đầu các biến đổi đột biến này được phát hiện khi lai, về sau nhờ tiến bộ của phương pháp nhuộm màu nên nhận diện được trên nhiễm sắc thể. Các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể dễ quan sát ở *Drosophila* (nhiễm sắc thể khổng lồ) và bắp, nên điều này giải thích vì sao hai đối tượng này thường được nhắc đến nhiều.

Các sai hình nhiễm sắc thể có thể chia thành 2 loại :

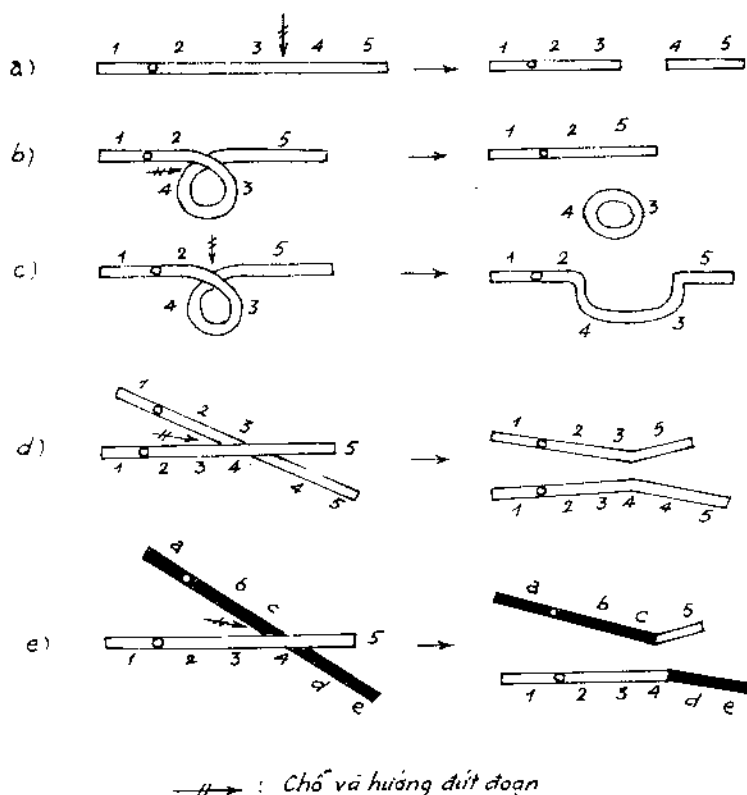
- Bên trong nhiễm sắc thể: mất đoạn, đảo đoạn và tăng đoạn.
- Giữa các nhiễm sắc thể : chuyển đoạn, nhiễm sắc thể đều và chuyển đoạn Robertson.

I. BIẾN ĐỔI CẤU TRÚC TRÊN MỘT NHIỄM SẮC THỂ

1. Sự phát sinh các đột biến cấu trúc trên nhiễm sắc thể

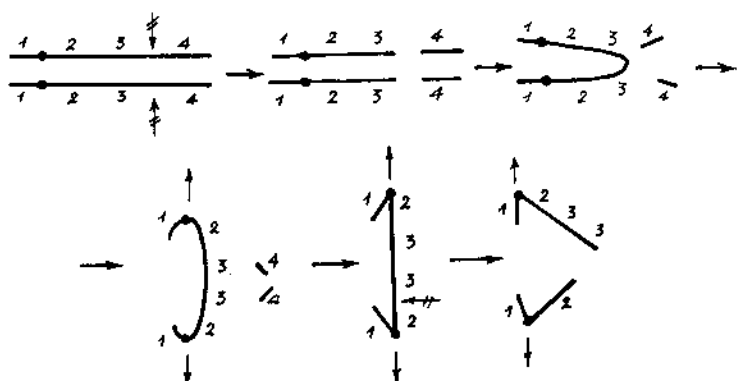
Sai hình nhiễm sắc thể liên quan đến sự *đứt đoạn* của nhiễm sắc thể. Có khi một nhiễm sắc thể bị đứt ra quá 2 đoạn và sau đó được nối lại nhưng thường không giữ cấu trúc cũ. Điều đó dẫn đến nhiều kiểu đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể khác nhau (hình 9.1).

Các đoạn hoặc vòng tròn đứt rời không tâm động thường bị mất đi trong phân bào. Có thể xảy ra trường hợp 2 đoạn có tâm động nối nhau, khi phân bào sẽ bị kéo căng ra 2 đầu thành cấu chromatide và sau đó bị đứt ra không đều tạo ra 1 cái mất đoạn, cái kia tăng đoạn (hình 9.2)



Hình 9.1. Cách phát sinh một số đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể

a) Mất dính: do đứt và không dính lại ; b) Mất đoạn : do vòng và đứt dọc ; c) Đảo đoạn. do vòng và đứt ngang ; d) Lặp đoạn và mất đoạn: do nhiễm sắc thể chéo chữ thập và đứt dọc, kết quả một tăng đoạn và một mất đoạn ; e) Chuyển đoạn: hai nhiễm sắc thể không tương đồng chéo nhau, đứt ra và nối lại.



Hình 9.2. Hậu quả của đứt và liên đoạn giữa 2 nhiễm sắc thể lúc phân bào
 Các đoạn hoặc vòng tròn đứt rời không tâm động thường bị mất. Trường hợp 2 đoạn có tâm động nối nhau, khi phân bào sẽ bị kéo căng ra 2 đầu thành cấu chromatide.

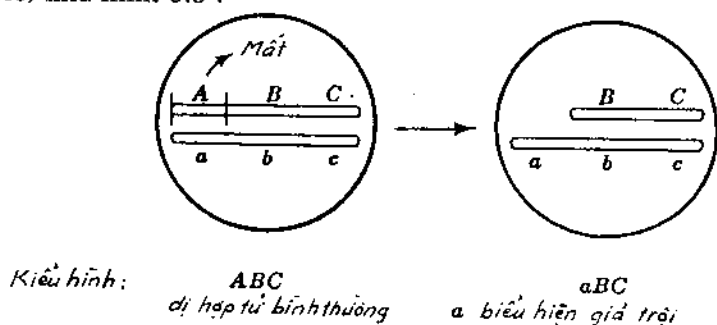
2. Mất đoạn

Sự thiếu một đoạn nhiễm sắc thể gồm hai loại : **mất đoạn** (deletion) ở giữa nhiễm sắc thể và **mất đỉnh** (deficiency). Đoạn nhiễm sắc thể bị mất nếu nhỏ có thể mang một gen hoặc một phần gen. Trong trường hợp này hiệu quả kiểu hình có thể giống như xuất hiện allele đột biến ở locus đó. Ví dụ đột biến "notch" liên kết với X, có biểu hiện như một allele trội.

Các mất đoạn không có đột biến nghịch, bởi vì đoạn nhiễm sắc thể bị mất khó ngẫu nhiên được gắn trở lại do đột biến. Nhờ đó mất đoạn có thể phân biệt với đột biến gen.

Sự mất một đoạn dài nhiễm sắc thể thường gây chết do sự mất cân bằng di truyền của bộ gen.

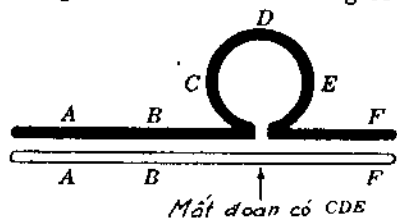
Khi một sinh vật dị hợp tử, ví dụ Aa , sự mất đoạn có A thì allele a lặn trên nhiễm sắc thể kia có biểu hiện kiểu hình. Hiện tượng này được gọi là "**giả trội**" (pseudodominant), thật ra locus tương ứng ở trạng thái **bán hợp tử** (hemizygote) như hình 9.3 :



Hình 9.3. Sơ đồ mô tả hiện tượng "giả trội"

Sự mất đỉnh của đoạn nhiễm sắc thể mang gen trội A cho phép allele lặn a có biểu hiện kiểu hình

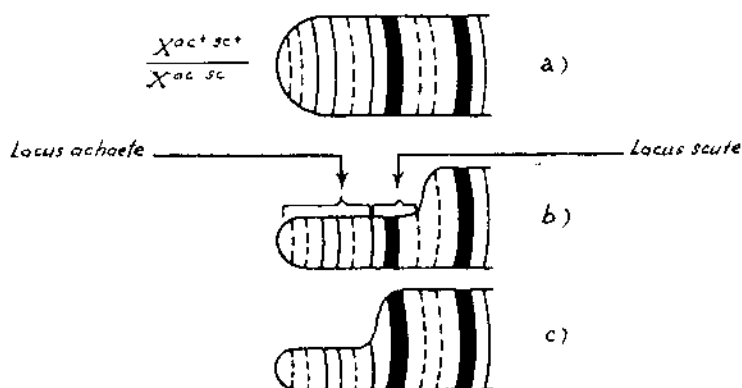
Sự mất đoạn ở cá thể dị hợp tử có thể phát hiện ở kì trước của giảm phân I. Khi các nhiễm sắc thể tương đồng bắt cặp. Nếu có mất đoạn sẽ thấy một vòng tròn nổi lên do không có đoạn tương đồng (hình 9.4).



Hình 9.4. Tiếp hợp ở giảm phân I khi có mất đoạn

Các mất đoạn chồng lấp (overlapping deletions) đã được sử dụng rộng rãi để xác định vị trí cụ thể của gen trên nhiễm sắc thể (xây dựng bản đồ). Ví dụ, dòng ruồi cái *Drosophila* mang 2 cặp gen ở đỉnh của nhiễm sắc thể X vị trí cis $X^{ac+sc}X^{acsc}$ (ac - acaete và sc - scute).

Sự mất dính ở một nhiễm sắc thể cho thấy hiện tượng giả trội đối với cả 2 gen. Trong các cá thể khác, hiện tượng giả trội chỉ có ở *achaete*. Rõ ràng, hai mất dính này chồng lấp nhau. Trên nhiễm sắc thể khổng lồ của *Drosophila*, sự vắng mặt các đoạn tương ứng dễ quan sát (hình 9.5). Gen *scute* nằm ở phía xa dính hơn.



Hình 9.5. Mất đoạn chồng lấp ở 2 locus *ac* và *sc*

a) Sự bất cặp chặt của 2X ở ruồi cái dị hợp tử $ac^+sc^+/acsc$

b) Giả trội đối với *achaete* và *scute*

c) Giả trội đối với *achaete*

Một ví dụ về đột biến mất đoạn ở người là mất vai ngắn của nhiễm sắc thể số 5 dẫn đến hội chứng “*Cri du chat*” (Cri du chat theo tiếng Pháp có nghĩa “tiếng kêu của mèo”).

Ở người, sự mất một phần vai dài của nhiễm sắc thể số 22 được gọi là **nhiễm sắc thể Philadelphia** (Philadelphia chromosome - lấy tên thành phố nơi phát hiện ra đầu tiên). Nó chỉ được tìm thấy ở tủy xương (cùng với các tế bào có nhiễm sắc thể bình thường) của 90% những người bệnh bạch huyết myelocyte kinh niên (một dạng ung thư). Thường đoạn mất đó bị chuyển đến một nhiễm sắc thể dài hơn (thường là số 9).

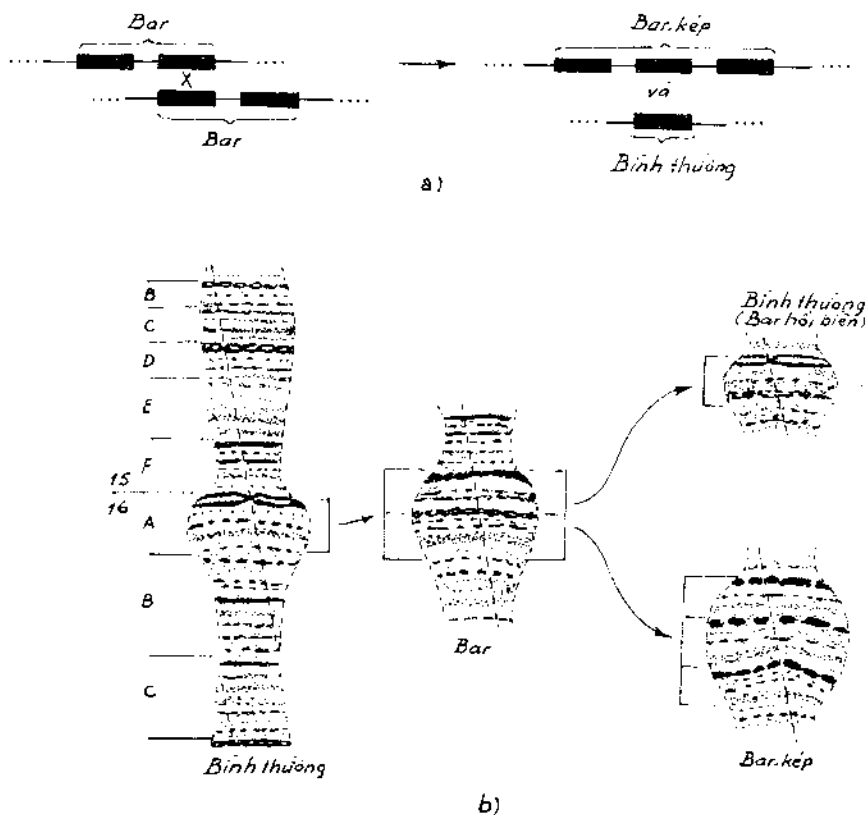
3. Lặp đoạn (Tăng đoạn - Duplication)

Các đoạn của nhiễm sắc thể có thể được tăng lên bằng nhiều cách khác nhau. Nói chung, sự lặp đoạn không gây hậu quả nặng nề như bị mất đoạn. Thậm chí, một số tăng đoạn có lợi cho tiến hóa là tạo vật liệu di truyền mới. Nhờ các gen ban đầu vẫn tiếp tục đảm bảo các nhu cầu bình thường của cơ thể, các gen mới tăng thêm không nhất thiết phải đột biến tạo dạng mới làm mất đi sự thích ứng trung gian. Sự dồi dào di truyền có thể bảo vệ cơ thể khỏi sự mất các gen hay các hiệu quả gây chết do mất đoạn.

Đoạn lặp có thể ở cạnh nhau, xa nhau trên cùng một nhiễm sắc thể hay ở vào các nhiễm sắc thể khác.

Nhờ lặp đoạn có thể nghiên cứu ảnh hưởng của số lượng và vị trí khác mức bình thường của một đoạn nhiễm sắc thể hay gen. Kiểu hình của lặp đoạn có khi trội, có khi lặn hay trung gian hoặc có tác động tích lũy.

Trường hợp điển hình về lặp đoạn là đột biến trội mắt thoi Bar (B), nằm trên nhiễm sắc thể X của *Drosophila* (hình 9.6).



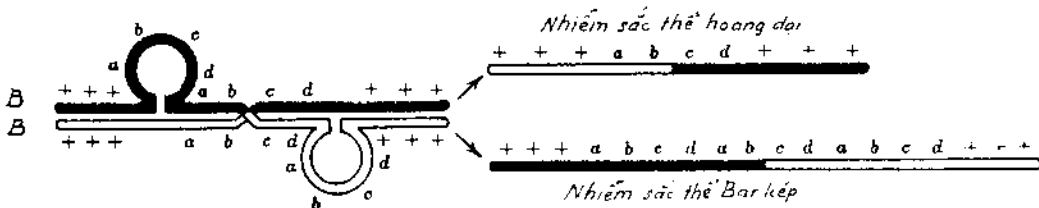
Hình 9.6 Các kiểu gen hoang dại. Bar và Bar kép tương ứng với các đoạn trên nhiễm sắc thể không ló

a) Sơ đồ ; b) Ảnh hiển vi

Trong trường hợp tăng một đoạn, dị hợp tử +/Bar thì mắt bé hơn mắt bình thường một ít, hẹp cạnh nên có dạng kéo dài. Ruồi đồng hợp BB có mắt nhỏ hơn. Nếu lặp đoạn đôi (tăng hơn bình thường 2 đoạn) sẽ là đột biến Bar kép thì có kiểu hình mắt nhỏ hơn nữa gọi là “thoi kép”. Số đoạn lặp lại có thể đến 7 thành siêu “Bar”, mắt nhỏ nhất.

Gen mắt thời B có tác động gia tăng theo chiều giảm kích thước mắt, số lặp đoạn càng nhiều lên mắt càng bé đi. Có trường hợp khác lặp đoạn tác động theo hướng ngược lại, số đoạn càng tăng thì kiểu hình lại càng trở về bình thường hơn.

Sự tăng đoạn ở Bar như một nhân tố trội về mặt di truyền. Khi nuôi các ruồi Bar đồng hợp tử BB thì nhận thấy các ruồi hoang dại xuất hiện ở ruồi con với tần số 1/1600 và các ruồi Bar kép cũng xuất hiện với tần số tương tự. Sự xuất hiện các kiểu hình bất thường có thể giải thích bằng trao đổi chéo không cân bằng khi tiếp hợp ở giảm nhiễm I (hình 9.7).



Hình 9.7. Trao đổi chéo không cân bằng trong giảm phân I ở ruồi mắt thời BB
a-b-c-d là các lặp đoạn. Bên trái là các nhiễm sắc thể của BB bất cặp lệch dần đến
tạo 2 nhiễm sắc thể : 1 bình thường của dạng hoang dại và 1 Bar kép.

4. Đảo đoạn (Inversion)

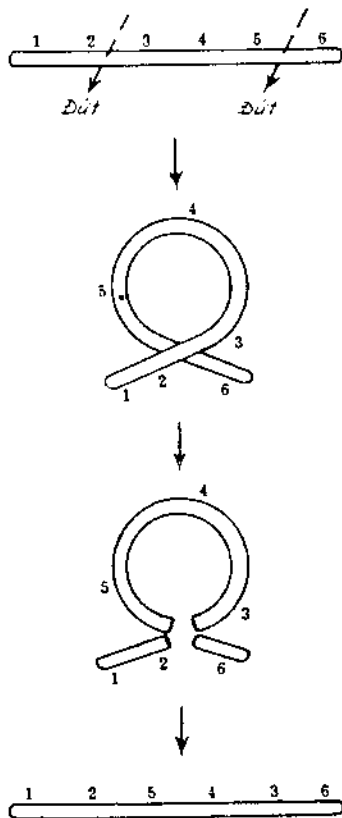
Đảo đoạn xảy ra lúc đoạn trong đứt đi quay 180° rồi được nối lại.

Giả sử trình tự bình thường của đoạn nhiễm sắc thể là (1-2-3-4-5-6) và 2 chỗ đứt xảy ra ở vùng 2-3 và 5-6, và đoạn đứt nối lại đảo ngược. Như vậy, nhiễm sắc thể có đoạn (1-2-5-4-3-6) (hình 9.8).

Ở tế bào dị hợp tử có đảo đoạn, một nhiễm sắc thể có đoạn đảo và các đoạn tương đồng có thứ tự gen bình thường. Các gen trong đoạn đảo được sắp xếp theo thứ tự ngược, còn ở phần khác của nhiễm sắc thể thì trình tự như cũ.

Đoạn nhiễm sắc thể tạo vòng chéo 2 đầu, 2 chỗ đứt giữa 2-3 và 5-6 tách rời đoạn 3-4-5. Sau đó đoạn 2 nối với 5 và 3 nối với 6.

Hình 9.8. Nguồn gốc của đảo đoạn



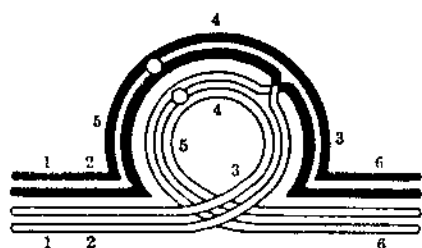
a) Đảo đoạn mang tâm động (Pericentric inversion)

Tâm động nằm bên trong đoạn bị đảo. Trong giảm nhiễm I các nhiễm sắc thể tương đồng khi tiếp hợp sẽ tạo vòng tròn kép. Nếu không có trao đổi chéo xảy ra thì kì sau I bình thường. Nếu trao đổi chéo xảy ra giữa 2 sợi nhiễm sắc thể đơn trong vùng đảo đoạn thì 2 chromatid đó của mỗi nhiễm sắc thể thường có chiều dài không cân bằng nhau. Trong trường hợp này một nửa sản phẩm của giảm phân vừa có lặp đoạn lại có mất đoạn nên mất sức sống. Nửa khác của các giao tử (không có trao đổi chéo) có sức sống bình thường: 1/4 có đoạn với trình tự gen bình thường và 1/4 có đoạn đảo.

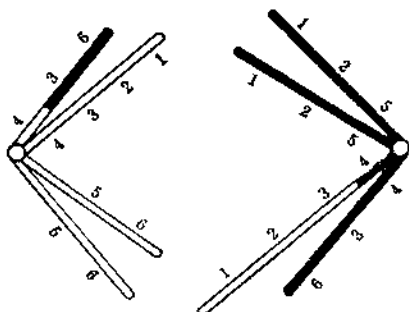
Ví dụ, ở dị hợp tử có đảo đoạn xảy ra trao đổi chéo ở vùng 3-4 như mô tả ở hình 9.9.

Các nhiễm sắc thể tái tổ hợp có đoạn trắng đoạn đen đều làm giao tử mất sức sống vì có gen thừa, có gen thiếu:

- Nhiễm sắc thể đen trắng bên trái có các gen: (6-3-4-5-6) (2 gen 6, thiếu 1-2)
- Nhiễm sắc thể đen trắng bên phải có các gen (1-2-5-4-3-2-1) (2 cặp gen 1-2, lại thiếu 6).



Tiếp hợp và trao đổi chéo



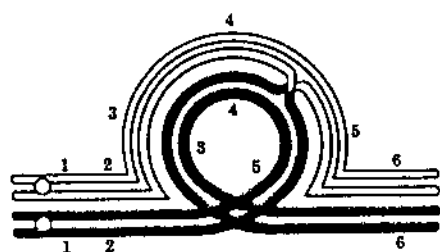
Kì sau I

Hình 9.9. Trao đổi chéo xảy ra ở đoạn đảo

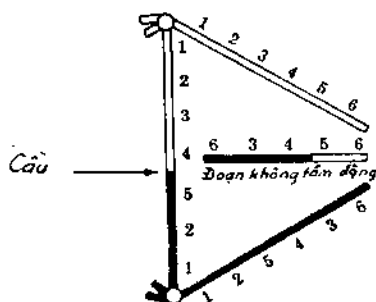
LƯU Ý: Ở hình bên phải, các nhiễm sắc thể trắng hoặc đen cả giao tử có sức sống bình thường vì mang đủ các gen (1-2-3-4-5-6).

b) Đảo đoạn không mang tâm động (Paracentric inversion)

Tâm động nằm ngoài đoạn bị đảo. Trao đổi chéo xảy ra bên trong đoạn đảo tạo nhiễm sắc thể hướng tâm (có 2 tâm động - decenteric chromosome) và trong kì sau I sẽ tạo nên cầu nối (bridge) nối 2 cực tế bào. Cầu nối sẽ bị đứt ở chỗ bất kì tạo ra các đoạn không cân bằng chứa lặp đoạn hoặc mất đoạn. Ví dụ, trường hợp xảy ra trao đổi chéo giữa 4-5 như trên hình 9.10.



Tiếp hợp và trao đổi chéo



Kì sau I

Hình 9.10. Trao đổi chéo xảy ra ở đảo đoạn không mang tâm động

Các nhiễm sắc thể không có trao đổi chéo (trắng cả hay đen cả) tạo giao tử có sức sống - số khác tạo giao tử mất sức sống vì không cân bằng di truyền. Đoạn không tâm động (acentric fragment) được tạo ra và sẽ bị mất vì không di chuyển được về cực. Một nửa sản phẩm của giảm nhiễm sẽ mất sức sống vì do thừa và thiếu gen; 1/4 có sức sống bình thường và 1/4 có sức sống với nhiễm sắc thể có đảo đoạn.

Ở cả 2 trường hợp, trong sản phẩm I khi tiếp hợp các dị hợp tử có đảo đoạn đều tạo vòng tròn nhiễm sắc thể kép. Các đảo đoạn thường tạo nên bất thụ một nửa (semisterility). Đôi khi người ta còn gọi các đảo đoạn là "nhân tố ức chế trao đổi chéo" (crossing over suppressor), vì trong cả 2 ví dụ nêu trên các nhiễm sắc thể có trao đổi chéo đều mất cân bằng gen nên tạo các giao tử không có sức sống.

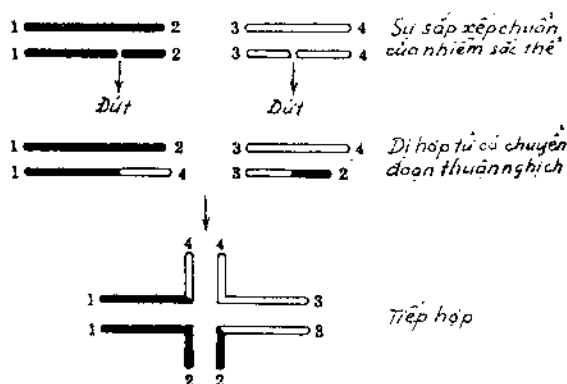
II. BIẾN ĐỔI CẤU TRÚC GIỮA CÁC NHIỄM SẮC THỂ

Sự thay đổi các đoạn nhiễm sắc thể có thể xảy ra giữa các nhiễm sắc thể khác nhau.

1. Chuyển đoạn (Translocation)

Chuyển đoạn là sự trao đổi các đoạn giữa các nhiễm sắc thể không tương đồng. Chuyển đoạn liên quan đến nhiều nhiễm sắc thể khác nhau cùng đứt đoạn rồi sau đó trao đổi đoạn đứt với nhau. Trao đổi đoạn có thể xảy ra trong đôi nhiễm sắc thể tương ứng (thường khác chức năng) ví dụ giữa X và Y, hoặc giữa các nhiễm sắc thể khác đôi.

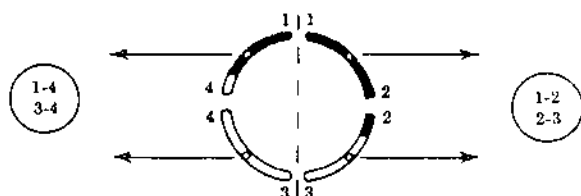
Sự chuyển đoạn thuận nghịch (reciprocal) xảy ra do sự trao đổi các đoạn giữa 2 nhiễm sắc thể không tương đồng. Hình 9.11 mô tả chuyển đoạn thuận nghịch giữa cặp nhiễm sắc thể 1-2 và 3-4 (để đơn giản chỉ mô tả nhiễm sắc thể (không phải chromatid) và không ghi tâm động).



Hình 9.11. Sự hình thành chuyển đoạn và sự tiếp hợp của chúng trong giảm phân I

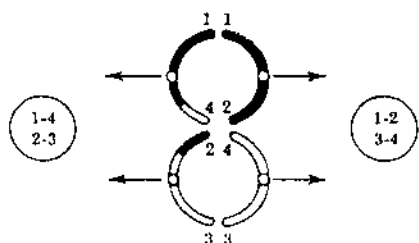
Trong giảm phân I, các nhiễm sắc thể có chuyển đoạn tiếp hợp với nhau tạo nên hình chéo. Tiếp theo khi các nhiễm sắc thể đẩy nhau để về các cực thì sẽ có 2 tình huống:

– Bốn nhiễm sắc thể vào cuối kì trước I đẩy nhau tạo nên vòng tròn (hình 9.12). Sự phân li trong trường hợp này (theo mũi tên) sẽ tạo nên các giao tử không sức sống vì mang một số nhiễm sắc thể có dư hoặc thiếu gen, ví dụ : 1-4-3-4 thiếu 2 và 1-2-2-3 thiếu 4 .



Hình 9.12. Các nhiễm sắc thể tạo vòng tròn và sự phân li của chúng
Mũi tên chỉ hướng phân li về các cực

– Sự hình thành hình số 8 do đẩy chéo nhau giữa các nhiễm sắc thể (hình 9.13). Trong trường hợp này các giao tử được tạo nên có sức sống vì có cân bằng gen (mỗi giao tử đều có 1-2-3-4).



Hình 9.13. Các nhiễm sắc thể đẩy nhau tạo thành hình số 8

Mũi tên chỉ hướng phân li về các cực của tế bào. Hai tình huống trên xảy ra với xác suất như nhau nên các dạng có chuyển đoạn thường nửa bất dục (50% giao tử chết). Tiêu chuẩn thứ hai để phát hiện các chuyển đoạn là có sự thay đổi nhóm liên kết gen. Một số gen của một

nhóm liên kết gen được chuyển sang nhóm liên kết khác.

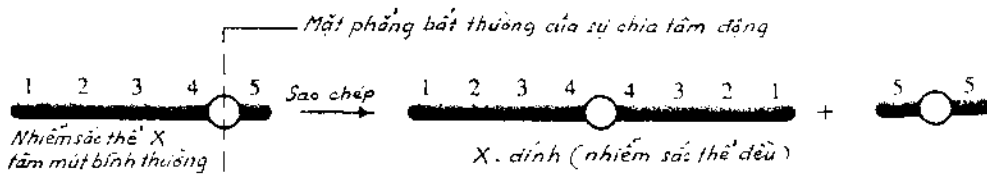
Ngoài các hệ qua di truyền trên, chuyển đoạn có thể gây hiệu quả vị trí (position effect). Các gen khi dời chỗ có thể có biểu hiện khác, ví dụ từ vùng đồng nhiễm sắc (euchromatin) chuyển sang vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin) ít có hoạt tính hơn.

Ở giống thực vật *Oenothera*, một loạt các chuyển đoạn thuận nghịch được tạo ra với sự tham gia của cả 7 cặp nhiễm sắc thể, hình thành các phức hợp chuyển đoạn (translocation complex). Nếu kí hiệu các nhiễm sắc thể bằng các số theo thứ tự, bộ nhiễm sắc thể bình thường của 7 cặp là 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12 và 13-14; bộ chuyển đoạn sẽ là 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, 10-11, 12-13, 14-1. Các dị hợp tử với nhiều chuyển đoạn như trên sẽ tạo nên vòng tròn của 14 nhiễm sắc thể trong giảm phân. Khi phân li, chỉ một bộ đơn bội nhiễm sắc thể có sự cân bằng đủ các loại gen mới tạo giao tử có sức sống. Mỗi bộ của 7 nhiễm sắc thể như vậy được di truyền thành 1 đơn vị thống nhất được gọi là phức hợp Renner. Đây là một phương thức duy trì tính dị hợp tử ở các thực vật của giống *Oenothera* và một số giống thực vật khác (*Datura*, bắp).

2. Nhiễm sắc thể đều (Isochromosome)

Các nhiễm sắc thể có hai vai dài không đều nhau có thể chuyển thành nhiễm sắc thể đều với 2 vai bằng nhau về chiều dài và tương đồng với nhau về mặt di truyền, nhờ sự phân chia tâm động khác thường vuông góc với sự tách tâm động bình thường.

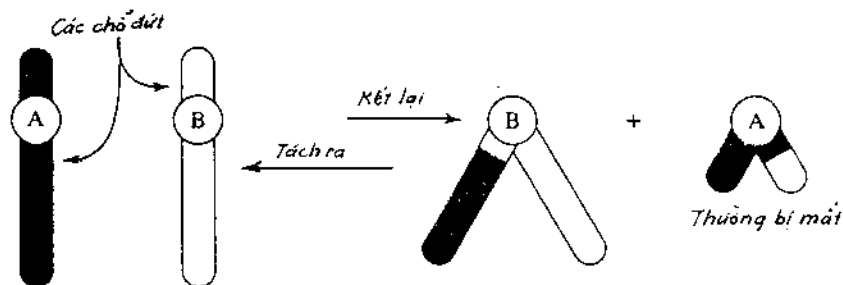
Nhiễm sắc thể X tâm mút (telocentric X chromosome) của *Drosophila* có thể chuyển thành dạng "X-dính" ("attached-X") nhờ sự phân chia của tâm động theo chiều vuông góc với bình thường (hình 9.14). Do sự phân chia khác thường đó, 2 chromatid thay vì phân li về 2 cực lại dính nhau, đoạn 5 bị mất.



Hình 9.14. Sự hình thành của nhiễm sắc thể X dính
(đoạn 5 là chất dị nhiễm sắc không quan trọng)

Như vậy, 1 nhiễm sắc thể có 2 vai đều nhau được tạo thành.

3. Chuyển đoạn Robertson (*Robertsonian translocation*)



Hình 9.15. Sự hình thành nhiễm sắc thể tâm giữa do sự nối lại của 2 nhiễm sắc thể tâm đầu (chuyển đoạn Robertson)

Một chuyển đoạn đặc biệt được gọi là Robertson. Đây là trường hợp hình thành một nhiễm sắc thể tâm giữa (metacentric) do sự nối lại của 2 nhiễm sắc thể (hình 9.15). Chuyển đoạn thuận nghịch thực hiện giữa 2 nhiễm sắc thể tâm đầu (acrocentric) A và B, khi A bị đứt phía dưới tâm động tạo vai dài mất tâm động, còn ở B chỗ đứt ở phía đầu mút gần trên tâm động; hai đoạn nối nhau tạo nhiễm sắc thể tâm đều mang tâm động của B. Đoạn có tâm động A với vai ngắn nối với đoạn ngắn của B hình thành nhiễm sắc thể con có tâm động A. Nhiễm sắc thể con mới có nhiều chất dị nhiễm sắc không quan trọng nên thường mất đi. Chuyển đoạn Robertson có hậu quả làm giảm số lượng nhiễm sắc thể.

Người có 46 nhiễm sắc thể, các vượn người (hắc tinh tinh, khỉ đột, đười ươi) có 48 nhiễm sắc thể. Nhiễm sắc thể thứ 2 của người gồm 2 đoạn giống 2 nhiễm sắc thể khác nhau của các vượn người. Rất có thể từ tổ tiên chung một chuyển đoạn Robertson đã tạo nên loài người do sự nối lại của 2 nhiễm sắc thể khác nhau, làm giảm đi số nhiễm sắc thể còn 46 thay vì 48 như ở các loài vượn người.

4. Thay đổi hình thái nhiễm sắc thể

Các đột biến cấu trúc đều có thể làm thay đổi hình thái nhiễm sắc thể. Các mất đoạn hay lặp đoạn, nếu giao tử sống trong một số trường hợp có thể phát hiện bằng tế bào học các thay đổi kích thước của nhiễm sắc thể (hoặc thay đổi đặc tính các vết đối với nhiễm sắc thể khổng lồ ở ruồi giấm). Đảo đoạn thường không làm thay đổi chiều dài của nhiễm sắc thể, nhưng đảo đoạn có tâm động (pericentric) thì vị trí tâm động có thể thay đổi đáng kể.

Chuyển đoạn có thể làm thay đổi cấu trúc của nhiễm sắc thể cả về mặt di truyền và hình thái. Chuyển đoạn Robertson và nhiễm sắc thể đều vừa nêu trên cho thấy sự thay đổi rõ rệt hình thái nhiễm sắc thể.

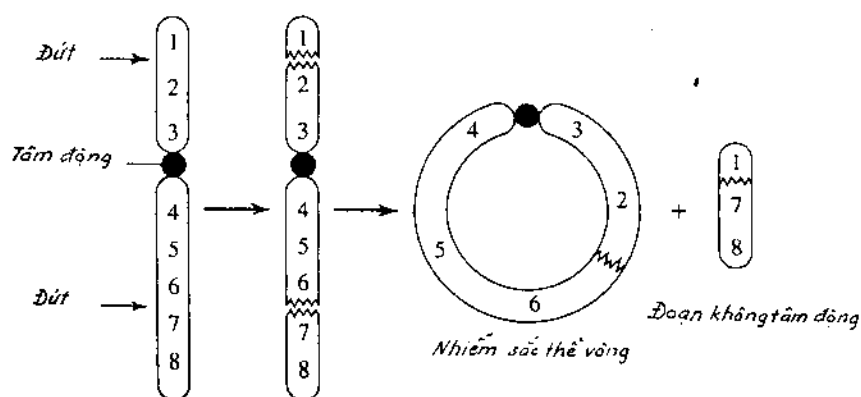
Ngoài ra, nhiễm sắc thể có thể có một số dạng thay đổi hình thái khác.

a) Chu trình cầu - đứt - nối - cầu

Kích thước của nhiễm sắc thể có thể thay đổi trong mỗi lần phân bào nếu bị gãy. Sự sao chép tiếp theo của nhiễm sắc thể gãy, các đầu gãy của các chromatid di chuyển vào các cực đối nhau, cầu được tạo ra. Cầu sẽ bị gãy ở một điểm nào đó dọc theo chiều dài và chu trình được lập lại. Trình tự của các sự kiện nối tiếp đó được gọi là chu trình cầu - đứt - nối - cầu (bridge - breakage - fusion - bridge cycle). Một số mô khảm (mosaic tissue) có thể liên quan đến chu trình này.

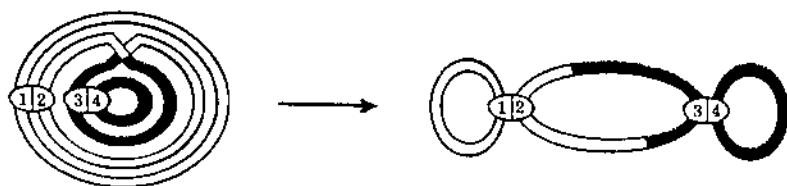
b) Các nhiễm sắc thể vòng tròn

Các nhiễm sắc thể không phải lúc nào cũng hình que. Các nhiễm sắc thể vòng tròn có thể ngẫu nhiên phát hiện ở động vật và thực vật. Nếu chỗ đứt xảy ra ở mỗi đầu của nhiễm sắc thể, các đầu gãy có thể nối lại thành vòng tròn (hình 9.16). Nếu các đoạn ngắn không tâm động nối lại nhau, chúng sẽ nhanh chóng bị mất trong phân bào.



Hình 9.16. Sự hình thành nhiễm sắc thể vòng tròn

Nếu có 1 trao đổi chéo xảy ra giữa các vòng tròn tương đồng thì ở kì sau sẽ tạo ra cầu đôi (hình 9.17).



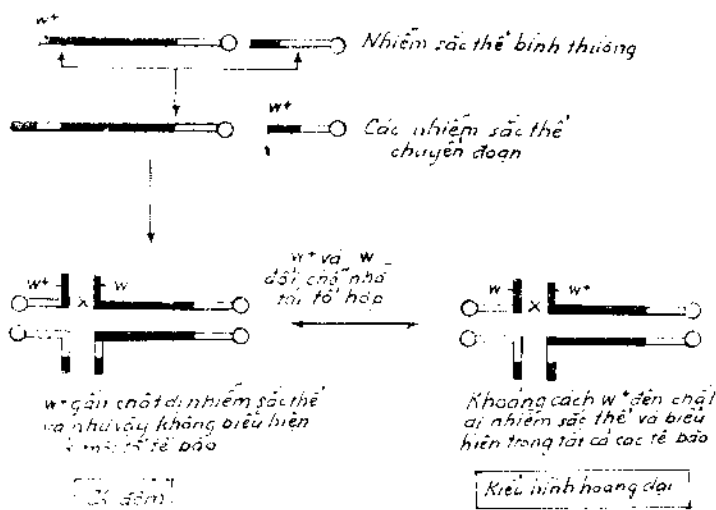
Hình 9.17. Một trao đổi chéo xảy ra giữa 2 vòng tròn tương đồng sẽ tạo ra cầu đôi ở kì sau

5. Hiệu quả vị trí (Position effect)

Các biến đổi cấu trúc nhiễm sắc thể có thể dẫn đến hiệu quả vị trí. Đảo đoạn và chuyển đoạn tuy không có thay đổi lớn về số lượng gen, nhưng cũng có hiệu quả vị trí trong một số trường hợp. Chúng có thể mang gen từ vùng đồng nhiễm sắc (gen có hoạt tính) đến vùng dị nhiễm sắc (ít có hoạt tính). Nhiều trường hợp gen hoang dại ở vùng đồng nhiễm sắc được đưa tới vùng dị nhiễm sắc thì hoạt tính không ổn định, chẳng hạn như sự thay đổi đốm (variegation) màu mắt do tái tổ hợp ở dây allele W (hình 9.18).

Hiệu quả vị trí sẽ thấy rõ hơn khi tìm hiểu về sự dời chỗ gen (transposition) và xen đoạn gen (insertion).

Tóm lại, các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể gây nên nhiều loại biến đổi như thay đổi kiểu hình, thay đổi nhóm liên kết, hay hiệu quả vị trí; có thể ảnh hưởng đến tiếp hợp trong giảm phân I và thường đưa đến bất dục với một tỉ lệ nhất định. Các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể có ý nghĩa tiến hóa nhất định, chúng tham gia vào các cơ chế cách li giữa các loài.



a)

b)

Hình 9.18. Sự biến đổi đốm do hiệu quả vị trí ở mắt ruồi

a) Chuyển đoạn của w^+ đến gần vùng dị nhiễm sắc ;

b) Sự xuất hiện mắt đốm do hiệu quả vị trí (đốm đen - màu đỏ và đốm trắng - màu trắng);

III. DA BỘI THỂ NGUYÊN

Như chúng ta đã biết (chương IV), mỗi loài đều có số lượng nhiễm sắc thể đặc trưng. Phần lớn các sinh vật bậc cao là lưỡng bội ($2n$) với 2 bộ nhiễm sắc thể đơn bội (n) : một bộ có nguồn gốc từ cơ thể cha, bộ kia từ cơ thể mẹ.

Bên cạnh sự thay đổi đều đặn nối tiếp của số bội thể (số n - ploidy), trong chu trình sống ($2n \rightarrow n + n \rightarrow 2n$), có sự biến đổi số bội thể khác mức bình thường dẫn đến những hậu quả đột biến. **Đa bội thể** (Polyploidy) hiểu theo nghĩa rộng là sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể. Sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể có nhiều kiểu: đa bội nguyên (euploidy), đa bội lai (alloploidy) và đa bội lệch (aneuploidy).

Hiện tượng **đa bội thể** rất phổ biến trong thiên nhiên. Khoảng 1/3 các loài cây có hoa (angiosperm) có nhiều hơn 2 bộ nhiễm sắc thể đơn bội trong tế bào. Hiện tượng đa bội thể cũng được tìm thấy ở các vi sinh vật *Eukaryotae* như vi nấm, vi tảo. Số nhiễm sắc thể của các loài của một số họ thực vật tạo nên đây gọi là đây đa bội như ở *Solanum*, *Rosa*.

1. Các loại đa bội thể nguyên (Euploidy)

Sự tăng nguyên lần số nhiễm sắc thể đơn bội của một loài được gọi là đa bội thể. Đây là đa bội thể hiểu theo nghĩa hẹp. Nếu có cá thể $2n$ thì dạng $3n$, $4n$, $5n$,... là dạng đa bội thể. Ví dụ: dưa hấu có $2n$ nhiễm sắc thể, người ta tạo loại dưa hấu $4n$ nhiễm sắc thể. Lại 2 loại ($2n \times 4n$) được dạng dưa hấu $3n$ nhiễm sắc thể (dưa hấu không hạt).

a) Thể đơn bội (Monoploid)

Một số sinh vật *Eukaryotae* bậc thấp như vi nấm, vi tảo có nhân đơn bội (n). Các thể đơn bội ở sinh vật bậc cao thường ít hơn và có sức sống kém hơn dạng lưỡng bội bình thường. Các thực vật đơn bội đã được tìm thấy nhưng thường bất thụ. Một số ít động vật tồn tại ở dạng đơn bội. Một ngoại lệ đáng lưu ý là ong (đực) và ong vò vẽ.

b) Thể tam bội (Triploid)

Tam bội nhiễm sắc thể ($3n$) có thể được tạo nên do sự kết hợp các giao tử đơn bội (n) với giao tử lưỡng bội ($2n$). Bộ nhiễm sắc thể đơn bội thứ ba của thể tam bội thường phân bố vào các tế bào sinh dục với nhiều loại tổ hợp khác nhau, tạo nên các giao tử mất cân bằng di truyền. Các thể tam bội có độ bất thụ cao nên có trong thiên nhiên thường ở dạng sinh sản vô tính như cây chuối.

c) Thể tứ bội (Tetraploid)

Tứ bội nhiễm sắc thể ($4n$) có thể xuất hiện trong các tế bào cơ thể do sự tăng đôi số nhiễm sắc thể của tế bào soma. Sự tăng đôi số nhiễm sắc thể bình thường có thể xảy ra bằng chất alkaloid colchicine tác động vào tế bào. Các thể tứ bội cũng có thể được tạo ra do sự hợp nhất của các giao tử $2n$.

Thể tự tứ bội (Autotetraploid) : Tiếp đầu ngữ “tự” (auto-) cho thấy số bội thể được nhân lên chỉ từ một bộ nhiễm sắc thể tương đồng. Trong giảm phân, các nhiễm sắc thể thường tạo thành **thể tứ trị** (quadrivalent) gồm bốn nhiễm sắc thể tiếp hợp nhau. Nếu sự phân li cân bằng có thể tạo các giao tử có sức sống nhờ chia đều về mỗi cực hai nhiễm sắc thể. Nếu sự phân li không cân bằng đối với tất cả các tứ trị (bộ bốn), các giao tử sẽ không cân bằng về mặt di truyền. Sự bất thụ thường biểu hiện ở một phần do các giao tử không cân bằng di truyền.

2. Đa bội thể lai (Allopoloidy)

Đa bội thể lai hay **dị đa bội thể** (allopoloidy) có được khi cả hai bộ nhiễm sắc thể của 2 loài khác nhau cùng đứng chung trong một tế bào.

Thể dị tứ bội (allotetraploid). Tiếp đầu ngữ “dị” (allo-) cho thấy có sự tham gia của các bộ nhiễm sắc thể khác nhau, tức **không tương đồng**. Thể dị tứ bội có thể hình thành qua một bước do sự kết hợp các giao tử không giảm nhiễm ($2n$) từ 2 loài khác nhau (thí dụ như $AA+BB \rightarrow AABB$). Cách thứ hai để tạo thể dị tứ bội phải qua hai bước : trước hết hai loài lưỡng bội có thể lai với nhau tạo cây F_1 **lưỡng bội bất thụ** (sterile diploid F_1). Sự bất thụ này do trong giảm phân các nhiễm sắc thể không có cặp tương đồng để bắt cặp nên phân li tạo các giao tử không cân bằng. Thể lưỡng bội bất thụ có thể trở nên hữu thụ nếu bộ nhiễm sắc thể được nhân đôi. Thí dụ : loài A với bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội AA lai với loài lưỡng bội BB qua các bước sau :

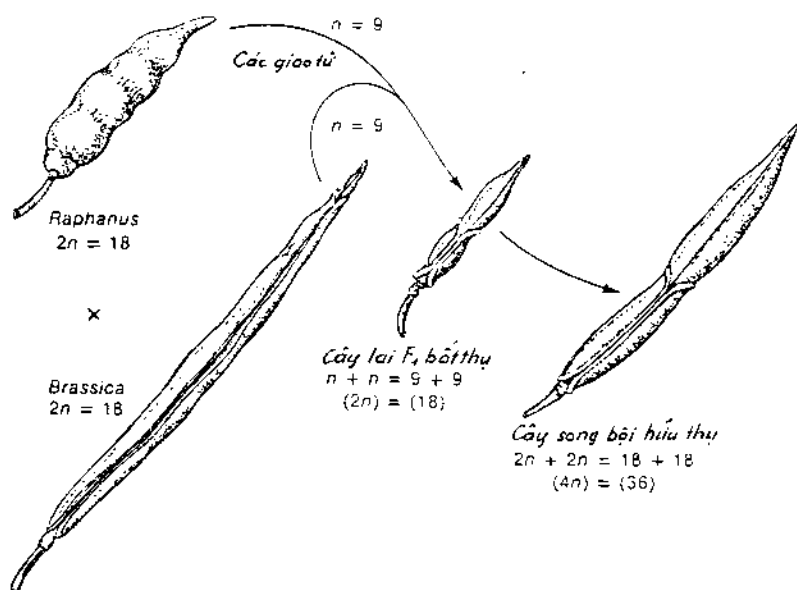
$$\begin{array}{rcl}
 P & AA & \times BB \\
 F_1 & AB & \text{(con lai bất thụ)} \\
 & \downarrow & \text{(nhân đôi bộ nhiễm sắc thể)} \\
 & AABB & \text{Thể song bội (amphidiploid) hữu thụ}
 \end{array}$$

Thể dị tứ bội được tạo ra như trên có thể phát triển bình thường và hữu thụ như dạng lưỡng bội $2n$. Thể dị tứ bội loại này chỉ tìm thấy ở thực vật và được gọi là **thể song bội** (amphidiploid).

Ví dụ cổ điển về đa bội thể lai là thí nghiệm của Karpechenko : lai cây củ cải (*Raphanus*) với cây bắp cải (*Brassica*) (hình 9.19).

Củ cải (*Raphanus*) có $2n = 18R$ và bắp cải (*Brassica*) cũng có $2n = 18B$. Con lai $9R + 9B = 18$ nhiễm sắc thể sẽ bất thụ. Nhưng con lai được mang tên *Raphanobrassica* có $2n = 18R$ ghép với $2n = 18B$ thành 36 nhiễm sắc thể ($18R + 18B$) thì hữu thụ. Con lai hữu thụ mang tính chất của cả cha lẫn mẹ. Người lai có ý tạo ra 1 cây củ cải có củ dưới đất đồng thời cho bắp cải, nhưng cây lai *Raphanobrassica* không có củ và cũng không cho bắp cải. Tuy

nhiên, đây là lần đầu tiên con người tạo ra một loài mới từ hai loài ban đầu, nên có ý nghĩa lịch sử trong di truyền học.



Hình 9.19. Lai củ cải với bắp cải

Cây lai *Raphanobrassica* có 2 bộ nhiễm sắc thể nên hữu thụ

3. Thể đa bội (Polyploid)

Thuật ngữ này có thể hiểu theo **nghĩa rộng** để chỉ tất cả các dạng với bộ nhiễm sắc thể **nhiều hơn $2n$** . Mức bội thể cao hơn tứ bội ít gặp trong thiên nhiên, nhưng một số cây trồng quan trọng là các thể đa bội. Thí dụ, lúa mì trồng là **lục bội** ($6n$), dâu tây **bát bội** ($8n$) v.v... Một số thể tam bội và tứ bội có biểu hiện kiểu hình cây to hơn, lá, hoa và quả đều to hơn dạng lưỡng bội bình thường. Nhiều loại cây ăn quả và cây cảnh là các thể đa bội.

Trong cơ thể lưỡng bội, tế bào một số mô chuyên biệt trở thành đa bội. Thí dụ, một số tế bào gan người là thể đa bội, nội nhũ của hạt nhiều loại thực vật là thể tam bội.

Nghiên cứu của nhiều tác giả năm 1996 về các ảnh hưởng của liều lượng gen ở dây đa bội (đơn bội, nhị bội, tam bội và tứ bội) của bắp lên sự biểu hiện của 18 gen cho thấy mức phiên mã mRNA tỉ lệ thuận đối với liều lượng của các gen cấu trúc.

4. Sự phân li của thể tứ bội và tứ tam bội

Các thể tứ bội (autotetraploid) và thể tứ tam bội (autotriploid) do có số nhiễm sắc thể nhiều hơn nên sự phân li của chúng phức tạp hơn rất nhiều so với các dạng lưỡng bội. Ta xét sự phân li của thể tứ bội AAAa trong trường hợp đơn giản nhất đối với một gen có hai allele A và a. Hai allele A và a có thể tạo năm tổ hợp AAAA (4 trội), AAAa (3 trội), AAaa (2 trội), Aaaa (1 trội) và aaaa (không có trội). Nếu A trội hoàn toàn thì allele lặn chỉ biểu hiện ở dạng aaaa.

Khi locus A ở gần tâm động, khả năng trao đổi chéo ít xảy ra thì các giao tử được hình thành theo tất cả các cách ghép bốn nhiễm sắc thể thành từng đôi. Bốn allele được kí hiệu tương ứng A_1 , A_2 , a_1 và a_2 .

Nếu không có trao đổi chéo xảy ra, sự phân li ngẫu nhiên của các nhiễm sắc thể sẽ tạo ra các tổ hợp giao tử như sau :

	A_1	A_2	a_1	a_2
A_1	—	$A_1 A_2$	$A_1 a_1$	$A_1 a_2$
A_2		—	$A_2 a_1$	$A_2 a_2$
a_1			—	$a_1 a_2$
a_2				—

Bởi vì các chromatid chị em tách nhau ở giảm phân II, đường chéo ở bảng trên chỉ khả năng không cùng đứng chung của chúng trong giao tử. Bảng đối xứng nên tỉ lệ phân li của các giao tử lưỡng bội là $1 AA : 4 Aa : 1 aa = 1/6 AA : 2/3 Aa : 1/6 aa$. Từ các tổ hợp giao tử này có thể dự kiến các kiểu gen khác nhau được tạo ra :

	1/6 AA	2/3 Aa	1/6 aa
1/6 AA	1/36 AAAA	2/18 AAAa	1/36 AAaa
2/3 Aa	2/18 AAAa	4/9 AAaa	2/18 Aaaa
1/6 aa	1/36 AAaa	2/18 Aaaa	1/36 aaaa

Tỉ lệ kiểu gen ở các con lai: 1/36 AAAA (phức bốn - quadruplex): 8/36 AAAa (phức ba - triplex) : 18/36 AAaa (phức đôi - duplex): 8/36 Aaaa (đơn phức - simplex): 1/36 aaaa (vô phức - nulliplex).

Nếu allele A có biểu hiện trội hoàn toàn thì tỉ lệ kiểu hình sẽ là 35 trội: 1 lặn.

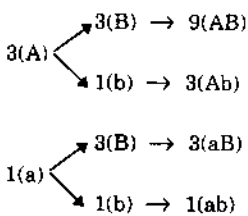
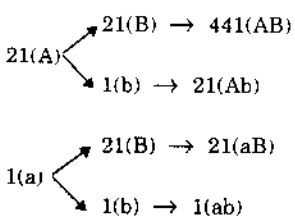
Ở dạng lưỡng bội Aa, thế hệ F_2 của tự thụ phấn sẽ tạo 1/4 kiểu hình lặn. Như vậy, ở cây tự tứ bội AAAa, sự biểu hiện kiểu hình lặn giảm từ 1/4 xuống 1/36, gấp 9 lần so với dạng lưỡng bội. Khi kiểu gen đồng hợp tử tạo các kiểu hình bất lợi hơn dị hợp tử, thì đa bội thể có thể tác động làm giảm đáng kể các biểu hiện xấu của đồng hợp tử lặn.

Trường hợp gen nằm xa tâm động, trao đổi chéo có thể xảy ra thì sự phân li phức tạp hơn.

Đối với các thể tự tam bội thì khi hình thành giao tử, các nhiễm sắc thể tương đồng tiếp hợp nhau tạo các bộ ba (tam trị - trivalent) hoặc 1 bộ hai (lưỡng trị - bivalent) và một bộ đơn (univalent) và phân chia về các cực một cách ngẫu nhiên cho nên nhân tế bào con nhận từ n cho đến 2n nhiễm sắc thể với các tổ hợp rất khác nhau. Do vậy, đa số các giao tử có bộ nhiễm sắc thể không cân bằng dẫn đến mất sức sống. Nếu các dạng đa bội nói chung có **độ bất thụ lớn** hơn dạng lưỡng bội, thì dạng tam bội biểu hiện độ bất thụ cao hơn hẳn, thường là hạt lép. Dưa hấu tam bội (3n) không hạt là một ví dụ rất rõ.

Đối với thể tự tứ bội, nếu lai với 2 gen thì tỉ lệ càng phức tạp hơn.

BẢNG 9.1. So sánh sự phân li của F_2 lưỡng bội và tứ bội
(không có trao đổi chéo) khi lai với 2 cặp gen

Đa bội lệch	Lưỡng bội	Tự tứ bội
Kiểu gen P	P AAbb × aabb	P AAAA BBBB × aaaabbbb
Kiểu gen F_1	F_1 AaBb	F_1 AAaBBbb
Kiểu gen F_2		

Tỉ lệ kiểu hình ở tự tứ bội khi dị hợp tử 2 gen là :

$$441(AB) : 21(Ab) : 21(aB) : 1(ab).$$

5. Đa bội thể nhân tạo

Đa bội thể có thể gây bằng các phương pháp nhân tạo ở một số thực vật. Các nhân tố ảnh hưởng đến sự hình thành thoi vô sắc và sự phân chia nhân trong phân bào, nói chung, đều có thể gây tạo các thể đa bội. Lúc đầu đã có thử nghiệm sử dụng nhiệt độ và gây chấn thương. Tuy nhiên, phương pháp thông dụng nhất hiện nay là xử lí bằng alkaloid **colchicine**. Có thể xử lí colchicine gây đa bội thể nhân tạo bằng nhiều cách như :

- Ngâm hạt vào dung dịch colchicine.
- Chấm dung dịch colchicine lên mầm.

Khi xử lí như thế, nhân đơn bội có thể chuyển thành nhân lưỡng bội, lưỡng bội thành tứ bội.

Một số chất khác như acenaphthene, indolacetic acid cũng được sử dụng gây đa bội thể nhưng hiệu quả không rõ như colchicine.

6. Đa bội thể ở động vật

Ở động vật biệt tính, đực cái thuộc các cơ thể riêng, nhất là khi có giới tính đồng và dị giao tử, rất ít khi gặp hiện tượng đa bội nguyên. Ở động vật lưỡng tính có cả cơ quan sinh dục đực và cái, hoặc sinh sản theo lối trực sinh, thì hiện tượng đa bội nguyên có thể xảy ra như ở thực vật.

Dây đa bội ở động vật chưa được xác minh chắc chắn lắm. Ở một số loài động vật như côn trùng, lưỡng cư và thú có cả hai thể lưỡng bội ($2n$) và tứ bội ($4n$). Ví dụ, chuột đồng xám (*Cricetulus griseus*) và chuột đồng thường (*C. cricetus*) đều lưỡng bội $2n = 22$, chuột đồng vàng (*Mesocricetus curatus*) tứ bội $2n = 44$. Nói chung đa bội nguyên ít gặp ở động vật.

IV. ĐA BỘI THỂ LỆCH

Sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể có thể chỉ liên quan đến một cặp hoặc một số cặp nhiễm sắc thể được gọi là **đa bội thể lệch** hay **lệch bội lẻ** hoặc **đa nhiễm** (aneuploidy).

1. Các dạng đa bội thể lệch

a) **Thể đơn nhiễm hay thể một (Monosomic)** : Trong cách gọi tiếng Anh để chỉ các thể đa bội lệch, đuôi chữ có thêm "somic". Các sinh vật lưỡng bội có thể bị mất một nhiễm sắc thể của một cặp, thì gọi là đơn nhiễm, công thức bộ gen là $2n - 1$. Một nhiễm sắc thể đơn độc không có cái tương đồng để

tiếp hợp trong giảm phân I nên có thể di chuyển về bất kì cực nào của tế bào, nhưng thường bị mất và không nằm ở nhân nào của tế bào con. Thể đơn nhiễm có thể tạo hai loại giao tử : (n) và $(n - 1)$.

Ở thực vật, sự mất một nhiễm sắc thể $(2n - 1)$ có thể vẫn sống với một số biến dạng. Ở động vật, sự mất nguyên một nhiễm sắc thể làm mất cân bằng di truyền nên thường bị chết hoặc bất thụ.

b) Thể tam nhiễm hay thể ba (Trisomic) : Thể lưỡng bội nếu có dư một nhiễm sắc thể ở một cặp được gọi là tam nhiễm, có công thức bộ gen là $2n + 1$. Trong giảm phân I, nhiễm sắc thể dư có thể tiếp hợp với hai cái kia thành bộ ba (tam trị - trivalent). Nếu hai nhiễm sắc thể về một cực, cái lẻ về cực kia sẽ tạo hai loại giao tử : $(n+1)$ và (n) tương ứng. Tam nhiễm có thể tạo các kiểu hình khác nhau, phụ thuộc vào nhiễm sắc thể nào có 3 cái. Ở người tam nhiễm ở nhiễm sắc thể 21 gây hội chứng Down, còn gọi là "bệnh Mông cổ".

c) Thể tứ nhiễm hay thể bốn (Tetrasomic) : Khi một cặp nhiễm sắc thể của sinh vật lưỡng bội có thêm hai nhiễm sắc thể thì gọi là tứ nhiễm, công thức bộ gen là $2n + 2$. Trong giảm phân I, 4 nhiễm sắc thể tiếp hợp tạo thành bộ bốn hay tứ tử (quadivalent) và có sự phân li về các cực tương tự thể tứ bội.

d) Thể tam nhiễm kép (Double trisomic) : Thể này có được khi tam nhiễm ở hai cặp nhiễm sắc thể khác nhau, công thức bộ gen được kí hiệu : $2n + 1 + 1$.

e) Thể vô nhiễm hay thể không (Nullisomic) : Sinh vật lưỡng bội mất cả hai nhiễm sắc thể của một cặp thì gọi là thể vô nhiễm, công thức bộ gen là $2n - 2$. Vô nhiễm thường có hiệu quả gây chết. Một số đa bội thể thực vật, có thể sống khi mất một cặp nhiễm sắc thể. Dạng lúa mì (triticum) lục bội mất một cặp nhiễm sắc thể $(6n-2)$ vẫn sống được đến tạo hạt nhờ sự bù đắp của các nhiễm sắc thể còn lại trong bộ gen.

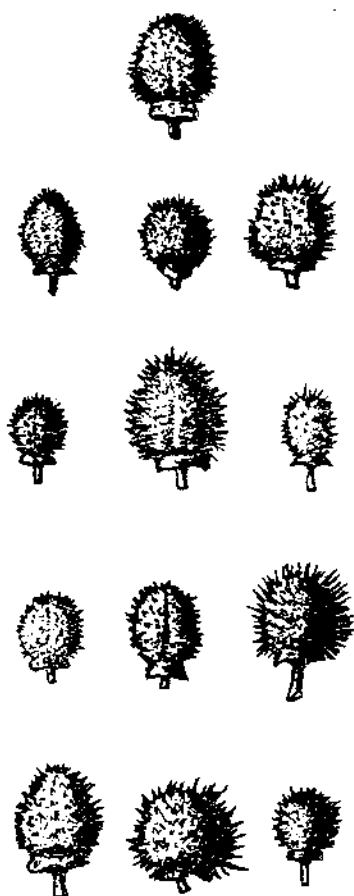
2. Một số thể đa bội lệch ở thực vật

Một số ví dụ điển hình về đa bội lệch được ghi nhận ở một số thực vật.

a) Các thể tam nhiễm (Trisomic) ở *Datura stramonium*.

Ở cây *Datura stramonium* có $2n = 24$ thuộc cùng chi với cà độc dược, đã phát hiện được các đột biến tam nhiễm có 25 nhiễm sắc thể tuần tự ở tất cả 12 cặp nhiễm sắc thể (hình 9.20).

Các thể tam nhiễm khác với cây hoang dại ở nhiều điểm, rõ rệt nhất là dạng quả và gai quả, dĩ nhiên liên quan đến nhiễm sắc thể nào dư thừa. Nghiên cứu tất cả 12 loại tam nhiễm khác nhau, có thể xác định được nhóm liên kết gen liên quan cụ thể với nhiễm sắc thể nào.



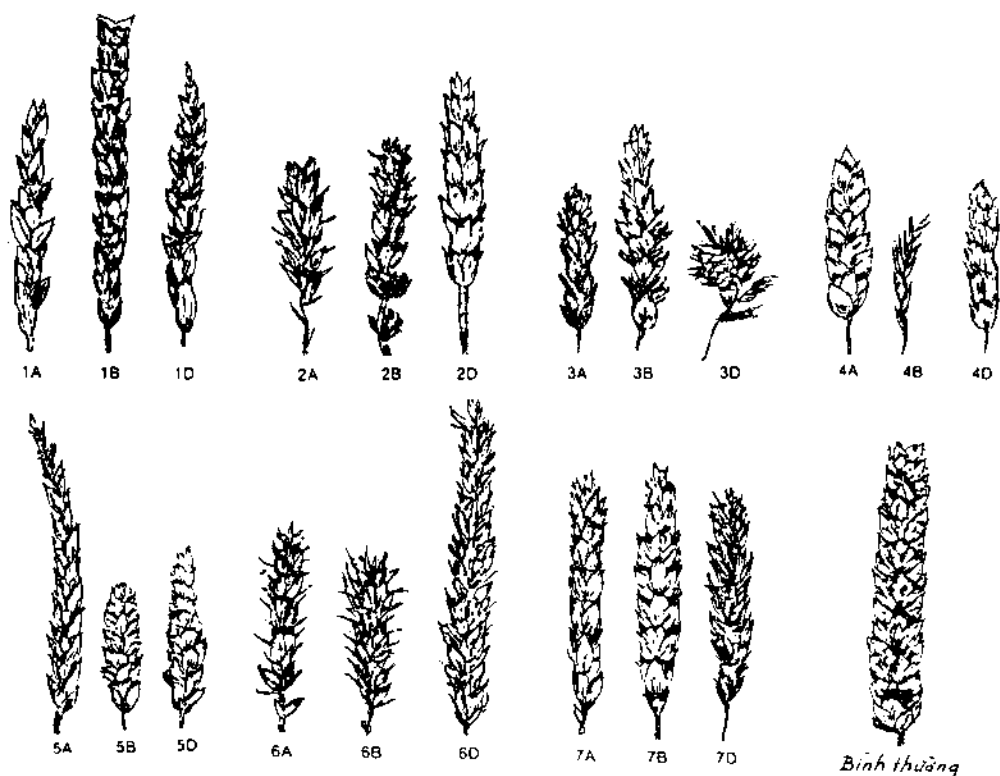
Hình 9.20. Quả *Datura* bình thường và các thể tam nhiễm khác nhau. Trên cùng là quả cây lưỡng bội bình thường. 12 quả còn lại là quả của các cây tam nhiễm tuần tự với mỗi một trong 12 đôi nhiễm sắc thể.

b) Các thể vô nhiễm (Nullisomic) ở lúa mì.

Lúa mì (*Triticum vulgare*) có $6n = 42$. Mặc dù vô nhiễm thường gây chết, nhưng nhờ ở dạng đa bội thể nên ở cây lúa mì đã nhận được tất cả 21 loại vô nhiễm của 21 cặp nhiễm sắc thể (hình 9.21). Tất cả các thể vô nhiễm đều phát triển yếu hơn lúa mì bình thường.

Sự nghiên cứu các dạng vô nhiễm giúp hiểu rõ các nhóm liên kết gen và vai trò của từng cặp nhiễm sắc thể. Bộ các cây vô nhiễm ở lúa mì được sử dụng trong chọn giống, giúp đưa các nhiễm sắc thể theo ý muốn vào cây lai.

Ngoài ra ở ruồi giấm, nhiều dạng đa bội lệch được phát hiện ở nhiễm sắc thể X và được sử dụng rộng rãi trong các thí nghiệm di truyền.



Hình 9.21. Các thể vô nhiễm ở lúa mì
(21 dạng vô nhiễm ở lúa mì với các kí hiệu tương ứng)

3. Các thể đa bội lệch ở người

Ở người, nhiều hội chứng di truyền do các thể đa bội lệch làm thay đổi số lượng cặp nhiễm sắc thể giới tính đưa đến các dạng : hội chứng Turner (XO), hội chứng Klinefelter (XXY), siêu nữ (XXX - superfemale), siêu nam (XYY) và YO không sống.

– **Hội chứng Turner** do Henry Turner mô tả đầu tiên ở người nữ mất một nhiễm sắc thể X (XO) có công thức $2n-1 = 45$. Hội chứng có nhiều biểu hiện đặc trưng như : lùn (chiều cao < 1,5 m), cơ quan sinh dục kém phát triển (không dậy thì), kém thông minh...

– **Hội chứng Klinefelter** do Henry Klinefelter mô tả ở những người nam dư một nhiễm sắc thể X (XXY), công thức bộ gene $2n+1 = 47$. Hội chứng có những biểu hiện đặc trưng : bất thụ, ngón tay chân dài, phát triển ngực có tính nữ và suy giảm trí tuệ.

– Người siêu nữ XXX do dư một nhiễm sắc thể X, với bộ gen $2n + 1 = 47$, thoái hóa, suy giảm trí tuệ.

– Người siêu nam có XYY, người nam bình thường, nhưng có thể gọi là *siêu nam* vì tính tình mạnh bạo hơn người thường. Năm 1965, khi nghiên cứu trong số người phạm tội, những người XYY chiếm tới 3,5%, nên có lúc Y được gọi là “nhiễm sắc thể tội lỗi” (criminal chromosome). Thực tế những người này do mạnh bạo hơn bình thường nên dễ phạm tội. Các nghiên cứu gần đây phủ định các kết quả nêu trên.

– Hội chứng Down do Langdon Down phát hiện, thường là tam nhiễm ở cặp nhiễm sắc thể 21 của người. Tỷ lệ xuất hiện khoảng 1/600 ở trẻ sơ sinh. Người bệnh có một số biểu hiện đặc trưng như : thoái hoá trí tuệ, mắt giống mắt người Mông Cổ. Có mối liên hệ thuận giữa số trẻ sinh ra mắc bệnh Down và tuổi của các bà mẹ. Tỷ lệ đó là 1/500 ở các bà mẹ 20-30 tuổi, 1/300 ở các bà mẹ 40-45 tuổi và 1/60 ở các bà mẹ cao hơn 45 tuổi. Tuổi cha không ảnh hưởng.

Ở người, các đơn nhiễm ít thấy hơn, có lẽ do mang nhiều gen lặn nguy hiểm, nên ở trạng thái bán hợp tử khó sống.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các nhiễm sắc thể có thể bị nhiều biến đổi khác nhau dẫn đến kiểu hình đột biến. Sự biến đổi trên một nhiễm sắc thể có thể do *mất đoạn, lặp đoạn* và *đảo đoạn*. Giữa các nhiễm sắc thể có thể xảy ra *chuyển đoạn, tạo nhiễm sắc thể dêu* hay *chuyển đoạn Robertson*. Nhiều biến đổi này có các hậu quả di truyền khác nhau và thường có thể quan sát thấy ở giảm phân I. Số lượng nhiễm sắc thể có thể thay đổi nguyên lần (*đa bội thể nguyên*), có thể do lai (*dị bội thể*) và thay đổi ở từng cặp như ở *đa bội lệch*. Các biến đổi nhiễm sắc thể ở người gây nên nhiều hội chứng bệnh khác nhau. Các biến đổi cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể có ý nghĩa lớn đối với sự tiến hóa của sinh giới và được sử dụng trong chọn giống.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Mất đoạn và lặp đoạn có biểu hiện gì đặc trưng trong giảm phân I?
2. Vì sao nói đảo đoạn ức chế tái tổ hợp?
3. Đột biến nhiễm sắc thể nào có thể làm 50% giao tử chết?

4. Vì sao tính hữu thụ tăng vọt khi nhân đôi số nhiễm sắc thể của các thể lai giữa các loài ?
5. Giải thích sự hiện diện các đơn trị trong giảm phân ở các dạng lai.
6. Bằng cách nào sử dụng các tam nhiễm để xác định nhóm liên kết gen ?
7. Bằng cách nào sử dụng các vô nhiễm ở lúa mì để đưa nhiễm sắc thể tùy ý vào một dạng lai ?
8. Sự phân li kiểu hình của tam nhiễm sau khi tự thụ phấn sẽ như thế nào?
9. Khi lai thể tam nhiễm với dạng lưỡng bội, sự phân li kiểu hình là 11A : 1a. Kiểu gen của cây cha mẹ như thế nào ?
10. Trình bày ví dụ minh họa hiệu quả vị trí ở *Drosophila*.

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

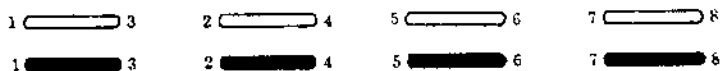
1. Biết một sinh vật lưỡng bội có $n = 4$. Các đầu mút của nhiễm sắc thể của dòng chuẩn (standard) được đánh dấu 1-2, 3-4, 5-6, 7-8,... Nếu lai dòng chuẩn với dòng A thì nhận được ở kì trước I trong giảm phân một vòng tròn 4 nhiễm sắc thể, các cái khác bắt cặp 2 với 2. Nếu lai cùng dòng chuẩn với dòng B, sẽ nhận hình tương tự trong các điều kiện tương tự. Giải thích vì sao lai dòng A với dòng B cho phép quan sát:

- a) Chỉ có duy nhất các nhiễm sắc thể bắt cặp 2 với 2 (lưỡng trị bivalent).
- b) Một vòng 4 nhiễm sắc thể và 2 lưỡng trị (bivalent).
- c) Hai vòng của 4 nhiễm sắc thể.
- d) Một vòng 6 nhiễm sắc thể và một lưỡng trị (hai cái nằm kế nhau).

Bài giải

Một vòng tròn 4 nhiễm sắc thể chứng tỏ một chuyển đoạn tương ứng giữa hai nhiễm sắc thể không tương đồng. Ví dụ : 1-3, 2-4, 5-6, 7-8. Dòng B cũng có một chuyển đoạn tương ứng (reciproque), nhưng không xác định có xảy ra trên cùng các nhiễm sắc thể như dòng A không. Lai A x B sẽ cho phép giải quyết vấn đề này.

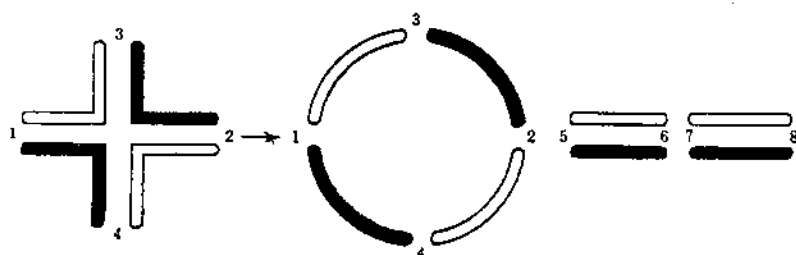
a) Nếu các nhiễm sắc thể bắt cặp từng đôi có nghĩa sự tương đồng là hoàn toàn : nói cách khác, hai dòng A và B mang cùng một chuyển đoạn.



b) Nếu nó tạo ra một vòng 4 nhiễm sắc thể có nghĩa là cả hai nhiễm sắc thể có chuyển đoạn đều cùng loại nhưng chuyển đoạn của B không xảy ra trên cùng các đầu mút.

A: 1-3, 2-4, 5-6, 7-8

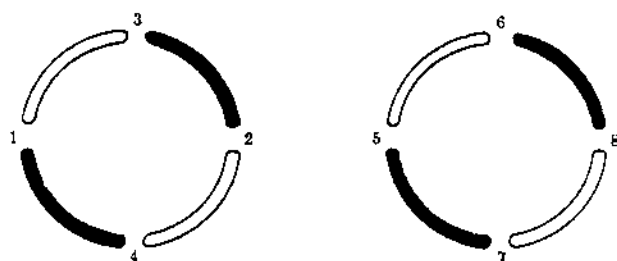
B: 1-4, 2-3, 5-6, 7-8



c) Hai vòng tròn 4 nhiễm sắc thể chứng tỏ chuyển đoạn ở B xảy ra trên cặp nhiễm sắc thể khác không tương đồng.

A: 1-3, 2-4, 5-6, 7-8

B: 1-4, 2-3, 5-7, 6-8



Ghi chú : Một hình khác rõ ràng trùng hợp với B : 1 - 4 , 2 - 3 , 5 - 7 , 6 - 8. Nó sẽ cho hai vòng tròn (1-3-2-4) và (5-6-8-7), nhưng không thể được vì lại (dòng chuẩn x dòng B) cũng sẽ cho hai vòng tròn 4 nhiễm sắc thể (1-4-3-2; 5-6-8-7), điều này ngược với giả thuyết.

d) Một vòng 6 nhiễm sắc thể cho thấy 3 nhiễm sắc thể không tương đồng tham gia chuyển đoạn ở A và B; nói cách khác, các chuyển đoạn trên hai dòng xảy ra trên cùng một nhiễm sắc thể và hai nhiễm sắc thể khác nhau (ví dụ : một phần tương đồng của 3-4 của dòng chuẩn, của A và B, phần khác 1-2 đối với A và 5-6 đối với B).

A : 1-3 , 2-4 , 5-6 , 7-8.

B : 1-2 , 3-5 , 4-6 , 7-8.

2. Ở bắp, tâm động của nhiễm sắc thể V cách đầu mút khoảng 7 đơn vị di truyền. Ở 10 đơn vị tính từ đầu mút đó có một gen lặn đột biến *v* (*virescent*) làm các cây non có màu vàng sáng. Ở 12 đơn vị từ đầu mút có allele lặn *bv* ("*brevit*") xác định núm ngắn của trái. Điểm gãy T của một chuyển đoạn (*translocation*) nằm cách đầu mút nói trên 20 đơn vị. Gọi T và t tương ứng với sự có mặt và vắng mặt chuyển đoạn. Một cây dị hợp tử đối với chuyển đoạn giữa các nhiễm sắc thể V và VIII có kiểu gen $+bv/tv+T$ được thụ phấn bởi một cây bình thường có kiểu gen $vb/tvbt$. Giả sử rằng các giao tử được hình thành do sự tách về 2 cực của các vòng tròn từ các nhiễm sắc thể mang chuyển đoạn dị hợp tử. Phân tích tổ hợp lai (coi như các ca trao đổi chéo không đáng kể).

Bài giải

Trước hết xét hậu quả tế bào học của trao đổi chéo xảy ra giữa T và tâm động của nhiễm sắc thể V. Chúng ta gọi 1 và 2 là các đầu mút của nhiễm sắc thể V và 3-4 của VIII. Ở giảm phân khi tiếp hợp sẽ có hình chữ thập và sau đó khi các nhiễm sắc thể đẩy nhau sẽ tạo hình số 8.

Sự phân li các nhiễm sắc thể về hai hướng ngược nhau chỉ tạo ra 50% giao tử có hoạt tính, số còn lại không có hoạt tính vì có nhiễm sắc thể dư có cái lại thiếu (như thiếu 2). Một điều rất quan trọng là những giao tử bất hoạt là những cái chứa các chromatid tái tổ hợp, như vậy, sự nhận được tái tổ hợp giữa T và tâm động bị loại trừ. Đoạn tâm động -T được di truyền như một đơn vị không tái tổ hợp. Từ đó, sẽ nhận được các giao tử cha mẹ $+bv$ và $v+T$ với tỉ lệ như nhau. Các cây con sẽ là: $1/2 +bv/vbvt$ đồng hợp tử không có chuyển đoạn, và $1/2 v+T/vbvt$ vàng, dị hợp tử chuyển đoạn.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Hai locus trên gen A và B ở những nhiễm sắc thể khác nhau. Một cây tứ bội thể thuần có kiểu gen $AAaa BBbb$ tự thụ phấn. Nếu giả sử rằng chúng chỉ tạo các giao tử lưỡng bội, A và B kết tâm động với nhau, các kiểu hình thu được ở hậu thế như thế nào và với tỉ lệ bao nhiêu?

2. Có 13 cặp nhiễm sắc thể ở loài bông vải Châu Á (*Gossypium arboreum*) và 13 cặp trong loài Châu Mỹ (*G. thurberi*). Tổ hợp lai giữa hai loài tạo ra các con lai bất thụ do các nhiễm sắc thể bất cặp không bình thường trong giảm phân. Cây bông trồng ở Mỹ *G. hirsutum* có 26 cặp nhiễm sắc thể. Lai $G. arboreum \times G. hirsutum$ cũng như lai $G. thurberi \times G. hirsutum$ tạo các tam bội thể mà ở đầu giảm phân thấy có 13 cặp nhiễm sắc thể và 13 cái đơn độc. Có thể sử dụng số liệu này giải thích sự tiến hóa của *G. hirsutum* không?

3. Ở một thực vật W^n tạo hạt vàng ; allele lặn w tạo hạt trắng. Các cây tam nhiễm (trisomic) đối với nhiễm sắc thể có locus của gen màu sản sinh ra các giao tử cái có hoạt tính n và $n+1$, nhưng chỉ những hạt phấn n mới sống (có hoạt tính). Tính tỉ lệ các kiểu hình quan sát được ở tổ hợp lai sau :

	P		P
a)	$++w$	$\times$	$++w$
b)	$+ww$	$\times$	$++w$
c)	$++w$	$\times$	$+w$
d)	$+ww$	$\times$	$+W$

4. Ở người có các bệnh : hội chứng Turner, người nữ có nhiễm sắc thể XO; hội chứng Klinefelter XXY ; bệnh mù màu do c lặn trên X.

a) Một người đàn ông và một người đàn bà, cả hai có thị giác bình thường có một con gái mù màu và bệnh Turner. Vẽ sơ đồ phả hệ.

b) Trong một gia đình khác, mẹ mù màu, cha thị giác bình thường. Họ có con trai bệnh Klinefelter và thị giác bình thường. Vẽ sơ đồ phả hệ.

c) Nếu trẻ con có cha cũng mù màu thì nó nhận được giao tử nào?

d) Ở người $2n = 46$, các người bị bệnh Mông Cổ đều tam nhiễm 21. Người ta biết ít nhất 1 trường hợp Klinefelter - Mông Cổ. Các cá thể trên có bao nhiêu nhiễm sắc thể ?

5. Trên nhiễm sắc thể V của cà chua , người ta tạo ra quả mà chóp có một núm ("nipple shaped tip"). Một cây dị hợp tử (Nt/nt) cũng dị hợp tử bởi một chuyển đoạn tương ứng giữa nhiễm sắc thể V và VIII. Cây này khi lai phân tích cho các con lai như sau : 48 quả bình thường và hữu thụ, 19 quả có chóp núm và hữu thụ, 11 quả bình thường và bất thụ một phần và 37 quả có chóp núm bất thụ một phần. Xác định locus của gen so với điểm chuyển đoạn.

6. Một trao đổi chéo đôi liên quan đến 4 chromatid xảy ra trên một đảo đoạn dị hợp tử. Trình tự bình thường của nhiễm sắc thể : (.12345678).(.) chỉ tâm động và trình tự đảo đoạn là(.12745638). Một trao đổi chéo giữa 1 và 2, cái kia giữa 5 và 6. Trình bày hiện tượng và kết quả ở kì sau I của giảm phân.

7. Có một đảo đoạn dị hợp tử (.abcdefg)/(.abfedcgh). Một trao đổi chéo đôi liên quan đến 3 chromatid xảy ra ở vùng $a-b$ và $d-e$. Trình bày kì sau của giảm phân.

8. Ở các sinh vật bậc cao, các đứt đoạn dù ngắn nói chung gây chết ở trạng thái đồng hợp tử. Ở chuột allele lặn w làm đi như nhảy valse ("walting"). Con đực "walting" giao phối với nhiều con cái đồng hợp tử bình thường. Một con "walting" trong số nhiều trăm con đó là chuột cái. Người ta giả sử rằng nhiễm sắc thể mang W^+ bị thiếu đoạn dẫn đến w giả trội. Chuột cái này được lai với chuột đực đồng hợp tử W^+ và tất cả chuột con đều hoang dại.

a) Dự kiến 2 kiểu gen có thể đối với các chuột con của tổ hợp lai cuối cùng.

b) Giả sử 2 con đực, mỗi con có một trong 2 kiểu gen dự kiến trên, đem lai ngược với chuột cái giả trội. Lứa đẻ có 12 con, tính số chuột bình thường và "walting" có thể có được (mất đoạn ở đồng hợp tử coi như có hiệu quả gây chết).

9. Ở ruồi giấm mắt đỏ gạch *vermilion* là một dấu hiệu liên kết với giới tính là lặn, còn mắt thoi *Bar* liên kết với giới tính là trội. Một ruồi cái có nhiễm sắc thể X dính nhau có mắt *vermilion* với công thức XXY , được lai với ruồi đực *Bar*.

a) Các kiểu hình có được ở F_1 và tỉ lệ của chúng ?

b) Phần nào của F_1 bị gây chết ?

c) Nếu $F_2 = F_1 \times F_1$ thì có thể quan sát được gì ở F_2 ?

(Ghi chú : ở ruồi giấm có $1Y$ mà $2XX$ là ruồi cái.)

10. Kiểu bất thường nào ở tinh trùng thụ tinh cho trứng bình thường tạo ra hợp tử XXY ? Quá trình nào có thể dẫn đến giao tử bất thường này ?

11. Người ta giả sử rằng một chuyển đoạn không tương ứng (một chiều) tác động đến vai nhỏ của nhiễm sắc thể số 5 của người, đoạn này được chuyển đến đầu vai dài của nhiễm sắc thể số 13 trong bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội. Sự chuyển nhượng này được coi là cân bằng vì bộ gen vẫn giữ nguyên : kiểu hình bình thường. Ngược lại, nếu sự chuyển đoạn này chỉ 1 cái ở cặp tương đồng, nó gây hiệu quả "cri du chat" (tiếng kêu của mèo) ; nếu có 3 cái làm đứa bé chết sớm. Nếu một người có chuyển đoạn có con với người có kiểu gen bình thường, sẽ có các đặc tính gì về :

a) kiểu gen ;

b) kiểu hình ở thế hệ con.

12. Khoảng 2% những người bị bệnh Down có 46 nhiễm sắc thể như bình thường. Nhiễm sắc thể bổ sung 21 bị chuyển đoạn 1 chiều đến một

80%
104.80N

niễm sắc thể thường khác trong nhóm G hay D. Những người như vậy được gọi là mắc bệnh Down do chuyển đoạn; tình trạng này cũng được di truyền nên còn được gọi là bệnh Down gia đình.

a) Một trong hai cha mẹ có kiểu hình bình thường với chỉ 45 nhiễm sắc thể ; trên thực tế, vai ngắn của nhiễm sắc thể nhóm D (số 14 hay 15) bị gãy ở tâm động, tương tự như vậy vai dài của 1 nhiễm sắc thể số 21 bị gãy ngay trước tâm động của nó và đoạn gãy này gắn vô tâm động và vai dài của nhiễm sắc thể trước. Các vai ngắn của cả hai nhiễm sắc thể (chúng không mang các gen quan trọng) sẽ bị mất trong các lần phân bào tiếp theo. Nếu các giao tử của một cha hoặc mẹ mang chuyển đoạn kết hợp với các giao tử của cá thể lưỡng bội bình thường thì có thể dự kiến được gì ở bộ nhiễm sắc thể (nhân đồ) và ở kiểu hình của thế hệ con ?

b) Ở một dòng cha mẹ, chuyển đoạn xảy ra giữa nhiễm sắc thể số 21 và 22 (các tâm động tương đồng di chuyển về hai cực đối diện). Dòng cha mẹ khác là một thể lưỡng bội bình thường. Xác định bộ nhiễm sắc thể (nhân đồ) và kiểu hình ở thế hệ con.

c) Phân tích tương tự như câu hỏi trước đây nếu tâm động của nhiễm sắc thể chuyển đoạn 21/22 là của nhiễm sắc thể số 21.

d) Ở 1 trong 2 cha mẹ, chuyển đoạn nằm trên cả 2 nhiễm sắc thể 21, cha mẹ khác là lưỡng bội bình thường . Bộ nhiễm sắc thể và kiểu hình ở thế hệ con sẽ như thế nào ?

e) Trong số thế hệ con sinh ra trong trường hợp (c) và (d) trên đây, khả năng xuất hiện 1 đứa con bệnh Down như thế nào ?

CÁC CƠ CHẾ SỬA SAI VÀ BẢO VỆ DNA

Trên phân tử DNA có thể xảy ra nhiều biến đổi do sai hỏng trao đổi chất, do các tác nhân gây đột biến vật lý và hóa học của môi trường. Tuy nhiên, bộ gen luôn có độ ổn định rất cao nhờ các *cơ chế sửa sai* và *bảo vệ DNA*. DNA là phân tử duy nhất, mà khi bị biến đổi hay bị phá hỏng vẫn có khả năng được sửa chữa do tế bào. Các cơ chế sửa sai rất *đa dạng* và có *hiệu quả cao*. Ba quá trình sửa sai, sao chép và tái tổ hợp DNA liên quan chặt chẽ với nhau. Đây cũng là một ví dụ về sự phối hợp chặt chẽ với nhau giữa nhiều cơ chế di truyền.

I. KHÁI QUÁT VỀ CÁC CƠ CHẾ SỬA SAI

Phân tử DNA là đối tượng chịu tác động của các gốc tự do của phản ứng ion hóa do hóa chất hoặc các chất alkyl hóa do quá trình trao đổi chất tạo ra. Các sai hỏng có thể xảy ra trong quá trình sao chép DNA (sửa sai trong sao chép đã được nêu ở chương V) và các quá trình trao đổi chất khác. Các sai hỏng này có thể được cắt bỏ và hồi phục nhờ cơ chế sửa sai.

1. Các biến đổi có thể xảy ra trên phân tử DNA

Ngoài những biến đổi đột biến như đã nêu ở chương VIII, căn cứ vào thành phần hóa học và cấu trúc phân tử, trên DNA có thể xảy ra các biến đổi ngẫu nhiên như sau :

– **Gãy hay đứt mạch** : Chiều ngang phân tử DNA mỏng manh, bản thân nó lại cuộn xoắn, mở ra thường xuyên nên việc đứt gãy một mạch dễ xảy ra. Khả năng bị đứt cùng lúc 2 mạch hiếm hơn.

– **Nitrogenous base bị cắt mất** làm cho base tương ứng không có cặp. Dưới tác dụng của nhiệt có thể xảy ra quá trình làm *mất purine* (depurination) do thủy phân liên kết N-glycosyl.

– **Gắn các nhóm mới vào nitrogenous base** bằng liên kết cộng hóa trị làm thay đổi tính chất như trường hợp methyl hóa tức gắn nhóm methyl ($-CH_3$) vào base.

– **Biến nitrogenous base này thành cái khác** làm bất cặp sai. Ví dụ : Quá trình làm *mất amin* (desamination) của cytosine biến nó thành uracil.

- Các nitrogenous base có thể tồn tại ở hai dạng *ceto* và *enol* nên có thể dẫn đến **bất cặp sai**. Ví dụ : Dạng enol của cytosine có thể bất cặp với adenine.
- Tạo các *dimer thymine*.
- **Nối chéo** giữa các mạch (interstrand crosslink).

Trên đây là các biến đổi ngẫu nhiên, nếu có tác động của các tác nhân gây đột biến các biến đổi sẽ xảy ra nhiều hơn.

2. Khái quát về các cơ chế sửa sai ở mức phân tử

Sự toàn vẹn của phân tử DNA chứa thông tin di truyền có ý nghĩa sống còn đối với tế bào, nhất là tế bào *Prokaryotae*. Ở tế bào vi khuẩn, tính ra có đến 50% không bị biến đổi thậm chí sau khi sao chép đến 100 triệu lần. Sự ổn định rất lớn đó của DNA tế bào có được nhờ hàng loạt các cơ chế bảo tồn sự toàn vẹn và sửa sai lập tức bất kì sai hỏng nào vừa xuất hiện.

Các hệ thống sửa sai rất đa dạng và có hiệu quả rất cao ở *E.coli*. Có khoảng 100 locus tham gia trực tiếp hoặc gián tiếp vào việc bảo vệ DNA và sửa sai. Bảng 10.1 nêu ra một số các gen liên quan đến cơ chế sửa sai.

BẢNG 10.1 : Các gen đại diện và những gen có liên quan đến sửa sai, bảo vệ và tái tổ hợp DNA trên bản đồ liên kết gen của *E.coli* K12

Gen	Vị trí trên bản đồ (phút)	Chức năng hay chú giải
<i>dam</i>	74	Methyl hóa A của DNA (DNA adenine methylation).
<i>dcm</i>	43	Methyl hóa C của DNA (DNA cytosine methylation).
<i>dinF</i>	92	Sai hỏng do UV và mitomycin C.
<i>dna Q</i> (<i>mutD</i>)	5	DNA polymerase III, tiểu phần.
<i>endA</i>	64	DNA endonuclease I đặc hiệu (DNA-specific endonuclease I).
<i>fis</i>	72	Đảo đoạn DNA ở điểm đặc hiệu (site-specific DNA inversion).
<i>fts</i> <i>E,Q,S,X,Y</i>	76	Phân bào.
<i>fts H</i>	69	Phân bào.
<i>fts M,Z</i>	2	Phân bào.
<i>hsd M</i>	99	Biến đổi tế bào chủ (host modification); methylase M của DNA.

<i>hsd R</i>	99	Hạn chế chủ; endonuclease R
<i>hsd S</i>	99	Xác định thể đặc hiệu đối với hoạt tính của hsd M và hsd R (specificity determinant for hsd M and hsd R activities).
<i>lex A (tsl, spr)</i>	92	Gen điều hòa đối với operon SOS (cấp cứu).
<i>lig</i>	52	DNA ligase
<i>lon</i>	10	Protease La phụ thuộc ATP (ATP-dependent protease La).
<i>min B</i>	26	Phân li các tế bào nhỏ không có DNA, locus phức hợp.
<i>mut H (mut R, pru)</i>	61	Sửa bất cặp sai do methyl (methyl - directed mismatch).
<i>mut L (mut-25)</i>	95	Sửa bất cặp sai do methyl (methyl - directed mismatch).
<i>mut M</i>	82	Đảo chuyển G-C → T-A
<i>mut S</i>	59	Sửa bất cặp sai do methyl.
<i>mut T</i>	2	Đảo chuyển T-A → G-C.
<i>mut Y</i>	64	Đảo chuyển G-C → T-A.
<i>phr</i>	16	Photolyase.
<i>polyA</i>	87	DNA-polymerase I.
<i>polyB</i>	2	DNA-polymerase II.
<i>rac</i>	30	Prophage thoái hóa <i>rac</i> (defective).
<i>rec A (lexB, tif, zab)</i>	58	Prophage <i>rac</i> tái tổ hợp chung (general recombination) sửa sai SOS (cấp cứu).
<i>rec B, C, D</i>	61	Các tiểu phần của exonuclease V.
<i>rec E</i>	30	Exonuclease VIII.
<i>rec F (uvrF)</i>	83	Tái tổ hợp chung: sửa sai sau sao chép của sai hỏng do UV.
<i>rec J</i>	62	Tái tổ hợp và sửa sai DNA.
<i>rec N</i>	57	Tái tổ hợp và sửa sai DNA.
<i>rec O</i>	56	Tái tổ hợp trong tiếp hợp và sửa sai DNA.
<i>rec Q</i>	86	Tái tổ hợp trong tiếp hợp và sửa sai DNA.
<i>ruv A, B</i>	41	Tạo sợi (filamentation); nhạy cảm với tia UV.
<i>SbcB (xon A)</i>	44	Exonuclease I (xon A); kìm hãm <i>rec BC</i> .
<i>Sbc C</i>	9	Kìm hãm <i>rec BC</i> .
<i>sfi C</i>	26	Ủ chế phân bào.
<i>ssb (lex C)</i>	92	Single- strand DNA binding protein (protein gắn vào mạch đơn DNA).

<i>sul A (sfi A)</i>	22	Gen ức chế của lon.
<i>umu C,D</i>	26	Sửa sai sao chép úp sấp, gây tạo các đột biến bằng UV.
<i>ung</i>	56	Uracil-DNA glycosylase (cắt uracil trên DNA).
<i>uvr A</i>	92	Sửa sai các sai hỏng do UV trên DNA.
<i>uvr B</i>	18	Cắt bởi nuclease (excision nuclease).
<i>uvr C</i>	42	
<i>uvr D</i> (<i>mut U,</i> <i>rec I, uvr E</i>)	86	DNA helicase II.
<i>xse A</i>	54	Exonuclease VII, tiểu phần lớn.
<i>xse B</i>	10	Exonuclease VII, tiểu phần nhỏ.
<i>xth A</i>	54	Exonuclease III (endonuclease đối với các điểm AP).

Một số kí hiệu thường gặp phía trên :

- *mut* - mutator (gen làm tăng đột biến).
- *rec* - recombination (liên quan đến tái tổ hợp).
- *uvr ABCD* - cắt rời bằng nuclease (nuclease excision).

Bảng trên đây nêu ra không nhằm liệt kê, mà để có khái niệm cụ thể và toàn diện hơn về các cơ chế sửa sai và bảo vệ DNA của tế bào. Chỉ với DNA, tế bào phải đầu tư rất lớn cho sự ổn định của thông tin di truyền. Nếu như sao chép chỉ xảy ra khi phân bào, thì các cơ chế sửa sai phải hoạt động liên tục. Sao chép được thực hiện với cơ chế về cơ bản như nhau ở các loại tế bào và trong mỗi lần nhân đôi DNA. Trong khi đó, sai hỏng xảy ra rất đa dạng, nên các cơ chế sửa sai nhiều hơn và với số lượng gen tham gia lớn hơn. Hơn nữa, các cơ chế di truyền căn bản như sao chép, tái tổ hợp DNA đều có sự tham gia của các cơ chế sửa sai và ngược lại sửa sai cần đến sao chép và tái tổ hợp.

Cần nhớ lại trước đây trường phái Lư-Xen-Kô cho rằng nếu công nhận DNA là vật chất di truyền thì sẽ có **chất bất biến** (do sao chép bán bảo tồn) tồn tại xuyên suốt từ khi sự sống xuất hiện. Các nghiên cứu sửa sai cho thấy phân tử DNA biến đổi từng giây từng phút. Sự **bất biến** của DNA có được là nhờ **"vạn biến"**.

3. Mutator (biến đổi làm tăng tần số đột biến)

Nhờ các cơ chế sửa sai nên bình thường DNA tế bào có độ ổn định rất lớn, thường các thay thế base có tần số 10^{-9} - 10^{-10} . Tuy nhiên đã phát hiện

các dòng đột biến ngẫu nhiên tăng cao hơn hẳn, chúng được gọi là *mutator*. Trong nhiều trường hợp, các kiểu hình *mutator* liên quan đến sai hỏng trong hệ thống sửa sai. Ở *E.coli*, các locus *mutator* *mut H*, *mut L*, *mut U* và *mut S* tác động đến các cấu phần của hệ thống *sửa sai do bất cặp sai* (mismatch repair) sau sao chép nên làm tần số đột biến ngẫu nhiên tăng cao.

Ngoài *mutator*, sự sai hỏng làm tăng tính nhạy cảm với tia UV và tăng sai hỏng khi tái tổ hợp.

II. CÁC KIỂU SỬA SAI

1. Quang tái hoạt hóa nhờ enzyme photolyase

Sau khi xử lý tia tử ngoại gây đột biến, nếu đưa ra ánh sáng thì phần lớn sai hỏng được phục hồi. Hiện tượng này được gọi là *quang phục hồi* hay *quang tái hoạt hóa* (photoreactivation). Năng lượng của ánh sáng nhìn thấy (300 đến 600nm) hoạt hóa enzyme *photolyase* (gen *phr* ở *E.coli*) cắt các vòng cyclobutyl pyrimidine dimer (thường là thymine dimer).

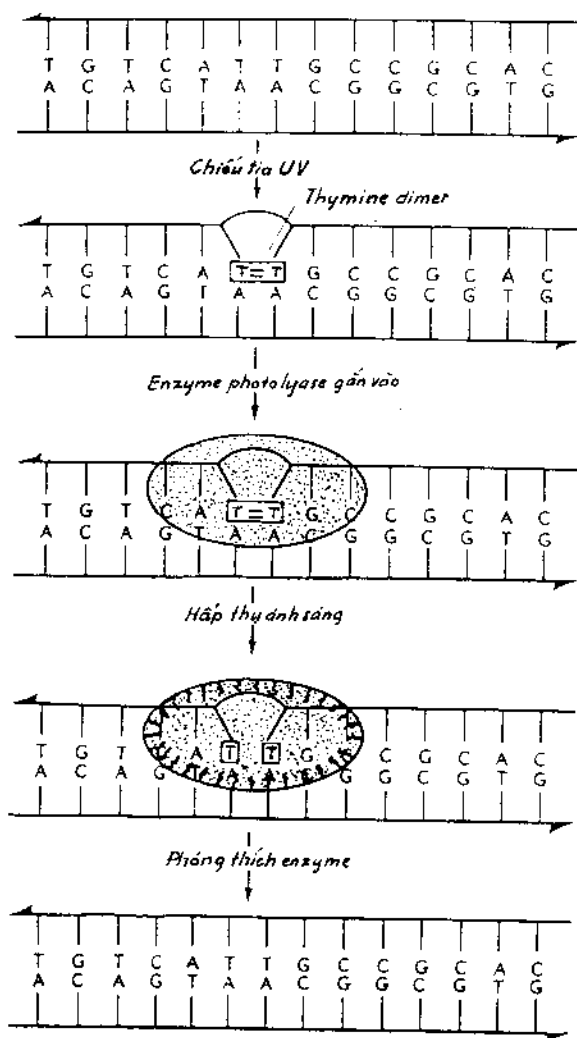
Các enzyme này hoạt động trong các tế bào ở nhiều loài khác nhau từ *mycoplasma*, động vật và cả ở bạch cầu của người; riêng nấm men có 2 enzyme khác nhau. Vào ban ngày, các sinh vật thường chịu tác động của ánh sáng, nên cơ chế quang phục hồi có vai trò quan trọng trong sửa sai DNA. Ví dụ, các *mycoplasma*, sinh vật đơn bào đơn giản nhất hiện nay, chỉ có vài trăm gen, nhưng đã dành 1 trong số đó cho quang tái hoạt hóa.

Quang phục hồi là cơ chế sửa sai ngoài ánh sáng (hình 10.1), khác với sửa sai trong tối.

Trong giai đoạn đầu, enzyme nhận biết và gắn đặc hiệu vào dimer trong tối. Các oligothymidilate là cơ chất rất tốt cho enzyme. Oligo (dT)₁₈ với trung bình là 3,5 dimer được gắn nhẹ với 2 phân tử enzyme. Tất cả các photolyase đều có 2 chromophore (chất bắt màu), là FADH₂ (1,5 - dihydroflavin adenine dinucleotide). Bản chất của chromophore thứ hai chia photolyase thành 2 nhóm :

- Enzyme của nấm men và *E.coli* sử dụng pterin (folate coenzyme).
- Nhóm kia dùng deazaflavin.

Khi chỗ sai hỏng hấp thụ ánh sáng (theo bước sóng đặc hiệu), năng lượng được sử dụng nhờ phức hợp enzyme -DNA ổn định biến *thymine dimer* thành monomer. Sau đó, enzyme tách khỏi DNA.



Hình 10.1. Quang tái hoạt hóa nhờ enzyme đối với thymine dimer.

- DNA nguyên vẹn được chiếu UV.
- Tạo thymine dimer.
- Phức hợp enzyme photolyase - DNA.
- Quang tái hoạt hóa khi hấp thụ ánh sáng.
- Phóng thích enzyme.

2. Sửa sai bằng làm mất nhóm alkyl (Dealkylation)

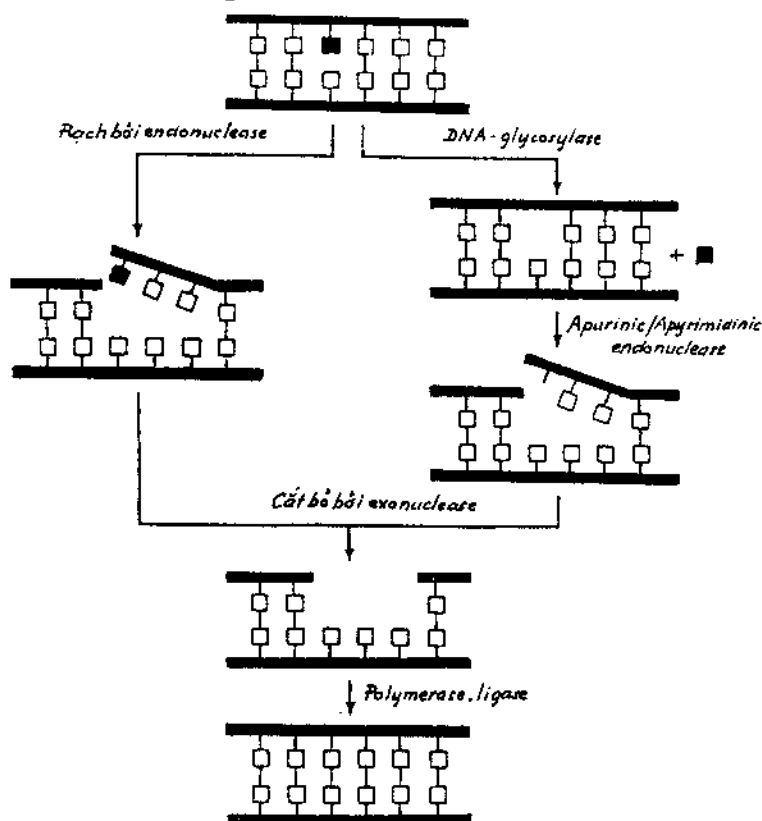
Một ví dụ khác về việc *sửa trực tiếp* các sai hỏng là sự chuyển nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) từ chất có khả năng gây ung thư là O^6 -methylguanine sang gốc cysteine của enzyme O^6 -methylguanine - DNA methyltransferase (MTase).

Enzyme tách nhóm alkyl khỏi phosphodiester bằng alkyl hóa cysteine khác. Khác với protein điển hình, protein thụ thể bất hoạt không thuận nghịch khi alkyl hóa... Các MTase hiện diện ở *E.coli*, nấm men và tế bào người.

Sự tổng hợp MTase của *E.coli* (39-kDa), sản phẩm của gen *ada*, được cảm ứng khi có tác động của tác nhân alkyl hóa như N-methyl-N'-nitrosoguanidine. Protein này, được biến đổi bởi nhóm alkyl tách từ phosphodiester, điều hòa dương các gen tham gia sửa sai do alkyl hóa, gồm cả chính mình. MTase đã được alkyl hóa gắn vào hộp ($A_3N_3A_3GCGCA$) của gen *ada* phía trước của đoạn điều hòa ρ (regulon) các promoter, hoạt hóa phiên mã. Sự đề kháng tăng cao đối với các tác nhân alkyl hóa được thực hiện bằng nâng cao nồng độ protein này trong tế bào.

3. Sửa sai cắt bỏ

Phần lớn các cơ chế sửa sai khác thực hiện trong tối, nhờ các nuclease bằng cắt bỏ chỗ sai hỏng theo nhiều cách :



Hình 10.2. Hai kiểu sửa sai bằng cắt bỏ

Cách bên trái : rạch hở bằng endonuclease

Cách bên phải : AP-endonuclease (Apurinic/Apyrimidinic endonuclease).

Sau cùng DNA polymerase I và ligase chếp đầy lỗ hổng.

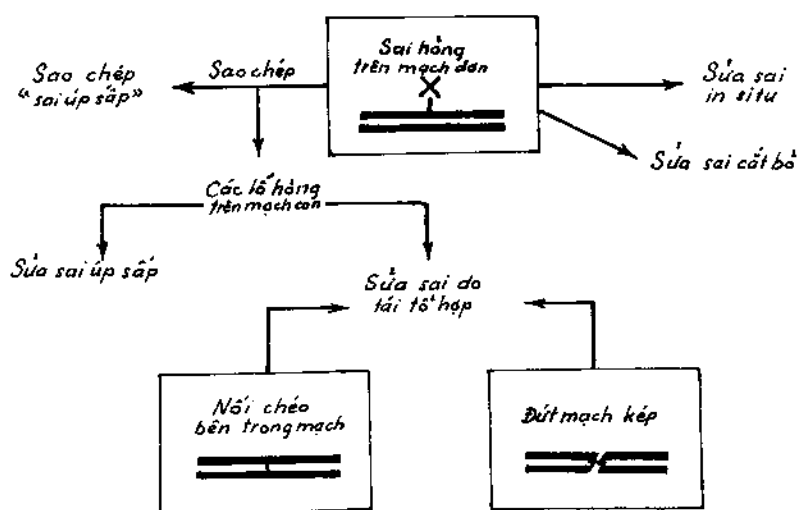
– **Cắt các base** : Sự loại bỏ chỗ sai được thực hiện nhờ một hoặc vài enzyme *N-glycosylase*. N-glycosylase nhận biết base biến đổi hay mất amin hoặc sự biến dạng cấu trúc xoắn do sai lệch tạo ra và thủy giải liên kết N-glycosilic nối base với đường pentose. Lỗ hổng vừa được tạo ra do cắt bỏ được DNA polymerase chép đầy lại dựa vào khuôn là bổ sung đối diện và ligase nối liền lại (hình 10.2).

– **Sự cắt bỏ oligonucleotide** : Sự cắt bỏ vùng có nhiều thymine dimer (do UV) hoặc vùng nối chéo giữa các mạch, được thực hiện nhờ incision nuclease (nuclease rạch mạch hay tạo khắc trên DNA) như phức hợp *Uvr ABC* của *E.coli*, phức hợp này cắt các đoạn 12-13 nucleotide từ một mạch. Sự thủy giải được thực hiện ở liên kết phosphodiester thứ 8 đầu 5' đến chỗ hổng và phía 3' liên kết thứ tư hay năm.

Cấu trúc mạch kép bổ sung cho nhau của DNA cho phép, nếu thông tin bị mất do cắt bỏ sai hỏng trên 1 mạch có thể chép lại được dựa vào mạch đơn nguyên bổ sung kia. Tuy nhiên, một số sai hỏng liên quan cùng lúc cả hai mạch cũng có thể được sửa chữa. Các mất đoạn hay xen đoạn nucleotide, hay nối chéo giữa các mạch có thể được hồi phục nhờ sự thay thế đoạn tương ứng bằng tái tổ hợp. Thậm chí sự đứt đôi cả hai mạch cùng chỗ, được coi là nặng nhất trong các sai hỏng, có thể được gắn liền lại nhờ ligase hay tái tổ hợp.

Các cơ chế sửa sai ở mức phân tử có thể chia thành:

– Sự hồi phục dạng sai hỏng về tình trạng ban đầu (quang tái hoạt hóa, làm mất alkyl hóa (dealkylation)).



Hình 10.3. Các cơ chế sửa sai

– **Cắt bỏ và thay thế** : chỗ sai hỏng bị cắt và thay thế nhờ sao chép, tái tổ hợp hay **hồi phục bắt cặp sai** (mismatch repair).

– Nếu sự sửa sai thất bại, tính liên tục của bộ gen vẫn có thể duy trì nhờ **sao chép “úp sấp sai hỏng”** (“error - prone” replication), khi DNA - polymerase bỏ qua chỗ sai chép tiếp.

Có thể tóm tắt các sai hỏng và các cơ chế sửa sai như hình 10.3.

4. Đọc sửa đối với các base bắt cặp sai

Cơ chế **đọc sửa** đối với các base bắt cặp sai (proofreading for base - pair matching) được thực hiện trong sao chép DNA. Sự bắt cặp cẩn thận của DNA polymerase đảm bảo cho sự chính xác của sao chép. Trước khi thực hiện phản ứng polymer hóa nối các nucleotide, nucleotide triphosphate mới phải bắt cặp với base bổ sung trên mạch khuôn. Nếu sự bắt cặp sai xảy ra, DNA polymerase loại bỏ nucleotide bắt cặp sai.

Thậm chí, trước khi nucleotide mới ráp vào, enzyme dò lại cặp base cuối, nếu chúng không bắt cặp thì sự polymer hóa tiếp theo bị dừng. Cặp nucleotide ở đầu cuối 3' bắt cặp sai sẽ bị loại bỏ bởi hoạt tính **exonuclease 3' → 5'** của DNA polymerase. Khi sự bắt cặp của cấu trúc mạch kép đã đúng, quá trình polymer hóa mới được tiếp tục.

Hoạt tính đọc sửa đối với các base bắt cặp sai là đặc tính của nhiều DNA polymerase đảm bảo cho sự mọc dài chính xác của mạch đang được tổng hợp. Tuy nhiên, trong trường hợp cần thiết, DNA - polymerase có thể bỏ qua chỗ sai và chép tiếp nhờ cơ chế sao chép “úp sấp sai hỏng”.

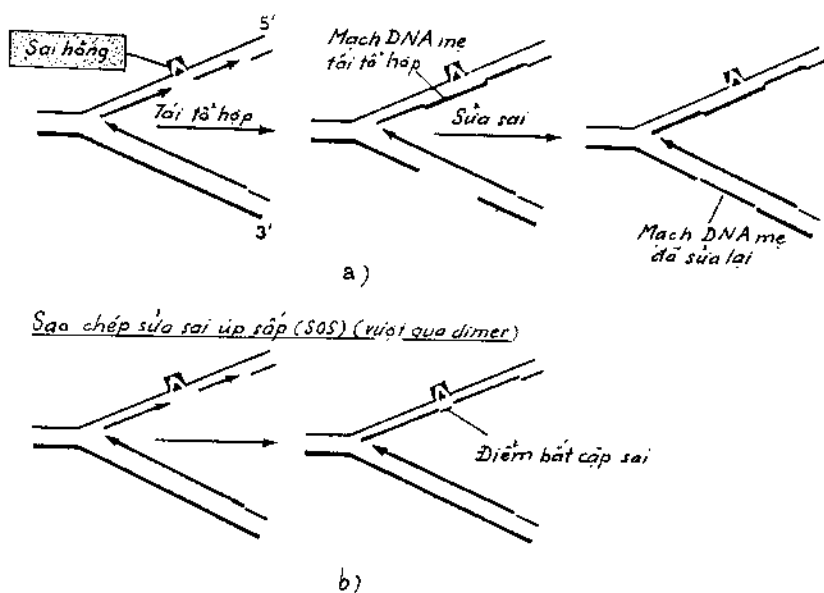
5. Sửa sai nhờ tái tổ hợp và sao chép

Khi DNA polymerase gặp thymine dimer hay một số sai lệch khác trên mạch DNA khuôn, có 2 khả năng xảy ra :

– Polymerase lấp dần lỗ hổng bằng sao chép không theo khuôn do tái tổ hợp và vượt qua chỗ sai (hình 10.4).

– Polymerase dừng lại và huy động khoảng 1000 nucleotide phía dưới (downstream); lỗ trống gián đoạn (hay sao chép) được lấp đầy với mạch bổ sung từ mạch kép chị em (sister duplex) do tái tổ hợp.

Trong cả hai trường hợp, chỗ sai lệch vẫn còn và được cắt bỏ sau đó bởi sửa sai trực tiếp hay cắt bỏ.



Hình 10.4. Sửa sai nhờ tái tổ hợp và sao chép
(Post replication and recombination repair).

a) Sửa sai nhờ tái tổ hợp.

b) Sao chép SOS vượt qua chỗ sai.

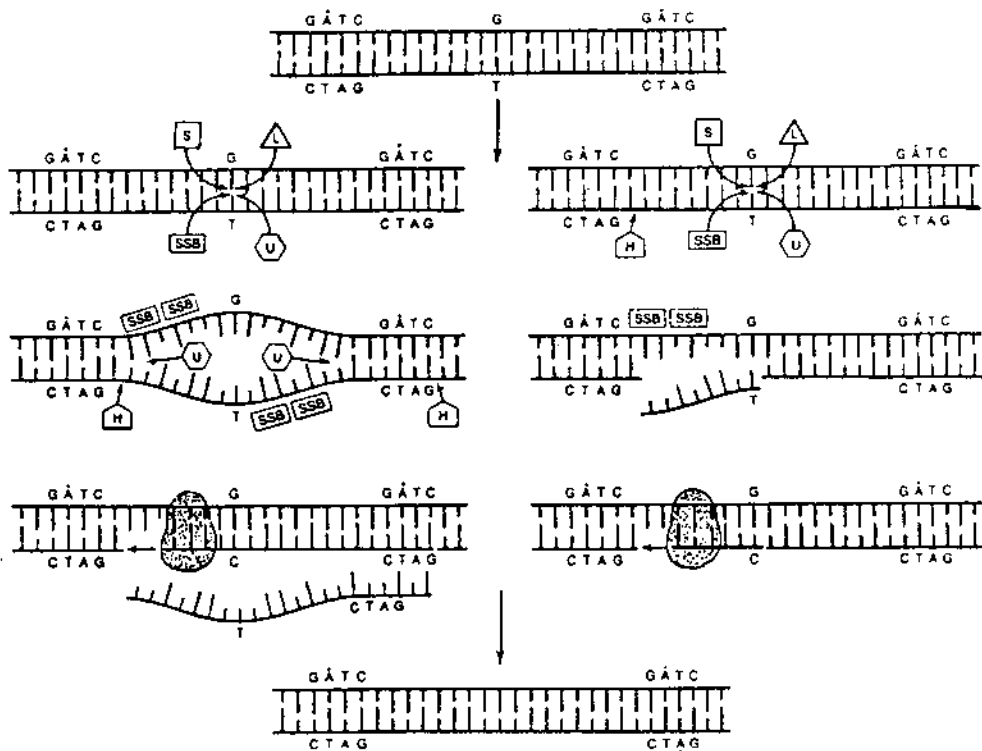
6. Sửa sai không xứng đôi (Mismatch repair)

Sự nhận biết và sửa chữa các sai lệch do bất cặp base trên DNA được phát hiện ở *E. coli*, nấm men và tế bào động vật có vú. Ở *E. coli*, có 3 hệ thống enzyme khác nhau được sử dụng để :

- Loại bỏ chỗ sai trong sao chép (errors in replication).
- Loại bỏ bất cặp không xứng đôi bên trong các đoạn trung gian của tái tổ hợp (mismatch within recombination intermediates).
- Loại bỏ thymine của cặp GT trong trường hợp 5- methylcytosine bị mất nhóm amine ($-NH_2$) thành thymine (hình 10.5).

Sự thất bại trong tái tổ hợp giữa *E. coli* với *Salmonella typhimurium* là do trình tự nucleotide của DNA khác nhau đến 20%. Rào cản tái tổ hợp này được vượt qua ở các thể đột biến sai hỏng trong hệ thống mismatch repair. Điều này chứng tỏ mismatch repair có ý nghĩa quan trọng trong kiểm tra sự chính xác của các đoạn tham gia tái tổ hợp (recombination intermediates).

Trên đây chỉ tóm tắt một số kiểu sửa sai chủ yếu, trong mỗi kiểu còn có nhiều cách khác nhau.



Hình 10.5. Sửa sai không xứng đôi (Mismatch repair)

Hai mô hình được nêu ra giải thích mismatch repair. Trong cả hai, các protein có tên gọi là MutL và MutS tương tác với điểm bắt cặp sai G - T và protein MutH cắt mạch mới được tổng hợp. Bộ máy sửa sai phân biệt mạch khuôn mẹ với mạch mới nhờ nhóm methyl (chấm đen trên A). Các mạch chỗ sai được tách ra nhờ protein MutU và được ổn định nhờ SSB protein (single strand binding protein). Sự khác nhau giữa 2 mô hình ở chỗ nucleotide sai nằm ở :

- 2 trình tự GATC (bên trái)
- 1 trình tự GATC (bên phải).

Trong cả 2 trường hợp, polymerase tổng hợp mạch mới và được methyl hóa ngay cho giống mạch mẹ.

7. Hệ thống SOS (cấp cứu)

Các cơ chế sửa sai có nhiều phản ứng khác nhau với môi trường và được điều hòa do các gen của ít nhất 4 operon, mà hệ thống SOS là một.

Hệ thống này hoạt động khi tế bào bị tác động mạnh bởi các tác nhân gây đột biến tạo nhiều sai hỏng trên DNA. Trong trường hợp DNA bị làm hỏng *ngừng sao chép*, phản ứng SOS hồi phục sao chép và chuyển sai hỏng thành sửa sai úp sấp (error-prone replication). Ở *E. coli* đã quan sát thấy sự phá hủy DNA làm mở ra khoảng 20 gen của hệ thống SOS, được kiểm soát

âm bởi chất kìm hãm *lexA* (*lexA* repressor). Chất này gắn vào hộp SOS (SOS box) chống lấp các promoter của các gen SOS.

Trong trường hợp cấp bách có nhiều sai hỏng cần cấp cứu, *lexA* bị kích thích, thay đổi cấu hình (configuration) tự cắt và mất hoạt tính kìm hãm. Lúc đó các gen SOS được mở ra. Nếu sửa sai không kịp tế bào phải chấp nhận hoặc bị đột biến hay chết.

III. BẢO VỆ DNA : HỆ THỐNG RESTRICTION - BIẾN ĐỔI

Ngoài các hệ thống sửa sai, tế bào còn có các *hệ thống bảo vệ DNA*. Các vi khuẩn có hệ thống miễn nhiễm đáng kể với DNA lạ.

Mặc dù trình tự các base trên phân tử DNA là cố định, nhưng một số *base bị biến đổi* (modification) hóa học sau khi đã được gắn vào DNA. Cả các sinh vật tiền nhân và sinh vật nhân thực đều có các *enzyme methyl hóa* (methylation) gắn nhóm $-CH_3$ ở những điểm nhất định trên phân tử DNA. Các enzyme này có tính đặc hiệu cao chuyên hóa cho từng dòng vi khuẩn, nên DNA của mỗi dòng vi khuẩn được methyl hóa ở những điểm chuyên biệt nhất định tùy mỗi dòng. Nhờ đó mỗi vi khuẩn dễ dàng *phân biệt* giữa DNA của bản thân chúng với *DNA lạ* "ngoại lai" (ví dụ : DNA của phage lạ) xâm nhập vào. Các enzyme cắt hạn chế (restriction enzyme) là một loại *endonuclease* (cắt DNA ở giữa) của mỗi dòng vi khuẩn, không cắt DNA của chúng vì đã được methyl hóa ở những điểm cần thiết, mà *cắt "DNA ngoại lai"* vì không được methyl hóa ở những điểm nhất định.

Các cơ chế biến đổi chính DNA của nó một cách đặc hiệu và phân hủy hay cắt hạn chế (restriction) các phân tử DNA không được đánh dấu. Hệ thống restriction - modification (R - M) ngăn chặn DNA ngoại lai không có hoạt động chức năng nhưng có thể thực hiện tái tổ hợp.

Hệ thống R - M có 2 tính chất căn bản :

— Hoạt tính restriction (cắt hạn chế) đặc hiệu chống sự xâm nhập của DNA ngoại lai.*

— Hoạt tính bảo vệ DNA của bản thân nó.

Hệ thống R - M lần đầu tiên được phát hiện khi nghiên cứu sự nhiễm phage vào vi khuẩn *E. coli*. Sự biến đổi thường là methyl hóa nhóm 6 - amino của adenine trong những trình tự nucleotide đặc hiệu; trong hệ thống kiểu II C5 của cytosine được methyl hóa. Restriction được thực hiện do các hệ thống *endonuclease*. Chúng nhận biết các điểm đặc hiệu ít nhất ở một mạch DNA

không bị biến đổi. Endonuclease cắt đứt mạch ở nhiều điểm nhận biết và sau đó các đoạn ngắn được cắt bằng nuclease khác.

Phần lớn các DNA bị biến đổi có các đặc tính di truyền không ổn định. Sự methyl hóa thường mất qua sao chép trong tế bào chủ.

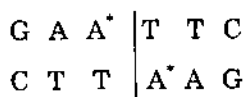
Các nghiên cứu cho thấy ở *E. coli* B có 3 gen liên kết chặt với nhau mã hóa cho 3 sản phẩm khuếch tán: các polypeptide phục vụ cho restriction, cho sự biến đổi và tạo sự đặc hiệu của điểm nhận biết.

DNA mạch kép nhạy cảm hơn với biến đổi và restriction. Các phage mạch đơn như M13 và ϕ X 174 ít bị tác động hơn. Sự biến đổi của một mạch DNA đủ để miễn nhiễm DNA lạ. Do vậy DNA sao chép bán bảo tồn được bảo vệ bởi methyl hóa mạch khuôn.

1. Các methylase của R - M

Các methylase có liên quan chặt chẽ với các kiểu restriction endonuclease (xem chương 14). Restriction endonuclease kiểu I methyl hóa DNA ở điểm đặc hiệu. Điểm không methyl hóa hướng restriction enzyme đến nhận biết và cắt DNA ở chỗ khác không đặc hiệu. S - adenosyl methionine là chất cho (donor), nhóm methyl và DNA mạch kép là chất nhận. Methylase tạo ra một cặp **adenine methyl hóa** (hoặc **cytosine**) có vị trí đối xứng chéo nhau.

EcoRI thuộc restriction endonuclease kiểu II: chức năng methyl hóa và nuclease thuộc các tiểu đơn vị khác nhau. Sự methyl hóa được thực hiện ở A đối xứng chéo qua trục :



Methylase EcoP1 methyl hóa A trong trình tự A G A^{*} C C. Khác với restriction endonuclease kiểu P, P1 methylase không đòi hỏi ATP và không có restriction khi thiếu S- adenosyl methionine.

2. Adenine và cytosine methyltransferase ở *E. coli*

Sự methyl hóa A và C thực hiện rộng rãi ở tất cả các loại DNA. Ở *Prokaryotae* (kể cả phage và plasmid), vai trò thể hiện rõ là phân hủy DNA ngoại lai. Vai trò phụ là phân biệt mạch DNA cha mẹ với mạch con mới được tổng hợp trong phục hồi các chỗ bắt cặp sai. Ở *Eukaryotae*, các sinh vật không có hệ thống restriction, vai trò chủ yếu của methyl hóa có lẽ ở sự điều hòa biểu hiện của gen (xem sau).

Bên cạnh các methylase của hệ thống R - M, còn có các methyltransferase khác của *E. coli*. Các nucleotide được methyl hóa không gắn trực tiếp vào DNA. Các methyltransferase chuyển nhóm methyl từ S-adenosine methionine sang adenine và cytosine ở những điểm đặc hiệu trên DNA.

3. Sự methyl hóa DNA của *Eukaryotae*

Sự methyl hóa DNA của *Eukaryotae* có nhiều điểm khác với ở *Prokaryotae*:

- Base bị biến đổi chủ yếu ở *Eukaryotae* là 5- methylcytosine. Ở động vật có vú, chỉ 5- methylcytosine là base bị biến đổi, trong đó 90% là trình tự đối xứng CpG.

- Do chưa biết được hệ thống R - M ở *Eukaryotae*, nên methyl hóa có lẽ không góp phần bảo vệ chống sự xâm nhập của DNA ngoại lai.

Sự methyl hóa của DNA động vật có vú góp phần vào sự điều hòa biểu hiện của gen và biệt hóa tế bào. Các nghiên cứu cho thấy có sự tương quan thuận giữa methyl hóa thấp (hypomethylation) với hoạt tính của gen và ngược lại giữa sự methyl hóa mạnh với bất hoạt của gen. Sự vắng mặt của các nhóm methyl trên DNA của ruồi giấm chứng tỏ rằng sinh vật đã biệt hóa cao có thể hoạt động không cần cơ chế methyl hóa.

Sự methyl hóa ở động vật có vú có thể đóng vai trò:

- Thay đổi trạng thái của DNA và kìm hãm ái lực của repressor với operator.

- Sự methyl hóa được truyền đạt theo dòng tế bào soma.

- Methyl hóa có thể tạo sự khác nhau giữa các mô.

- 5-azacytidine, chất đồng đẳng với cytidine, tác động làm tế bào fibroblast biệt hóa thành tế bào cơ, có lẽ do cơ chế kìm hãm methyl hóa DNA và như vậy hoạt hóa gen tương ứng.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Sự ổn định rất cao của phân tử DNA qua nhiều thế hệ tế bào không những do cơ chế sao chép chính xác mà quan trọng hơn là can thiệp thường trực của *nhiều hệ thống sửa sai và bảo vệ DNA*. Chương này cho thấy rõ thêm một tính chất kì diệu nữa của phân tử DNA : nó là *chất duy nhất* được tế bào

sửa sai với sự tiêu tốn nhiều năng lượng và sự tham gia hàng loạt gen (ở *E. coli* có đến 100 gen liên quan). Các cơ chế sửa sai rất **đa dạng**: quang phục hồi, mất nhóm alkyl, sửa sai cắt bỏ, sửa sai trong sao chép, sửa sai nhờ tái tổ hợp, thậm chí có cả hệ thống cấp cứu SOS. Hiệu quả cao của các hệ thống sửa sai làm giảm đến mức tối thiểu nhiều sai hỏng trên phân tử DNA. Bên cạnh đó, hệ thống R - M (restriction - modification) ở *Prokaryotae* nhờ các enzyme **restriction endonuclease** và **methylase** bảo vệ DNA chống sự xâm nhập của DNA ngoại lai. Các cơ chế di truyền chủ yếu như sao chép, tái tổ hợp và sửa sai liên quan chặt chẽ với nhau.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Sự sao chép chính xác cao có đủ cơ sở để giải thích sự ổn định cao của DNA không? Giải thích.
2. Trong các sai hỏng trên DNA loại nào nặng nhất và sửa sai như thế nào?
3. Phân tích mối quan hệ giữa sửa sai, tái tổ hợp và sao chép.
4. Các hoạt tính exonuclease (cắt DNA từ đầu mút) của các DNA polymerase đóng vai trò gì trong sao chép DNA?
5. Enzym nuclease S1 tác động chủ yếu lên DNA mạch đơn:
 - a) Nếu DNA mạch kép có lỗ hổng do nucleotide sai thì nuclease S1 có thể cắt liên kết phosphodiester đối diện với lỗ hổng. Giải thích.
 - b) Nuclease S1 cũng có hoạt tính đối với phân tử DNA siêu xoắn. Vì sao? Nó sẽ cắt mạch kép hay đơn?
 - c) Nếu mạch kép bị biến chất rồi hoàn nguyên thì vẫn là cơ chất nghèo cho nuclease S1 tác động. Nhưng nếu các phân tử DNA của phage A trộn với phage B có đột biến điểm (giữa các phage A và B có khác nhau một cặp base ở vị trí tương ứng) và hỗn hợp được làm biến chất rồi hoàn nguyên, gần 1/2 DNA hoàn nguyên bị cắt do nuclease S1. Vì sao? Có phải một phần của DNA hoàn nguyên là mục tiêu tác động của S1? Phần nào?
6. Đột biến mà enzym phục hồi (sửa sai) không phát hiện được là loại nào trong số sau đây và được sửa sai nhờ cơ chế gì?
 - a) Sự thay thế guanine bằng adenine.
 - b) Sự kết hợp hai thymine.
 - c) Sự bắt cặp sai giữa hàng loạt adenine và thymine.

– Mất khả năng sửa sai cắt bỏ để phần lớn sai hỏng không được sửa.

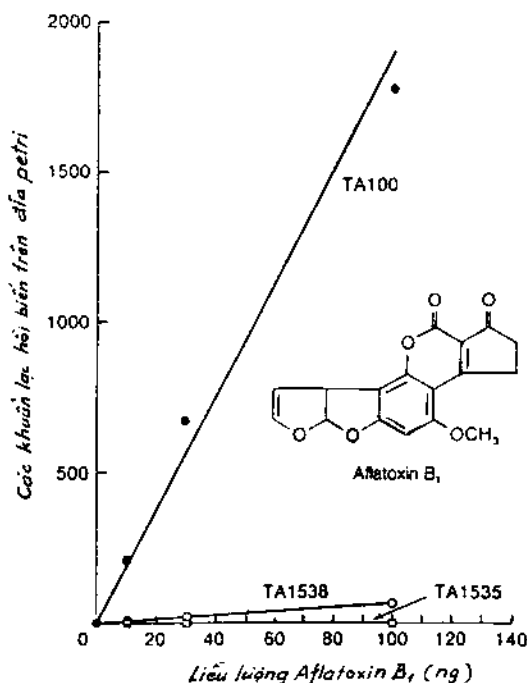
– Tế bào có khả năng sao chép úp sấp nên vượt qua được chỗ sai, nên tế bào con không bị chết và đột biến có thể được biểu hiện.

b) Kiểu gen his^+ do hồi biến $his^- \rightarrow his^+$.

c) Hóa chất có tác dụng gây đột biến khi khuẩn lạc his^+ nhiều hơn hẳn so với đối chứng.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Hóa chất gây ung thư aflatoxin B_1 được đem thử nghiệm Ames để đánh giá hiệu quả gây đột biến (mutagenicity). Ba dòng *Salmonella typhimurium* khuyết dưỡng his^- là TA 100, TA 1538 và TA 1535 được dùng thử nghiệm. Dòng TA 100 còn thêm đặc tính nhạy cảm cao với hồi biến nhờ thay thế bất cặp base (base-pair substitution). Hai dòng TA 1538 và TA 1535 còn thêm đặc tính nhạy cảm cao với hồi biến do lệch khung (frame-shift mutation). Kết quả được ghi nhận trên đồ thị sau :

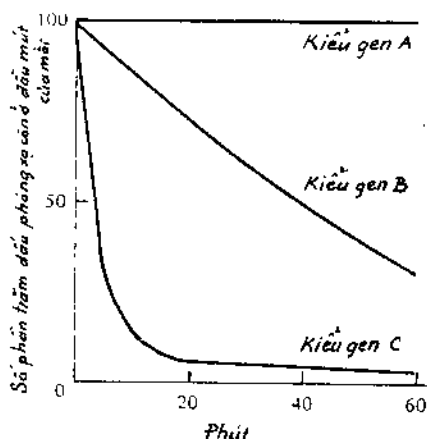


Hình 10.6. Kết quả thử nghiệm Ames của aflatoxin B_1

a) Hãy xác định aflatoxin B₁ có gây đột biến không ?

b) Cơ chế gây đột biến như thế nào ?

2. Đồ thị sau mô tả hoạt tính của DNA polymerase tinh sạch từ 3 nguồn có kiểu gen khác nhau. Hoạt tính được căn cứ vào sự loại bỏ các guanine bắt cặp sai ở đầu mút 3' của mỗi (primer) của mạch DNA bắt cặp với mạch khuôn chỉ có adenine. Guanine được đánh dấu phóng xạ và tỉ lệ dấu phóng xạ còn trên mỗi được đo với chu kì 1 giờ.



Hình 10.7. Hoạt tính cắt bỏ guanine của 3 loại DNA polymerase

Dựa vào kết quả, hãy cho biết và giải thích lí do :

- DNA polymerase nào của kiểu gen hoang dại ?
- DNA polymerase nào của kiểu gen mutator ?
- DNA polymerase nào của kiểu gen antimutator ?

PHẦN IV

DI TRUYỀN HỌC VI SINH VẬT

Vi sinh vật không phải là một khái niệm phân loại, nó dùng để chỉ các sinh vật nhỏ bé chỉ phát hiện được nhờ kính hiển vi. Các vi sinh vật có thể thuộc những nhóm phân loại rất xa nhau như các động vật nguyên sinh (*Protozoa*) đơn bào, vi tảo, vi nấm là các vi sinh vật *Eukaryotae*; còn vi khuẩn, virus là các vi sinh vật *Prokaryotae*. Mãi đến những năm 40, các đối tượng vi sinh vật mới bắt đầu được sử dụng vào nghiên cứu di truyền học. Tuy ra đời chậm nhưng di truyền học vi sinh vật đã đóng vai trò **“cách mạng hóa”** tạo ra những bước tiến nhảy vọt cho di truyền học nói riêng và sinh học nói chung cả về phương diện lý thuyết cũng như ứng dụng thực tiễn.

Các nghiên cứu di truyền được tiến hành một mặt trên các vi sinh vật nhân thực như *nấm mốc*, *nấm men*, *vi tảo* có sinh sản hữu tính; mặt khác trên các *virus* và *vi khuẩn*.

Di truyền học của virus và vi khuẩn đã góp phần đáng kể cho sự ra đời của **kỹ thuật tái tổ hợp DNA** dẫn đến **kỹ thuật di truyền**, làm bùng nổ **Công nghệ sinh học**.

CHƯƠNG XI

DI TRUYỀN HỌC VIRUS

Virus có **cấu tạo đơn giản** và **rất nhỏ** nên được phát hiện muộn hơn. Việc các nhà vật lý học khi chuyển sang lĩnh vực sinh học đã sử dụng các virus vào nghiên cứu di truyền học cho thấy rõ tầm quan trọng của các đối tượng này. Di truyền học virus đã góp phần đáng kể cho **sự phát triển** của sinh học phân tử. Sự hiểu biết chi tiết về các virus không những giúp con người biết rõ các cơ nguyên gây nhiều bệnh hiểm nghèo (ung thư, AIDS,...), mà còn có thể biến chúng thành các công cụ chuyển gen có lợi cho con người.

I. ƯU THẾ VÀ CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC ĐỐI TƯỢNG VI SINH VẬT

1. Các ưu thế

Trong nghiên cứu di truyền học, các đối tượng vi sinh vật có nhiều ưu thế hơn hẳn các động vật và thực vật bậc cao.

a) Vòng đời ngắn, tốc độ sinh sản nhanh

Trong điều kiện thuận lợi, tế bào *E.coli* có thể chia một lần trong 20 phút, còn bacteriophage có thể trong 30 - 40 phút tạo ra hàng trăm cá thể, nấm men có thể chia tế bào trong 2 giờ. Đặc điểm của nghiên cứu di truyền học là theo dõi qua nhiều thế hệ nên các đối tượng vi sinh giúp rút ngắn đáng kể thời gian thí nghiệm. Nếu so thời gian thế hệ của ruồi giấm (2 tuần), của chuột (2 tháng), của người (20 năm) thì các vi sinh vật ưu thế hơn hẳn. Nếu nhà di truyền học phải chờ 2 tuần để có một thế hệ ruồi giấm, thì đối với *E.coli*, thí nghiệm hôm trước, qua ngày sau đã có thể đánh giá kết quả.

b) Tăng vọt số lượng cá thể

Các vi sinh vật đơn bào, mỗi tế bào là một cá thể. Nếu đủ dinh dưỡng các vi sinh vật sinh sản nhanh tạo quần thể có **số lượng cá thể lớn**, có thể khoảng $10^{10} - 10^{12}$ tế bào. Tế bào *E.coli* có đường kính 1 micrometer nếu đủ dinh dưỡng trong 44 giờ có thể tạo sinh khối bằng Quả Đất. Ruồi giấm là đối tượng thuận tiện cho di truyền học quần thể nhưng chỉ đạt $10^5 - 10^6$ cá thể. Nhờ số lượng lớn cá thể của vi sinh vật, có thể **phát hiện các sự kiện di truyền hiếm hoi** (như đột biến hay các dạng tái tổ hợp) với tần số $10^{-8} - 10^{-11}$. Như vậy, số lượng cá thể lớn giúp nâng cao **năng suất phân giải** (resolving power) di truyền tức khả năng phát hiện các đột biến và tái tổ hợp có tần số xuất hiện rất nhỏ.

Ưu thế này lại được tăng thêm nhờ điều kiện **nuôi cấy không công kênh**, ít tốn diện tích hơn so với nuôi ruồi, nuôi chuột và trồng cây. Môi trường nuôi cấy dễ kiểm soát theo công thức chặt chẽ như làm thí nghiệm hóa học.

c) Cấu tạo bộ máy di truyền đơn giản

Vi khuẩn và virus có bộ máy di truyền là **DNA trần**, dễ tiến hành thí nghiệm trực tiếp trên DNA cũng như chiết tách tinh sạch. Số locus cũng ít hơn so với sinh vật khác. Các vi nấm và vi tảo có thể tồn tại ở dạng **đơn bội** (n) với thời gian dài trong chu trình sống, nên các **gen lặn** có thể biểu hiện ngay, mà không phải tiến hành lai phân tích hay đưa về dạng đồng hợp tử lặn.

I. ƯU THẾ VÀ CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC ĐỐI TƯỢNG VI SINH VẬT

1. Các ưu thế

Trong nghiên cứu di truyền học, các đối tượng vi sinh vật có nhiều ưu thế hơn hẳn các động vật và thực vật bậc cao.

a) Vòng đời ngắn, tốc độ sinh sản nhanh

Trong điều kiện thuận lợi, tế bào *E.coli* có thể chia một lần trong 20 phút, còn bacteriophage có thể trong 30 - 40 phút tạo ra hàng trăm cá thể, nấm men có thể chia tế bào trong 2 giờ. Đặc điểm của nghiên cứu di truyền học là theo dõi qua nhiều thế hệ nên các đối tượng vi sinh giúp rút ngắn đáng kể thời gian thí nghiệm. Nếu so thời gian thế hệ của ruồi giấm (2 tuần), của chuột (2 tháng), của người (20 năm) thì các vi sinh vật ưu thế hơn hẳn. Nếu nhà di truyền học phải chờ 2 tuần để có một thế hệ ruồi giấm, thì đối với *E.coli*, thí nghiệm hôm trước, qua ngày sau đã có thể đánh giá kết quả.

b) Tăng vọt số lượng cá thể

Các vi sinh vật đơn bào, mỗi tế bào là một cá thể. Nếu đủ dinh dưỡng các vi sinh vật sinh sản nhanh tạo quần thể có *số lượng cá thể lớn*, có thể khoảng 10^{10} - 10^{12} tế bào. Tế bào *E.coli* có đường kính 1 micrometer nếu đủ dinh dưỡng trong 44 giờ có thể tạo sinh khối bằng Quả Đất. Ruồi giấm là đối tượng thuận tiện cho di truyền học quần thể nhưng chỉ đạt 10^5 - 10^6 cá thể. Nhờ số lượng lớn cá thể của vi sinh vật, có thể *phát hiện các sự kiện di truyền hiếm hoi* (như đột biến hay các dạng tái tổ hợp) với tần số 10^{-8} - 10^{-11} . Như vậy, số lượng cá thể lớn giúp nâng cao *năng suất phân giải* (resolving power) di truyền tức khả năng phát hiện các đột biến và tái tổ hợp có tần số xuất hiện rất nhỏ.

Ưu thế này lại được tăng thêm nhờ điều kiện *nuôi cấy không công kén*, ít tốn diện tích hơn so với nuôi ruồi, nuôi chuột và trồng cây. Môi trường nuôi cấy dễ kiểm soát theo công thức chặt chẽ như làm thí nghiệm hóa học.

c) Cấu tạo bộ máy di truyền đơn giản

Vi khuẩn và virus có bộ máy di truyền là *DNA trần*, dễ tiến hành thí nghiệm trực tiếp trên DNA cũng như chiết tách tinh sạch. Số locus cũng ít hơn so với sinh vật khác. Các vi nấm và vi tảo có thể tồn tại ở dạng *đơn bội* (n) với thời gian dài trong chu trình sống, nên các *gen lặn* có thể biểu hiện ngay, mà khỏi phải tiến hành lai phân tích hay đưa về dạng đồng hợp tử lặn.

Tuy vậy, các vi sinh vật kể trên còn có trạng thái *lương bội* (2n) nên cũng dễ dàng thực hiện *phân tích tái tổ hợp*.

Các tính trạng ở vi sinh vật cũng đơn giản hơn, xác định di truyền các tính trạng này ít phức tạp hơn nên dễ nghiên cứu. Đối với các tính trạng sinh hóa hay tính đề kháng dễ sử dụng *môi trường chọn lọc* để phát hiện.

d) Để nghiên cứu bằng các kĩ thuật vật lí và hóa học

Đa số các vi sinh vật có *cấu tạo đơn bào* nên quần thể của chúng có *độ đồng nhất cao hơn* so với các tế bào sinh vật đa bào bậc cao bắt nguồn từ nhiều loại mô khác nhau. Cấu tạo tế bào vi sinh vật đơn giản, dễ chiết tách, tinh sạch DNA. Có thể *nuôi vi sinh vật đồng nhất* (synchronous culture) tức đa số các tế bào ở những giai đoạn phát triển gần giống nhau. Độ đồng nhất cao của vật liệu thí nghiệm tạo thuận lợi cho việc sử dụng các phương pháp vật lí và hóa học trong nghiên cứu di truyền.

Do những ưu điểm kể trên, với việc sử dụng các đối tượng vi sinh vật, di truyền học đã bước vào giai đoạn nghiên cứu di truyền *"trong ống nghiệm"* (*in vitro*).

Mặc dù các vi sinh vật có những đặc điểm riêng nhưng chúng vẫn tuân theo các quy luật di truyền chung, các kết quả thu được có thể *đối chiếu* áp dụng cho các sinh vật bậc cao.

Vào những năm 40, *nhiều nhà vật lí học* chuyển sang nghiên cứu sinh học. Lĩnh vực mà họ quan tâm trước tiên là di truyền học. Họ bắt đầu các nghiên cứu từ những sinh vật đơn giản nhất, đó là các phage hay vi khuẩn là các sinh vật tiền nhân. Có thể nói di truyền học được tiếp thêm một nguồn sinh lực mới là *tư duy chính xác* của vật lí học được thực hiện trên những đối tượng có nhiều ưu thế. Thêm vào đó hóa học trên đà phát triển của mình đã cung cấp nhiều *phương pháp mới tinh vi* để xác định đánh giá các kết quả thí nghiệm.

2. Các đặc điểm của di truyền vi sinh vật

Đặc điểm của di truyền vi sinh vật là không nghiên cứu từng tế bào riêng lẻ mà nghiên cứu *dòng của tế bào*, tức tập hợp của nhiều tế bào bắt nguồn từ một tế bào ban đầu nhờ sinh sản vô tính. Thường tế bào vi sinh vật được cấy lên môi trường thạch đặc, rồi chà đều để các tế bào rời ra, rồi mỗi tế bào mọc lên một cụm gọi là *khối lạc*, đó là *dòng tế bào*. Dòng tế bào mang một đặc tính di truyền nào đó gọi là *chủng* (strain). Ví dụ : chủng vi khuẩn tạo nhiều vitamin B₁₂ hay chủng vi khuẩn mất khả năng tổng hợp một amino acid nào đó.

Các đột biến ở vi sinh vật thường được phát hiện theo sự biến đổi các tính trạng sau :

a) **Hình thái** : kích thước, hình dạng tế bào hay khuẩn lạc, có màng nhân hay không, khả năng di động...

b) **Sinh hóa** : sự hiện diện của các sắc tố, màu sắc đặc trưng.

c) **Nuôi cấy** : kiểu hô hấp, kiểu dinh dưỡng (khuyết dưỡng - auxotroph) hoặc nhu cầu đòi hỏi các nhân tố tăng trưởng.

d) **Tính đề kháng** : kháng thuốc, kháng phage, chịu nhiệt...

e) **Miễn nhiễm** : các phản ứng kháng thể, kháng nguyên...

Các đột biến có thể xuất hiện ngẫu nhiên hay do gây tạo nhờ các tác nhân gây đột biến. Mỗi gen có tần số đột biến đặc trưng.

Các tính trạng ở vi sinh vật được kí hiệu bằng 3 chữ tắt tiếng Anh hoặc đôi khi là chữ hoa đầu tiên.

Để chỉ hai giới tính khác nhau không dùng hai kí hiệu ♂ và ♀, thay vào đó là các chữ như *mt* (+), *mt* (-) (mating type) ở *Chlamydomonas reinhardi*; hoặc A, a (ở *Neurospora crassa*) hay a và α (ở nấm men).

3. Biến dị ở vi sinh vật

Mãi đến năm 40, lần đầu tiên G. Beadle và E. Tatum mới sử dụng vi nấm *Neurospora crassa* vào nghiên cứu di truyền học. Việc sử dụng chậm trễ các đối tượng vi sinh vật vào nghiên cứu di truyền, một phần lớn do vấn đề **biến dị**. Trong khi ở thực vật, động vật sự di truyền các **tính tập nhiễm** (do luyện tập hay bị nhiễm trong đời sống cá thể) đã được khẳng định là không có thì ở vi sinh vật vấn đề được hiểu ngược lại. Nhiều hiện tượng thực tế tạo cảm giác các vi sinh vật biến đổi dưới tác động trực tiếp của môi trường. Ví dụ, hiện tượng các vi sinh vật quen thuốc hay các chất độc. Lúc đầu thuốc kháng sinh sử dụng với liều thấp, lần lần các vi sinh vật quen thuốc nên phải sử dụng liều cao mới có hiệu quả. Trước đây đã từng tồn tại một quan niệm phổ biến là các vi sinh vật biến đổi theo những quy luật di truyền khác. Có thể nói vấn đề biến dị ở vi sinh vật là **thành trì cuối cùng của chủ nghĩa Lamarck**.

Tuy nhiên một số nhà di truyền học cho rằng biến dị ở vi sinh vật cũng tuân theo quy luật di truyền chung. Hiện tượng quen thuốc được giải thích là phần lớn tế bào nhạy cảm bị diệt, một số ít bị đột biến kháng thuốc còn sống sót và nhờ sinh sản nhanh đã tạo quần thể mới với kiểu gen kháng thuốc nên gây cảm giác "quen thuốc".

Tiếp theo nhiều thí nghiệm xác đáng chứng minh rằng biến dị ở vi sinh vật cũng xuất hiện do các đột biến ngẫu nhiên. Đó là *thử nghiệm dao động* (fluctuation test) của P.Luria và M.Delbruck (1943) và đặc biệt là phương pháp *in hay đóng dấu* (chương VIII) của E. Lederberg (1952).

Như vậy, phương pháp in cho biết đã phát hiện các đột biến kháng được các nhân tố bất lợi nào đây của môi trường trong quần thể vi khuẩn *từ trước khi* các tế bào của chúng *tiếp xúc với tác nhân* này. Ví dụ, streptomycin không phải là nguyên nhân gây biến dị kháng thuốc, mà chỉ là *tác nhân chọn lọc* giữ lại các đột biến đã xuất hiện trước khi tiếp xúc với thuốc. Các đột biến này có kiểu hình giúp cho vi khuẩn thích nghi với biến đổi của môi trường và nhờ sinh sản nhanh sau một thời gian ngắn nên quần thể có kiểu hình mới.

Các kết quả nghiên cứu này khẳng định các vi sinh vật cũng *tuân theo các quy luật di truyền* như các động vật và thực vật. Điều này có ý nghĩa rất lớn cho sự phát triển của di truyền học và sinh học phân tử.

II. SINH HỌC CỦA VIRUS

Virus được phát hiện vào cuối thế kỉ 19 khi nhận thấy nó qua được màng lọc ngăn vi khuẩn. Virus nhỏ nhất có đường kính chỉ 20 nm, nhỏ hơn cả ribosome. Năm 1935, W.M Stanley phát hiện các virus có thể tạo thành tinh thể. Còn các sinh vật khác, tế bào dù đơn giản nhất cũng không thể tạo thành tinh thể được. Các virus hay các virion là những dạng sinh vật có cấu tạo đơn giản nhất.

1. Đặc điểm chung của virus

Virus khác với các sinh vật có cấu tạo tế bào ở nhiều điểm :

- Virus là các thể *nội kí sinh bắt buộc*, không có cấu tạo tế bào.
- Virus chỉ có *một loại nucleic acid* (DNA hoặc RNA) trong khi đó các tế bào có cả hai loại.
- Chúng không có hệ thống sinh tổng hợp protein riêng (*không có ribosome*); không có hệ thống biến dưỡng riêng (ví dụ: không phân hủy thức ăn để tạo ATP).
- Virus *không tạo màng lipid riêng*, mặc dù một số virus có *màng bao* (enveloppe) được tạo ra bằng biến đổi màng của tế bào chủ trước khi thoát ra khỏi tế bào chủ.
- Virus không bị tác động bởi các thuốc kháng sinh ở mức như tế bào.

– Virus không có **khung sườn tế bào** (cytoskeleton) hoặc phương tiện di động ngoài sự khuếch tán.

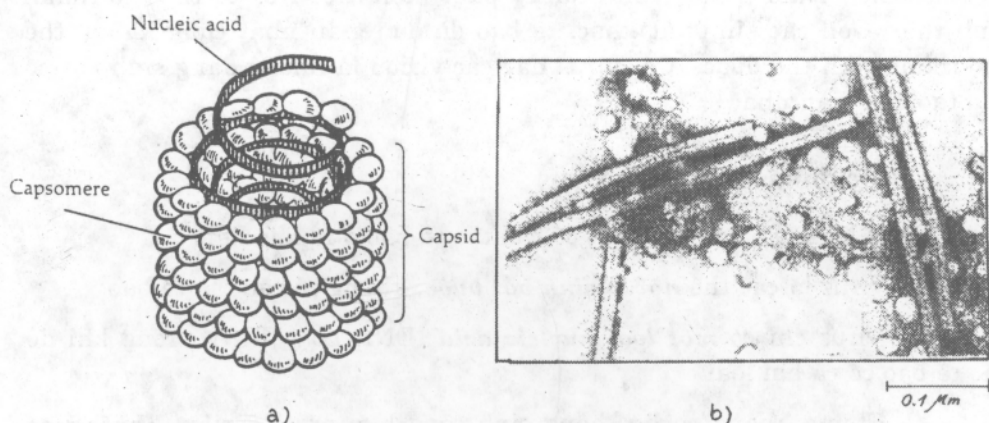
– Virus **không “tăng trưởng”** theo nghĩa là tăng khối lượng, khi virus đã hình thành nó không tăng kích thước.

Virus đã hình thành trọn vẹn được gọi là **virion**, bộ gen của nó được gói trong vỏ protein và bên ngoài có thể có màng bao.

2. Cấu tạo virus

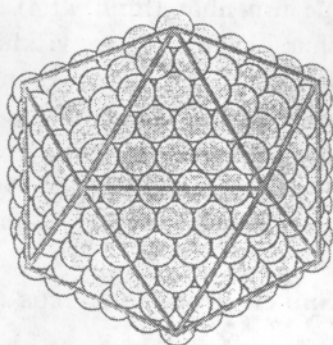
Virus có **bộ gen rất đa dạng**. Bộ máy di truyền của virus có thể là **DNA mạch kép** (double strand - dsDNA), **DNA mạch đơn** (single strand - ssDNA), **RNA mạch kép** (double strand - dsRNA), hay **RNA mạch đơn** (single strand - ssRNA). Bộ gen của virus thường là một phân tử nucleic acid ở dạng **vòng tròn** hay **thẳng**. Virus nhỏ nhất có chừng 4 gen, virus lớn nhất có chừng vài trăm gen.

Vỏ protein bọc bộ gen được gọi là **capsid** thường có thể ở dạng hình que, hình ống xoắn, hình đa diện hay phức tạp. Các capsid thường được tạo nên bởi một số lớn tổ hợp các phân tử protein gồm ít loại, được gọi là **capsomere**. Ví dụ, virus đốm thuốc lá có một capsid hình que dài cứng được tạo ra từ hơn 1000 capsomere (hình 11.1).

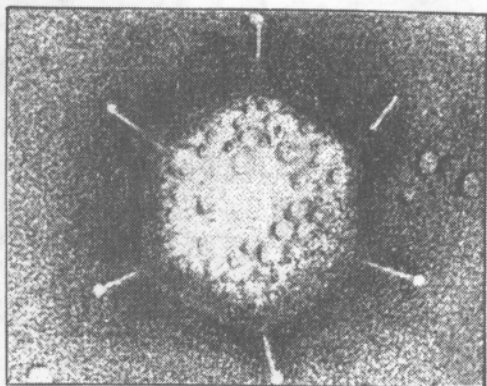


Hình 11.1. Virus đốm thuốc lá
a) Sơ đồ cấu trúc ; b) Ảnh hiển vi điện tử.

Các **Adenovirus**, thường gây nhiễm đường hô hấp của động vật, có 252 phân tử protein tương tự nhau xếp lại tạo **capsid hình đa diện** với 20 mặt (hình 11.2).



a)



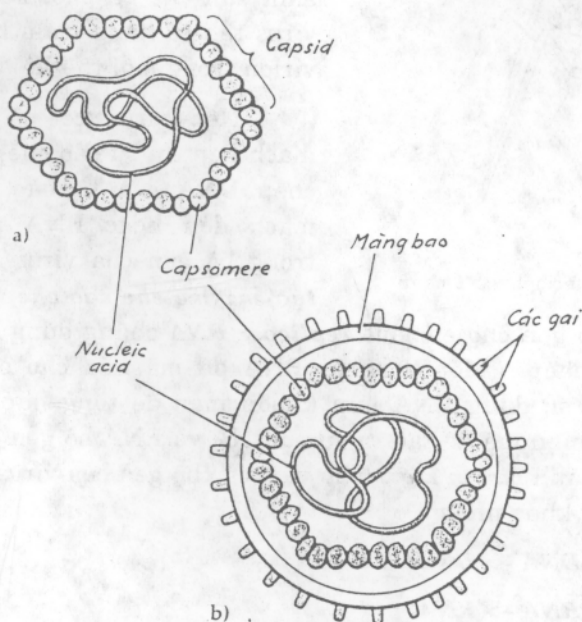
b)

0.1 μm

Hình 11.2. Adenovirus có capsid đầu đa diện

a) Sơ đồ cấu trúc ; b) Ảnh hiển vi điện tử

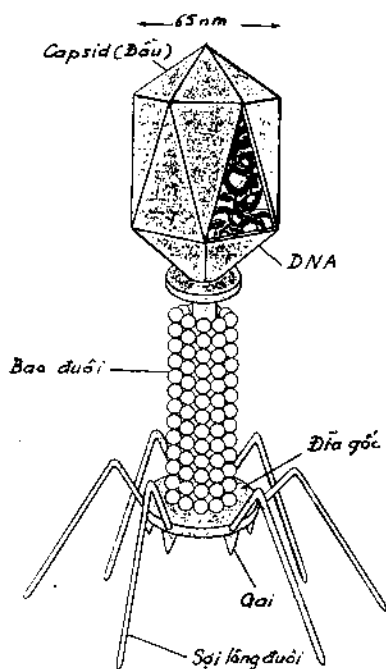
Một vài virus có cấu trúc phụ hỗ trợ để chúng nhiễm vào tế bào chủ. Virus *Flu* và nhiều virus động vật có **màng bao** (envelope) phía ngoài capsid (hình 11.3). Bao này bắt nguồn từ màng của tế bào chủ, nhưng ngoài phospholipid và protein của tế bào chủ, chúng còn có thêm các protein và **glycoprotein** nguồn gốc virus.



Hình 11.3. Sơ đồ hai kiểu cấu trúc của virus

a) Virus trần ; b) Virus có màng bao với các gai

Các virus nhiễm vi khuẩn có capsid phức tạp nhất (hình 11.4). Các virus của vi khuẩn được gọi là **bacteriophage** (thực khuẩn thể - ăn vi khuẩn) hay gọi ngắn là **phage**. Bảy phage đầu tiên gây nhiễm *E.coli* được nghiên cứu mang tên T₁, T₂, T₃...T₇ (T từ chữ type). Các **phage T** **chấn** (T₂, T₄, T₆) có cấu trúc rất giống nhau (hình 11.4). Capsid của chúng gồm một **đầu đa diện** (20 mặt) bọc chất di truyền. Phần thứ hai là **bao đuôi** bằng protein thành ống dài và phần thứ ba là **sợi đuôi** dài bám vào tế bào vi khuẩn khi gây nhiễm.



Hình 11.4. Bacteriophage T chấn

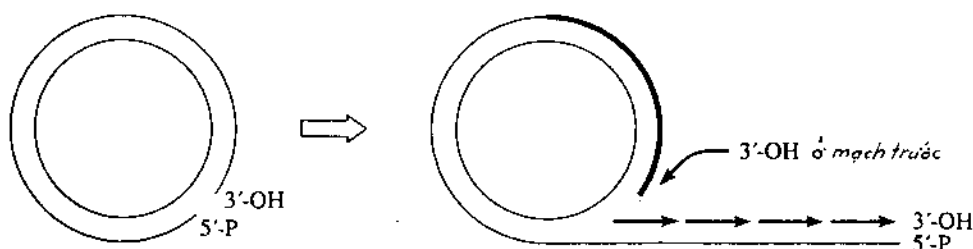
3. Sao chép của các virus

Các hạt virus (virus particle) hay **virion** là những vật **kí sinh nội bào bắt buộc** (obligate intracellular parasite). Chúng chỉ biểu hiện các gen của chúng và sinh sản bên trong 1 tế bào sống khác. Phụ thuộc vào loại tế bào chủ mà virus kí sinh, người ta gọi tên loại virus, ví dụ : **virus thực vật** kí sinh tế bào thực vật, **virus động vật** kí sinh tế bào động vật. Do đặc điểm này, sự sinh sản của virus khác hẳn với sự sinh sản của tế bào. Điểm nổi bật là virus tạo ra hàng trăm hay hàng ngàn virion trong mỗi thế hệ.

Nếu virus có bộ gen là DNA mạch kép thì sự sao chép giống với sao chép DNA của tế bào. Nếu là DNA mạch đơn hoặc RNA mạch đơn thì trong bộ gen của virus thường có **gen tạo enzyme cho sao chép**. Phần lớn các virus RNA, để có gen cho enzyme **replicase RNA** chúng dùng RNA của virus làm khuôn sao chép. Một số virus RNA để mã hóa cho enzyme **reverse transcriptase** đã sử dụng RNA làm khuôn mẫu để tổng hợp c-DNA và rồi DNA này được phiên mã để tạo ra vừa mRNA và RNA bộ gen của virus để tự ráp với capsid thành **virion mới**. Như vậy, các bộ gen của virus được sao chép theo 3 con đường khác nhau :

- DNA → DNA,
- RNA → RNA
- RNA → c-DNA kép → RNA.

Một kiểu sao chép khác được tế bào vi khuẩn sử dụng trong tiếp hợp để truyền phân tử DNA dạng thẳng sang tế bào khác hoặc được các virus sử dụng để tạo các bộ gen của chúng, mặt khác làm đứt mạch của vòng tròn xoắn kép, tạo đầu hở 3'-OH và 5'-P kết thúc. Helicase và SSB protein chen vào tạo chẻ 3 sao chép. Sự sao chép được thực hiện không cần mồi (primer) vì mạch 3'-OH sẵn sàng cho việc nối dài như mạch trước (leading strand) nhờ DNA polymerase I. Đồng thời với sao chép mạch trước, mạch khuôn sau dịch chuyển. Sự dịch chuyển của mạch sau gián đoạn để tổng hợp các đoạn ngắn *Okazaki* như bình thường và đầu 5' mạch khuôn duỗi thẳng ra (hình 11.5). Sự sao chép có hình giống chữ sigma (σ) của Hi Lạp, nên được gọi là **sao chép sigma** (σ replication). Kiểu sao chép σ này còn được gọi là **vòng tròn quay** (rolling-circle replication), vì mạch khuôn tròn ở giữa không bị đứt và quay tròn làm khuôn cho mạch trước. Sự sao chép kiểu này có thể lặp lại vài lần tạo ra sợi DNA dài, lặp lại nhiều lần bộ gen thẳng của virus, được gọi là **concatemer**. Enzyme **endonuclease** cắt ở những điểm khác nhau trên mỗi mặt của DNA tạo ra các đoạn cỡ bộ gen với hai đầu "dính". Bộ gen thẳng này sẽ tạo thành vòng nhờ bắt cặp bổ sung các đầu "dính".



Hình 11.5. Sao chép σ (sigma) hay vòng tròn xoay
(Đường đậm chỉ mạch mới được tổng hợp)

4. Sự tự ráp (*Self-assembly*) của các virion

Các gen của virus sử dụng các enzyme, chất dinh dưỡng, ribosome và các nguồn khác của tế bào chủ để tạo ra nhiều bản sao của bộ gen và các protein của các cấu phần khác (capsid, cổ, bao đuôi...). Khi các sản phẩm riêng lẻ đã tích đủ, chúng **tự ráp** (self-assembly) nhau thành số lượng lớn các virion rồi phá vỡ tế bào tìm các tế bào chủ mới.

Sự ráp nucleic acid của virus với các protein của capsid để hình thành virion mới diễn ra **tự động** tương tự các mạch polypeptide tự gắn với nhau để tạo nên các protein có cấu trúc bậc bốn. Các cấu phần được gắn với nhau bằng liên kết yếu nên không cần enzyme.

5. Tính đặc hiệu với tế bào chủ

Mỗi kiểu virus có thể nhiễm và kí sinh chỉ ở một biên độ giới hạn của tế bào được gọi là **biên độ chủ** (host range). Các virus nhận biết tế bào chủ theo nguyên tắc "ổng khóa và chìa khóa" các protein bên ngoài của virion lắp vừa các **điểm nhận** (receptor site) trên bề mặt tế bào. Một số virus có biên độ chủ rộng đủ để xâm nhập vào vài loài. Các virus bệnh đại có thể nhiễm nhiều loài có vú gồm gặm nhấm, chó và người. Biên độ có thể rất hẹp như nhiều phage chỉ nhiễm vi khuẩn *E.coli*.

III. BACTERIOPHAGE - VIRUS CỦA VI KHUẨN

Các virus của vi khuẩn được phát hiện từ năm 1915. Vào những năm 40, chúng được sử dụng cho các nghiên cứu sinh học phân tử. Chúng là những virus được nghiên cứu kĩ nhất, mặc dù một số ít chúng có cấu tạo phức tạp.

Các nghiên cứu phage kí sinh ở tế bào *E.coli* phát hiện rằng chúng có 2 cơ chế sinh sản : chu trình tan (lytic cycle) và chu trình tiềm tan (lysogenic cycle).

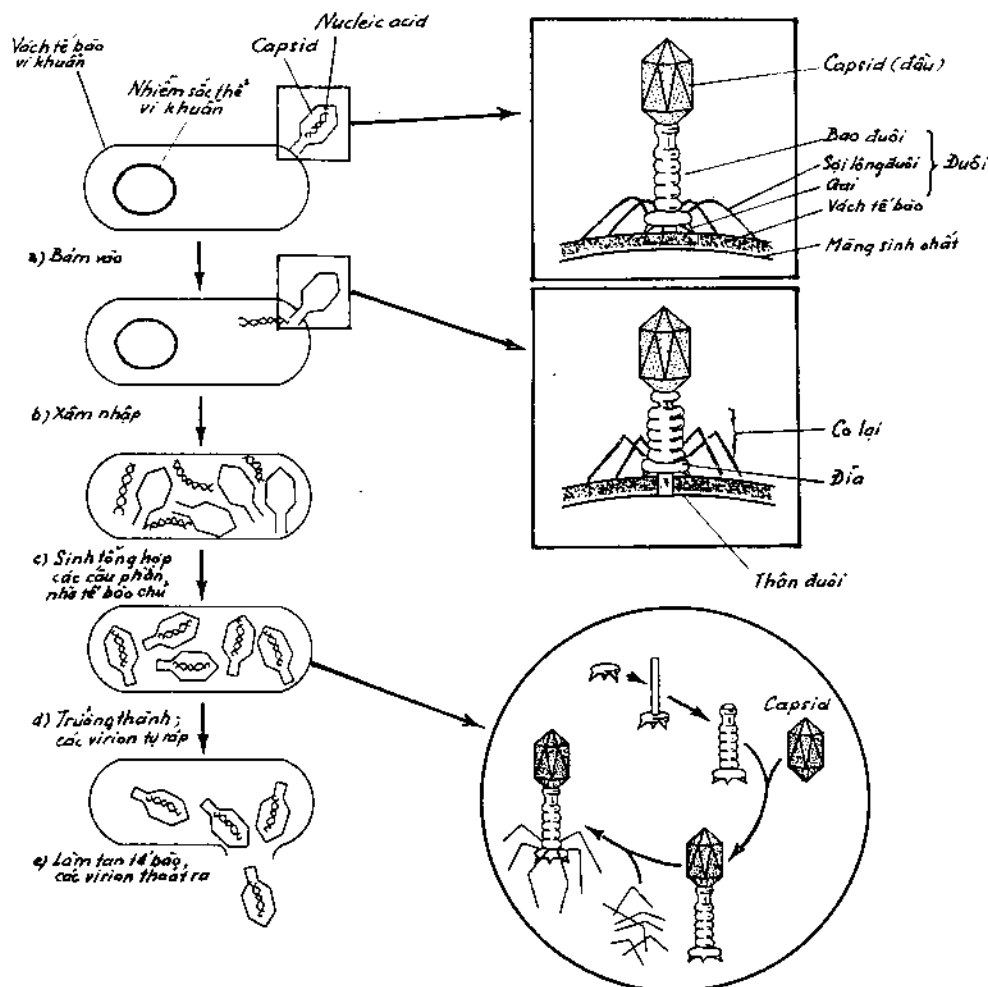
1. Chu trình tan (*Lytic cycle*)

Các bacteriophage làm chết tế bào chủ gọi là **độc** (virulent) và chúng sinh sản theo **chu trình tan** (hình 11-6). Chu trình bắt đầu khi **sợi đuôi** của phage T₄ gắn vào các **điểm nhận** (receptor sites) trên bề ngoài của tế bào *E.coli*. Ống đuôi co lại tạo lỗ thủng xuyên vách tế bào và bơm DNA vào trong tế bào tương tự như dùng ống tiêm (syringe) bơm thuốc. Capsid rỗng của phage còn lại bên ngoài tế bào.

Khi DNA trần đã xâm nhập vào trong tế bào, các phage khác nhau có thể sử dụng các cách khác nhau để sản sinh ra thế hệ con. Sau khi bị nhiễm, tế bào *E.coli* nhanh chóng bắt đầu **phiên mã** và **dịch mã** các gen của virus. Phage T₄ có khoảng 100 gen và phần lớn đã được biết rõ. Một trong những enzyme được tạo ra đầu tiên **cắt DNA** của tế bào chủ.

Nói chung, DNA của phage được phiên mã đầu tiên nhờ DNA polymerase của tế bào chủ tạo ra "**mRNA sớm**". Các mRNA muộn hơn có thể được tổng hợp bởi RNA polymerase của phage hoặc RNA polymerase của vi khuẩn bị biến đổi để phiên mã các gen của phage. Các **mRNA muộn** được dịch mã tạo các loại protein enzyme điều hòa và cấu trúc. Các **protein điều hòa** của phage kiểm soát sự phiên mã nối tiếp của các gen (kiểu điều hòa nối tiếp).

Khi DNA của tế bào chủ bị phân hủy, bộ gen của phage kiểm soát toàn bộ hoạt động của tế bào để tạo các cấu phần của nó. Các nucleotide được dùng để **sao chép DNA của phage** ra hàng trăm bản sao. Các protein của capsid được tổng hợp thành 3 phần riêng: đầu đa diện, ống đuôi và các sợi đuôi; rồi chúng tự ráp lại với nhau thành virion con (hình 11.6 - vòng tròn phía dưới góc phải). Phage hoàn tất chu trình khi enzyme **lysozyme** được tạo ra để tiêu hóa vách tế bào. Tế bào vi khuẩn bị vỡ, 100 đến 200 virion thoát ra và chúng có thể lặp lại chu trình mới.



Hình 11.6. Chu trình tan của phage T4

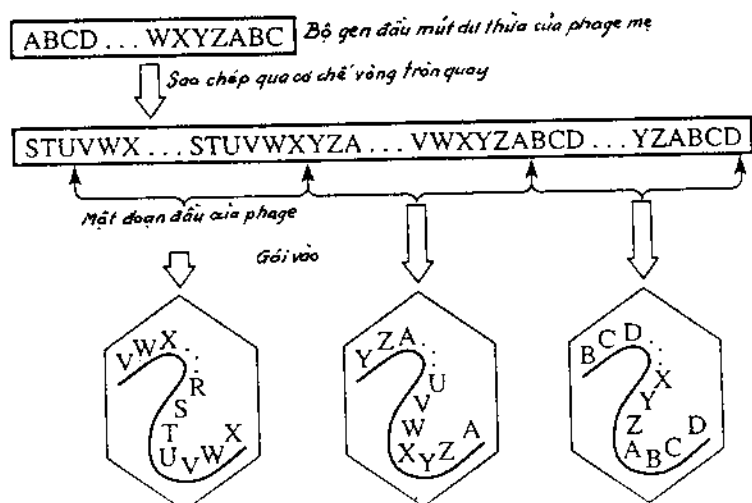
- a) Bám vào ; b) Xâm nhập ; c) Sinh tổng hợp các cấu phần nhờ tế bào chủ ;
d) Trưởng thành : các virion được tự ráp ; e) Làm tan tế bào, các virion thoát ra

Toàn bộ chu trình từ lúc phage tiếp xúc bề mặt tế bào đến tan diễn ra trong khoảng 20 - 30 phút ở 37°C. Trong thời gian đó số lượng phage T₄

tăng hơn cả trăm lần, cũng khoảng thời gian đó số lượng tế bào *E.coli* mọc nhanh nhất cũng chỉ tăng gấp đôi. Nếu nhỏ một hạt T₄ lên thăm tế bào *E.coli* mọc trên môi trường rắn trong hộp petri thì sau đó xuất hiện vết tan (plaque) do các tế bào vi khuẩn bị phá vỡ. Trên thực tế, có thể đo được các hạt phage trong dung dịch bằng cách pha loãng dịch rồi trộn với dịch tế bào vi khuẩn và cấy lên môi trường rắn trong hộp petri và sau đó tính số vết tan suy ra mật độ phage.

Phage dạng sợi (filamentous phage) như *M.13* có khả năng xâm nhập vách tế bào và lúc đó enzyme của tế bào chủ tiêu hủy vỏ protein làm nucleic acid thoát ra.

Ở phage lamda (λ), sự sao chép *theta* (θ) hay sao chép "mắt" xảy ra rất sớm trong chu trình tan làm tăng nhanh các khuôn cho phiên mã và sao chép tiếp. Về sau, **sao chép vòng tròn xoay** đảm bảo các bộ gen để gói vào đầu của phage thế hệ con. Các bộ gen của phage λ cũng được cắt ra từ concatemer, nhưng khác với phage T₄, sự cắt được thực hiện ở một **trình tự chuyên biệt** dài 12N gọi là điểm *cos* (từ chữ cohesive site - điểm cố kết) do *terminase* hay **hệ thống Ter** (Ter system - nhận biết trình tự đặc hiệu). Sự cắt bởi Ter đòi hỏi hai điểm *cos* hoặc một điểm *cos* và đầu mút cố kết tự do (1/2 *cos*) hiện diện trên phân tử DNA của concatemer. Bộ gen của phage λ được biến đổi có chiều dài trong khoảng 79-106% của bộ gen phage λ bình thường khi bị cắt bởi hệ thống Ter và được ráp vào đầu của phage. Đây là tính chất quan trọng của phage λ được sử dụng trong kỹ thuật tái tổ hợp DNA (chương XIV).



Hình 11.7. Các DNA của phage vòng tròn đối đầu (cyclically permuted)

Có một số cơ chế khác nhau **gói DNA vào vỏ**. Ở phage T₄ của *E.coli*, sự **sao chép vòng tròn xoay** của mạch DNA kép tạo ra một sợi DNA mạch kép

dài gồm một dãy các *concatemer* nối tiếp nhau. Các concatemer bị cắt ở những điểm không chuyên biệt. Vì khả năng chứa DNA của đầu lớn hơn chiều dài 1 bộ gen của phage, nên mỗi đoạn thẳng được cắt ra thành từng concatemer với trình tự gen khác nhau. Các đoạn cuối thường có đoạn lặp lại nên được gọi là sự *dư thừa cuối* (terminal redundance). Vì mỗi đoạn của concatemer được cắt ở những điểm khác nhau nên chúng tạo thành các *vòng tròn đối đầu* (cyclically permuted) như trên hình 11.7.

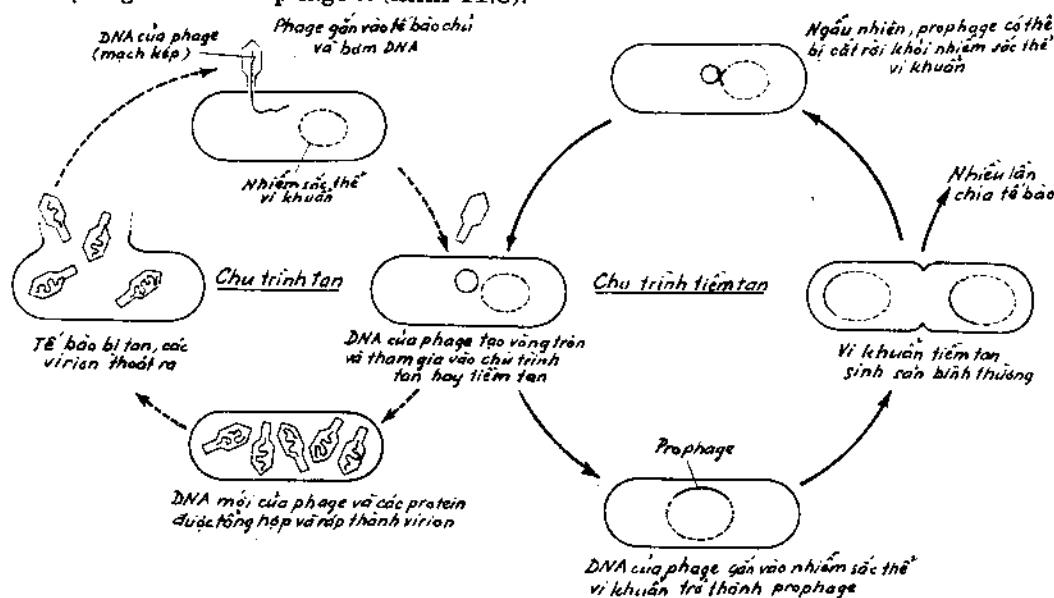
Sau khi phage tự ráp các cấu phần xong, protein phân hủy gọi là *lysozyme* được sản sinh ra làm tan tế bào và giải phóng các phage con. Phần lớn các phage độc theo chu trình tan vừa nêu trên. Tuy nhiên, có một số ngoại lệ, như phage sợi (filamentous) M13 của *E.coli* hầu như không bao giờ làm chết hoặc làm tan tế bào.

Các tế bào vi khuẩn chủ và các phage kí sinh có *sự đồng tiến hóa* (coevolution). Các tế bào vi khuẩn có các cơ chế bảo vệ như biến đổi màng tế bào để phage không bám vào được hoặc các enzyme restriction endonuclease cắt các DNA của phage. Phage cũng biến đổi để xâm nhập được vào tế bào vi khuẩn.

Có trường hợp cả hai cùng tồn tại trong chu trình tiềm tan.

2. Chu trình tiềm tan (*Lysogenic cycle*)

Các virus có thể sinh sản mà không làm chết tế bào chủ được gọi là *ôn hòa* (temperate virus). Chúng có 2 khả năng sinh sản: chu trình tan và chu trình tiềm tan không làm chết tế bào chủ. Chi tiết chu trình tan và tiềm tan được nghiên cứu ở phage λ (hình 11.8).



Hình 11.8. Chu trình tan và tiềm tan ở phage λ

Có hai kiểu chu trình tiềm tan. Trong kiểu chung cho đa số như phage λ , DNA của phage gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ. Ở kiểu khác mà đại diện là phage P_1 , DNA của phage không gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ, mà bằng cách nào đó sao chép đồng thời như plasmid. Cả hai dạng đều được gọi chung là **prophage**.

Chu trình sống bắt đầu khi phage gắn vào bề mặt tế bào *E.coli* và bơm DNA vào trong gây nhiễm. DNA của phage sau khi được bơm vào tế bào tạo **vòng tròn** và sẽ tham gia vào một trong 2 chu trình. DNA của phage có thể hoặc tham gia vào chu trình **tan** của phage T_4 hoặc gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhờ tái tổ hợp ở **điểm chuyên biệt** (specific site) để bước vào **chu trình tiềm tan**. Khi bộ gen của phage gắn vào bộ gen của vi khuẩn nó được gọi là **prophage**. Ở prophage phần lớn các gen không có hoạt tính. Tuy nhiên có ít nhất 1 gen của prophage luôn hoạt động: gen mã hóa cho **protein kìm hãm** (repressor protein) giữ cho phần lớn các gen của phage im lặng. Trong quá trình sinh sản của tế bào, DNA của prophage cũng được sao chép và chia đều về các tế bào con như DNA của tế bào. Một tế bào bị nhiễm có thể nhanh chóng sinh ra nhiều tế bào vi khuẩn chứa prophage.

Quá trình gắn DNA của phage thực hiện qua 4 bước:

- DNA mạch thẳng được bơm vào tế bào; DNA của phage ở dạng vòng tròn nhờ sự bắt cặp các đoạn đuôi dư thừa.
- Một số **gen sớm** của phage phiên mã và tổng hợp một số phân tử **protein ức chế** (repressor) và enzyme **integrase** (enzyme xúc tác việc gắn vào bộ gen tế bào chủ). Repressor ức chế sự phiên mã các gen của phage.
- DNA của phage thường được gắn vào ở điểm chuyên biệt trên nhiễm sắc thể thành prophage nhờ enzym **integrase**.
- Vi khuẩn sống và sinh sản; prophage được sao chép cùng với nhiễm sắc thể của tế bào chủ.

Đôi khi prophage có thể tách khỏi DNA của vi khuẩn một cách ngẫu nhiên hoặc có thể tách khỏi do tác động của các nhân tố môi trường như phóng xạ hay hóa chất. Quá trình tách diễn ra ngược lại với gắn vào. Prophage được tách rời ra độc lập trở thành phage và bắt đầu **chu trình tan**.

Nếu **vi khuẩn tiềm tan** bị tác động phá hủy DNA, prophage sẽ có lợi nếu tách khỏi nhiễm sắc thể, chuyển sang chu trình tan sản sinh ra các phage mới thoát khỏi tế bào. Khi DNA của vi khuẩn bị **thương tổn**, **protease** (recA protein) của hệ thống sửa sai SOS được hoạt hóa. DNA của prophage bị ức chế, **excisionase** (enzym cắt rời) được tổng hợp và prophage tách khỏi nhiễm sắc thể. Quá trình đó được gọi là **cảm ứng** của prophage (prophage induction). Nếu tia UV phá hủy DNA của tế bào chủ làm cảm ứng prophage

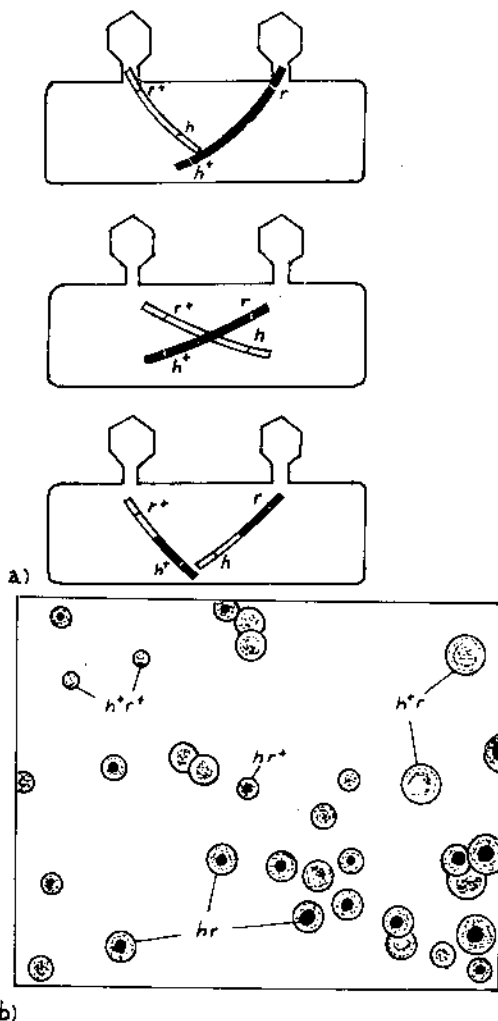
thì được gọi là **cảm ứng do UV**. Khi tế bào vi khuẩn F^- không tiềm tan giao hợp với tế bào Hfr tiềm tan, tế bào nhận bị chết do chu trình tan của phage. Dạng cảm ứng phage này được gọi là **cảm ứng hợp tử** (zygotic induction).

Vì tế bào chủ mang prophage trên nhiễm sắc thể của mình sẽ có khả năng bị tiềm tan nếu prophage tách ra nên được gọi **tế bào tiềm tan**. Đôi khi một ít gen của prophage biểu hiện ở tế bào tiềm tan gây biến đổi kiểu hình ở vi khuẩn, quá trình được gọi là **chuyển hóa tiềm tan** (lysogenic conversion). Một số prophage có thể tạo độc tố.

3. Tái tổ hợp ở phage

Các phage tuy có kích thước nhỏ bé phải nhìn dưới kính hiển vi điện tử mới thấy được. Nhưng các tính trạng của phage được quan sát dựa theo các **vết tan** hoặc **biên độ chủ**. Phage T_2 có dòng hoang dại r^+ tạo vết tan bình thường, còn dòng đột biến r (rapid) làm tan nhanh nên vết tan to. Về biên độ chủ có dòng hoang dại h^+ (host) chỉ làm tan vi khuẩn *E.coli* dòng B nhưng không làm tan dòng B_2 , đột biến h làm tan các vi khuẩn *E.coli* cả 2 dòng B và B_2 . Dòng phage T_2 hr^+ làm tan cả B và B_2 với vết tan nhỏ được lai với dòng T_2 h^+r làm tan chỉ B nhưng vết tan to.

$$\begin{array}{ccc}
 T_2 \text{ } h^+r & \times & T_2 \text{ } hr^+ \\
 \downarrow & & \\
 T_2 \text{ } hr^+, T_2 \text{ } h^+r & & T_2 \text{ } h^+r^+, T_2 \text{ } hr \\
 \text{Các dạng cha mẹ} & & \text{Các dạng tái tổ hợp}
 \end{array}$$



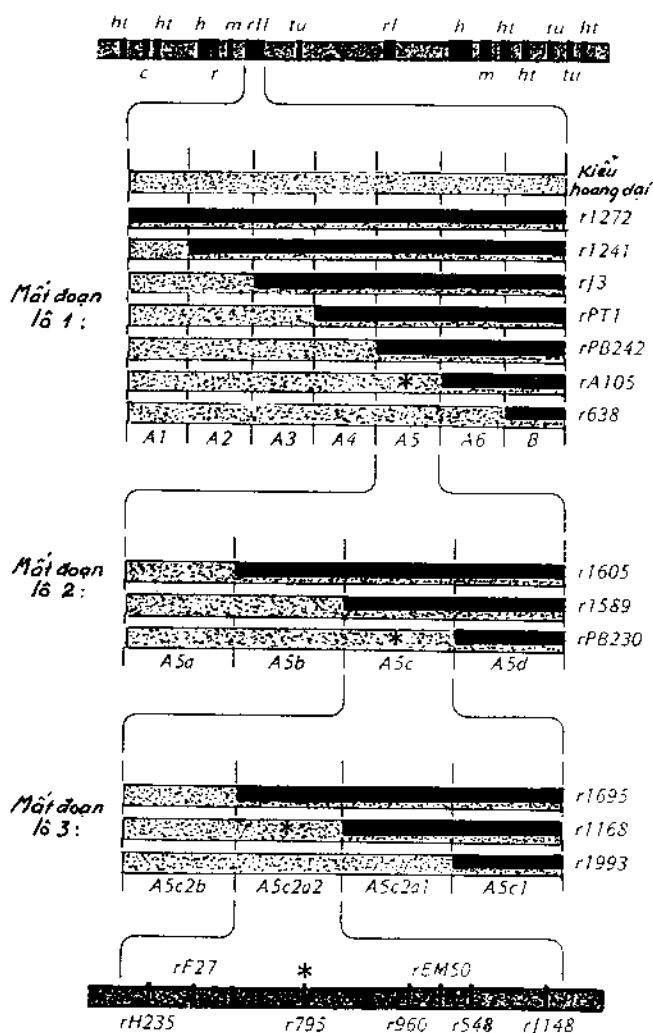
Hình 11.9. Tái tổ hợp ở bacteriophage

Sự xuất hiện các dạng tái tổ hợp T_2 h^+r^+ và T_2 hr chứng tỏ 2 dòng phage T_2 đã lai với nhau.

Tái tổ hợp ở virus có các đặc điểm :

- Trong quá trình lai ở virus có sự tham gia của **cả bộ gen** như *Eukaryotae* chứ không từng phần như ở vi khuẩn (sơ đồ của hình 11.9)

Quá trình tái tổ hợp có **tính quần thể**. DNA của 2 dòng phage xâm nhập vào tế bào vi khuẩn, chúng sao chép ra hàng trăm bản sao và giữa hàng trăm DNA bộ gen của phage đã xảy ra tái tổ hợp. Do điều này, ở phage thường thấy hiện tượng **nhiều âm** (negative interference) trong tái tổ hợp : tần số **tái tổ hợp đôi** giữa 2 locus đáng lẽ phải giảm thì lại tăng cao hơn mức bình thường.



Hình 11.10. Lập bản đồ gen dựa vào các mất đoạn

4. Lập bản đồ cấu trúc tinh vi các gen của phage

a) Thử nghiệm bổ sung

S. Benzer (1952) đã thu nhận số lớn các đột biến ở phage T4 tại locus *rII* và dùng thử nghiệm bổ sung để xác định vị trí các điểm đột biến. Ông cũng đã lập **bản đồ chi tiết** của locus *rII* gồm 2 cistron A và B (thật ra là 2 locus của 2 gen). Khái niệm **cistron** có tính lịch sử về sau sẽ dùng thuật ngữ gen để chỉ đơn vị chức năng.

b) Lập bản đồ gen bằng các mất đoạn

Benzer cũng phát hiện rằng khoảng 10% trong số hơn 2000 đột biến *rII* **không có hồi biến** do mất đoạn với các chiều dài khác nhau, dạng tái tổ hợp hoang dại sẽ xuất hiện nếu các mất đoạn không chồng lấp nhau (hình 11.10). Bằng một loạt lai, Benzer đã xác định được vị trí của nhiều đột biến.

IV. CÁC VIRUS EUKARYOTAE

1. Các virus thực vật

Các virus thực vật là một tai họa lớn cho trồng trọt vì nó làm giảm đáng kể năng suất cây trồng.

a) Các virus RNA

Phần lớn các virus thực vật phát hiện cho đến nay, đa số có **bộ gen RNA mạch đơn kiểu (+)** và nhiều dạng có **capsid hình que**, kể cả virus đốm thuốc lá (hình 11.1). Các protein **capsomer** xếp hình xoắn.

b) Các virus DNA

Các virus thực vật có bộ gen là DNA rất hiếm và chỉ gồm 2 nhóm :

– Nhóm thứ nhất là các *cauliflower mosaic virus*. Chúng có bộ gen là **DNA mạch kép** nằm trong **vỏ (capsule) đa diện** (polyhedral).

– Nhóm thứ hai là các *geminivirus* (gemini có nghĩa **sinh đôi**). Chúng có đặc tính là các capsid **đỉnh thành đôi**, mỗi cái chứa một phân tử **DNA mạch đơn vòng tròn** với khoảng 2500 nucleotide. Các bộ gen bất cặp có thể tương tự nhau ở một số virus và khác nhau đáng kể ở số khác.

c) Các viroid

Các viroid là một nhóm tác nhân gây bệnh ở thực vật, có kích thước nhỏ và cấu trúc đơn giản như virus. Chúng là những **RNA mạch đơn, trần, nhỏ bé** có chiều dài chỉ vài trăm (240 - 350) nucleotide. Có sự bắt cặp mạnh giữa các bên trong phân tử RNA tạo cấu trúc kép. Các viroid không được bao

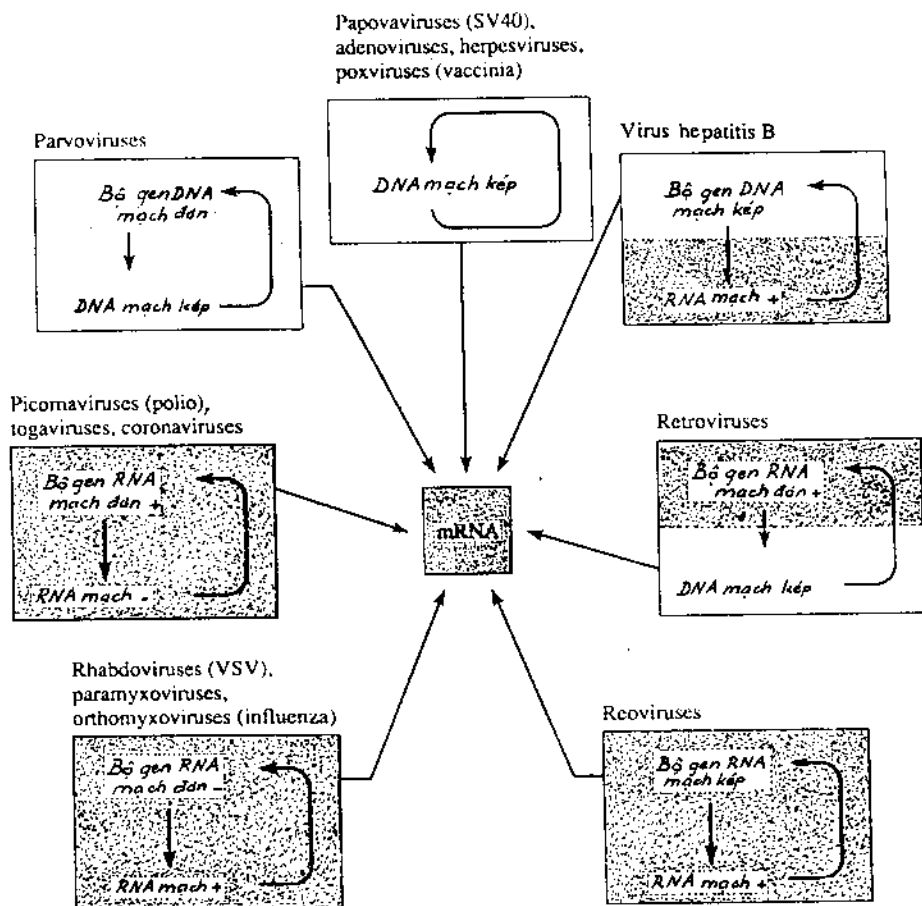
trong vỏ protein, không gắn vào bộ gen tế bào chủ và sao chép không qua trung gian DNA. Một số tế bào thực vật có enzyme sao chép RNA.

Các phân tử RNA của viroid bằng cách nào đó ngăn trở trao đổi chất của tế bào và làm ngừng tăng trưởng của cả thực vật. Một bệnh viroid khác làm hại đáng kể đến sản xuất hoa cúc ở Mi. Các viroid cũng tác hại đến khoai tây và cà chua.

Gần đây phát hiện rằng trình tự nucleotide của viroid giống với trình tự của intron của các gen *Eukaryotae*. Người ta cho rằng có lẽ các viroid bằng cách nào đó tác động lên các hệ thống điều hòa kiểm soát các gen của tế bào.

2. Các virus động vật

Chính xác các virus động vật thể hiện đầy đủ **sự đa dạng** của các bộ gen ở virus. Các virus động vật gây nhiều bệnh ở động vật và người, một số virus liên quan đến cả các bệnh ung thư, AIDS...



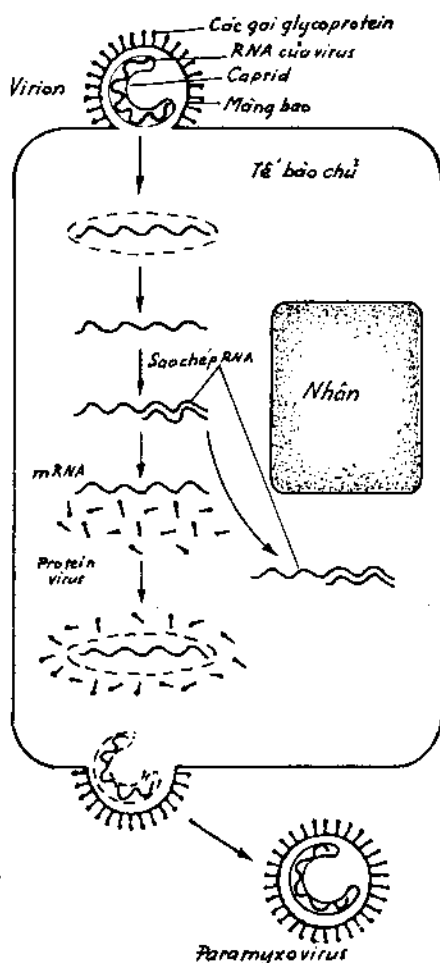
Hình 11.11. Sơ đồ phân loại các virus động vật dựa vào sự sao chép và nguồn gốc của mRNA.

a) Các nhóm virus động vật

Sự đa dạng rất lớn của các virus động vật thể hiện ở 15 - 20 họ khác nhau, căn cứ theo các đặc tính như : kiểu và cấu trúc của nucleic acid, hình thái virion và cách xác định thể kháng nguyên chung. Do sự phụ thuộc của các bộ gen virus vào mRNA của chúng, các virus động vật được chia thành 7 nhóm (hình 11.11).

b) Các chu trình sao chép của virus động vật

Các chu trình sao chép của virus động vật có nhiều điểm tương tự với các virus khác với nhiều biến dạng đáng kể. Ví dụ trường hợp của *paramyxovirus* gồm các virus gây bệnh sởi và quai bị. Các *paramyxovirus* có bộ gen là RNA một mạch được gói trong capsid xoắn dẹt. Phía bên ngoài capsid có màng bao là tính chất chung của nhiều nhóm virus động vật và phage. Bao màng giúp virus xâm nhập tế bào chủ. Khi virus tiếp xúc với tế bào, các glycoprotein thò ra ở màng bao gắn vào các thụ thể (receptor) trên màng sinh chất (hình 11.12). Quá trình này chuyển capsid có chứa RNA vào tế bào chất và ở đó capsid bị mất (bóc vỏ). Các enzyme của virus tham gia sao chép RNA của bộ gen và tạo mRNA, nhưng bộ máy của tế bào được sử dụng để tổng hợp protein của virus. Các capsid mới được lắp ráp bao các bộ gen của virus và chúng đội màng sinh chất của tế bào mọc chổi rồi thoát ra khỏi tế bào. Bằng cách này các capsid có màng bao chính là màng sinh chất của tế bào chủ cũ và các virion mới có thể sử dụng các bao màng này để hòa nhập với màng của tế bào chủ mới. Toàn bộ chu trình này



Hình 11.12. Chu trình sinh sản của paramyxovirus.

được gọi là **chu trình sinh sản** (reproductive cycle), chứ không phải chu trình tan vì các virus có thể thoát ra bằng mọc chồi mà không phải phá vỡ tế bào chủ.

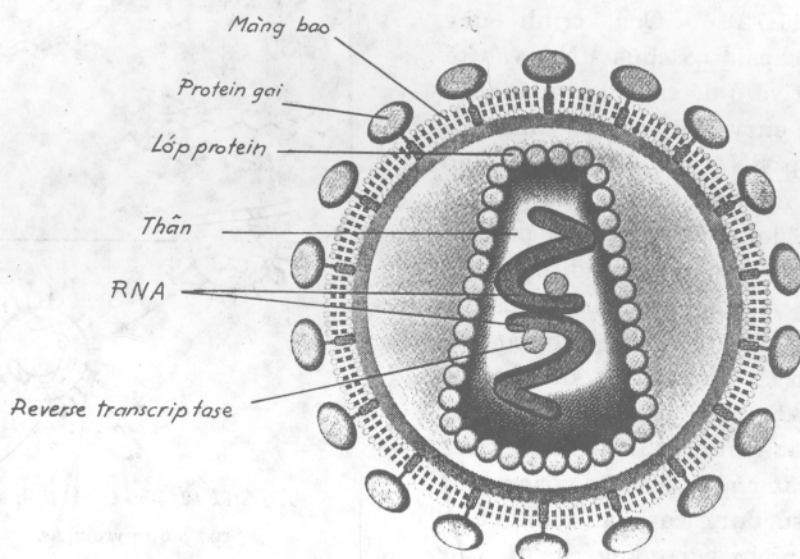
Không phải tất cả các màng của virus đều bắt nguồn từ màng sinh chất. Ví dụ, bao màng của *herpesvirus* từ màng nhân của tế bào chủ. Các bộ gen của *herpesvirus* là DNA mạch kép, chúng sinh sản bên trong nhân tế bào, sử dụng phối hợp cả enzyme của virus và tế bào để sao chép DNA và phiên mã.

Khi ở trong nhân của tế bào, DNA của *herpesvirus* (tiền virus) tương tự prophage ở vi khuẩn. Provirus ở dạng tiềm ẩn có thể gây một số triệu chứng bệnh ở người. Đôi khi các stress vật lí (như tác động ánh sáng mặt trời mạnh) hay tình cảm có thể làm cho *provirus herpes* bắt đầu chu trình sinh sản tạo các triệu chứng khó chịu cho con người.

c) Các retrovirus

Các nhà khoa học đã nhận thấy rằng một số virus có thể gây ung thư ở động vật và cả ở người. Các virus gây ung thư gồm: retrovirus, papovavirus, adenovirus và nhóm herpesvirus.

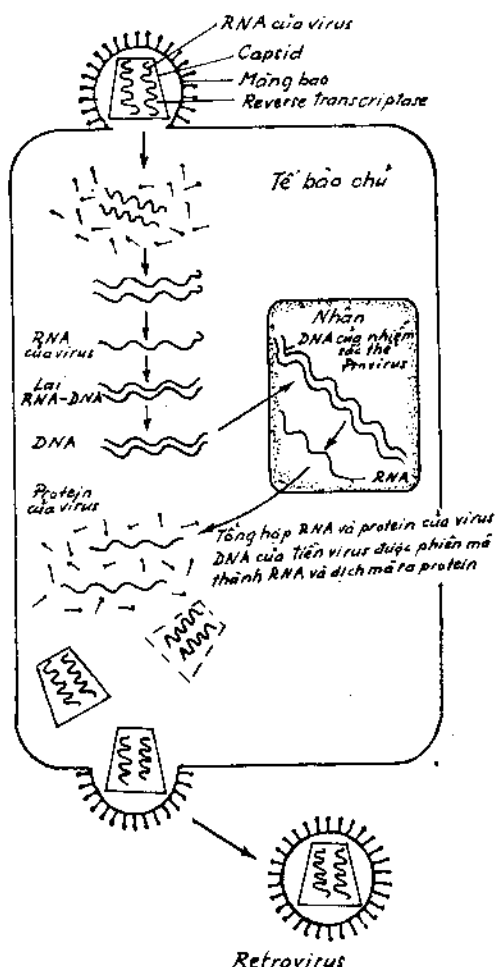
Có lẽ các virus gây ung thư quan trọng nhất là **retrovirus**, các virus có bộ gen RNA sinh sản qua trung gian là DNA. Một loại retrovirus được gọi là HTLV-I gây bệnh bạch cầu tế bào T (T-cell leucemia) và retrovirus HIV gây bệnh AIDS làm yếu hệ thống miễn dịch nên nhạy cảm với ung thư (hình 11.13).



Hình 11.13. Retrovirus HIV gây bệnh AIDS

Nói chung, retrovirus liên quan đến những bệnh nguy hiểm, khó chữa trị nhất hiện nay của nhân loại. Việc nghiên cứu các retrovirus giúp hiểu rõ các dạng ung thư.

Tất cả các virus biến đổi tế bào qua việc gắn nucleic acid của virus vào DNA của tế bào chủ. Sự gắn này được ổn định (các provirus không bao giờ bị cắt rời ra như prophage). Đối với các virus gây bệnh ung thư là DNA, sự gắn vào là quá trình trực tiếp. Các retrovirus thì khác, trước hết chúng sử dụng *reverse transcriptase* để từ khuôn RNA tạo ra DNA. Sau đó DNA của virus có thể được gắn vào DNA bộ gen của tế bào chủ và chúng cũng sao chép với bộ gen này trong mỗi thế hệ. Hình 11.14 mô tả và giải thích chu trình sinh sản retrovirus trong tế bào.



Hình 11.14. Chu trình sinh sản retrovirus trong tế bào

Hiện nay, nhiều người cho rằng các virus có thể tác động đến sự biểu hiện của các gen ung thư. Thường các virus gây ung thư phối hợp với những tác nhân khác trong gây bệnh.

Về nguồn gốc của các virus thì nhiều người cho rằng chúng bắt nguồn từ các đoạn nucleic acid được gói lại một cách chuyên biệt. Một số virus ở *Eukaryotae* giống về cấu trúc và chức năng so với một số gen của tế bào chủ hơn virus của vi khuẩn. Bộ gen của một số virus giống các phân tử di truyền của tế bào như plasmid hay transposon.

3. Các prion

Hai bệnh thoái hóa não ở người là bệnh kuru và Creutzfeldt-Jacob (bệnh tương tự ở cừu) có thể gây nên do các **phần tử protein gây nhiễm** được gọi là **prion** (proteinaceous infectious particle). Cho đến nay, sự hiểu biết về chúng còn rất ít. Gần đây, khi xuất hiện dịch bò điên ở Anh, chúng được nhắc tới nhiều vì không phát hiện thấy các virus.

Sinh học hiện đại đã phát hiện hai dạng có biểu hiện sống đặc biệt : **viroid** có nucleic acid, không có protein và **prion** có protein, không có nucleic acid.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các **đối tượng vi sinh vật** với nhiều ưu thế đã góp phần đáng kể cho sự phát triển của di truyền phân tử.

Các virus có cấu trúc **đơn giản**, nhưng với sự **đa dạng** của nhiều kiểu bộ gen. Sự **sao chép** của các bộ gen của virus tuy vẫn tuân theo nguyên tắc bán bảo tồn và bắt cặp bổ sung của các nucleotide, nhưng về chi tiết có nhiều điểm khác nhau với các sinh vật có cấu tạo tế bào.

Các **bacteriophage** có thể gây nhiễm vi khuẩn qua chu trình tan hoặc tiềm tan. Các **virus thực vật** đa phần là RNA một mạch đơn. **Viroid** là dạng đơn giản nhất gồm một đoạn RNA ngắn không có vỏ protein. Sự đa dạng của các virus thể hiện rõ ở các **virus động vật**, trong đó đáng chú ý nhóm **retrovirus** là nguyên nhân gây nên bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS.... Prion là dạng sống gồm protein và không có nucleic acid trong thành phần cấu tạo.

CÂU HỎI

1. Hãy kể các ưu thế của các đối tượng vi sinh vật trong nghiên cứu di truyền.
2. Các tính trạng nào được sử dụng nhiều trong di truyền học vi sinh vật?
3. Biến dị ở vi sinh vật có khác với sinh vật bậc cao không ? Vấn đề này được chứng minh như thế nào ?
4. Virus có các đặc điểm gì khác với những sinh vật khác ?
5. Sao chép bộ gen của virus khác với các sinh vật có cấu tạo tế bào như thế nào ?
6. Các bộ gen là nucleic acid mạch đơn sao chép như thế nào ?

7. Chu trình sống của phage có các đặc điểm gì ?
8. Virus thực vật có những nhóm nào ?
9. Nêu các đặc điểm chung của các virus động vật.
10. Kể các nhóm virus động vật căn cứ theo mối quan hệ với mRNA.
11. Sự giống nhau và khác nhau trong sao chép bộ gen của *paramyxovirus* và *retrovirus*.
12. Nêu tên các dạng sống chỉ có nucleic acid hoặc chỉ có protein.

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

1. Phage MS2 của *E.coli* có bộ gen là RNA mạch đơn. Sau khi nhiễm vào tế bào, mạch RNA(+) tạo dạng sao chép trung gian (mạch(+)-mạch(-)) và từ dạng này tổng hợp nên mạch(+). Mạch(-) khi tách ra không gây nhiễm.

Phage ϕ X174 của *E.coli* có bộ gen là DNA mạch đơn. Sau khi nhiễm vào tế bào, các sự kiện diễn ra như của phage MS2, nhưng mạch(-) tách ra gây nhiễm.

Nêu giả thuyết hợp lý giải thích các kết quả trên.

Lời giải

DNA(-) có thể làm khuôn và sử dụng DNA polymerase của vi khuẩn để sao chép. Mạch(-) của RNA không mã hóa cho enzyme sao chép RNA (RNA synthetase) và enzyme này không có ở vi khuẩn chưa bị nhiễm. Nếu có sự hiện diện của enzyme, sao chép có thể thực hiện qua dạng sao chép trung gian.

2. Để xác định số lượng tái tổ hợp giữa 2 đột biến ở vùng rII của phage T4, dòng B của *E.coli* được nhiễm kép bởi cả 2 dạng thể đột biến. Sự pha loãng $1/10^9$ được thực hiện với dịch tan vi khuẩn và cấy lên dòng B. Dịch pha loãng $1/10^7$ được cấy lên dòng K. Hai vết tan tìm thấy ở dòng K và 20 vết tan ở dòng B. Hãy tính tần số tái tổ hợp.

Lời giải

Để so sánh số lượng vết tan, cần chỉnh lý số pha loãng cho bằng nhau. Nếu ở pha loãng $1/10^9$ có 20 vết tan thì tương ứng với 20×100 ở pha loãng $1/10^7$.

$$\text{Số \% tái tổ hợp} = \frac{200 \times (\text{số vết tan trên K})}{\text{số vết tan trên B}} = \frac{200 \times 2}{20 \times 100} = 0,2\%$$

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Nuclease S1 làm đứt mạch kép ở điểm có hai base không bắt cặp (do bắt cặp lệch). Quan sát thấy rằng, nếu phân tử DNA phân lập từ dòng của phage được giữ giống ở Mỹ khi hồi tính với DNA của dòng phage tương tự về mặt di truyền so với dòng đầu nhưng giữ giống ở Pháp thì 1/2 DNA hồi tính bị cắt bởi nuclease. Giải thích quan sát trên.

2. Ở phage β của *E. coli*, một số đột biến của gen G của phage được bù đắp bởi đột biến ở gen H và một số đột biến ở gen H được bù đắp bởi đột biến ở gen G. Các sự kiện đó nói lên điều gì ?

3. Ở phage T4, gen a cách b 1 đơn vị bản đồ, b cách của 2 đơn vị. Thứ tự gen là a - b - của. Trong thí nghiệm tái tổ hợp, phát hiện thấy 5 trao đổi chéo đôi giữa a và của từ 100.000 virus con. Có thể nói chính xác rằng nhiễu (interference - xem ch. IV) là âm ? Giải thích kết quả.

DI TRUYỀN HỌC VI KHUẨN

Trong một thời gian dài, các nghiên cứu di truyền học được tiến hành ở các sinh vật nhân thực *Eukaryotae*, còn ở vi khuẩn thì chưa vì cho rằng không có sinh sản hữu tính. Tuy nhiên vào những năm 40, *tái tổ hợp* ở vi khuẩn được chứng minh. Những nghiên cứu về *biến nạp*, *tái nạp* và *giao nạp* có ý nghĩa quan trọng cho sự phát triển của di truyền học phân tử và góp phần xây dựng nên kĩ thuật lắp ghép gen.

Các sinh vật *Prokaryotae* như vi khuẩn, virus cũng có các quá trình sinh sản tương đương sinh sản hữu tính, được gọi là *cận hữu tính* (parasexuality). Sự di truyền nhờ các quá trình cận hữu tính này ở vi khuẩn có những đặc điểm:

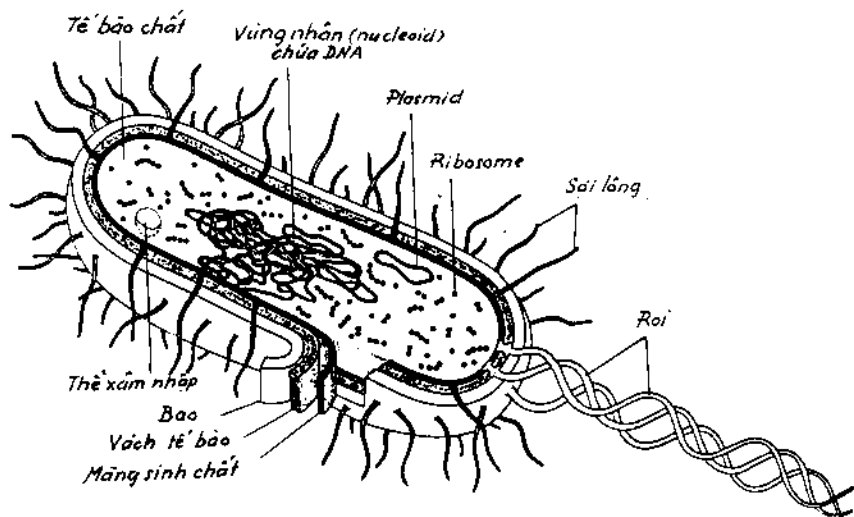
- Sự *truyền thông tin một chiều* từ tế bào *cho* (donor) sang tế bào *nhận* (recipient).
- Sự tạo thành *hợp tử từng phần* (merozygote). Tế bào (donor) chỉ chuyển một đoạn của bộ gen sang tế bào nhận (recipient) nên chỉ lưỡng bội ở một phần, các phần khác đơn bội.
- Bộ gen thường chỉ là một DNA trần nên chỉ có một nhóm liên kết gen và tái tổ hợp thực chất là *lai phân tử*.

I. SINH HỌC CỦA VI KHUẨN

Escherichia coli (*E.coli*) là vi khuẩn được nghiên cứu kĩ nhất; 3 dòng thường gặp trong các phòng thí nghiệm di truyền là *E.coli B* (tế bào chủ cho các phage dây T), *E.coli C* (tế bào chủ cho phage một mạch như ϕ X 174) và *E.coli K12* (tế bào chủ của phage λ).

1. Cấu tạo tế bào và sinh sản

Cấu tạo của tế bào vi khuẩn được mô tả trên hình 12.1. Tế bào *Escherichia coli* có chiều dài khoảng 2 micrometer. Bên ngoài có vách tế bào, kế trong là màng sinh chất. *Mesosome* là cấu trúc xếp lại của màng sinh chất có thể liên quan đến phân bào chất di truyền tạo nên *nucleoid*. Các tiêm mao giúp cho sự vận động của tế bào.



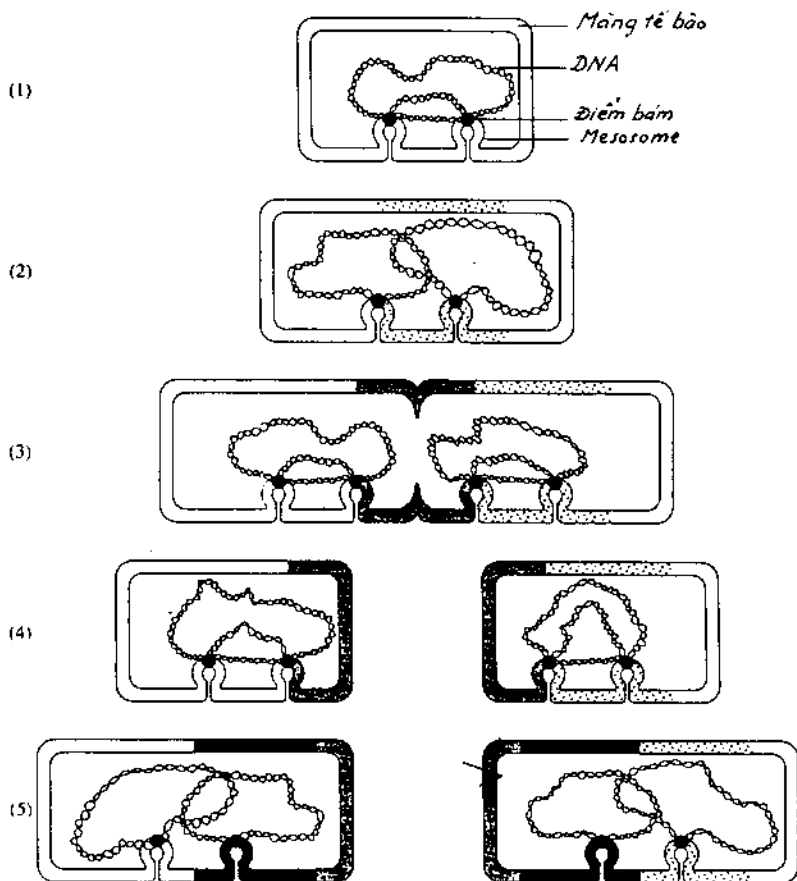
Hình 12.1. Tế bào vi khuẩn

Thông tin của tế bào vi khuẩn nằm trên một phân tử **DNA mạch kép, vòng tròn đơn**, được gọi là **genophore**, hay "**nhễm sắc thể**". Gần đây đã phát hiện thấy rằng ít nhất ở một số vi khuẩn DNA được tạo thành phức hợp với protein có tính base để hình thành sợi nhiễm sắc như histone ở nhiễm sắc thể *Eukaryotae*. Ngoài ra, một số vi khuẩn còn có thêm **plasmid** là phân tử DNA vòng tròn nhỏ có khả năng sao chép độc lập.

Tế bào vi khuẩn phân chia theo lối **trực phân**. Phân tử DNA gắn trực tiếp vào màng sinh chất. Sự sao chép DNA tạo ra hai bản sao gắn chung nhau trên màng sinh chất (hình 12.2). Khi tế bào kéo dài ra, các bản sao DNA tách xa nhau do phần màng giữ chúng lớn dần ra. Kiểu sinh sản vô tính này được gọi là "**ngắt đôi**" ("**binary fission**"). Tế bào vi khuẩn chia nhanh (20 phút trong điều kiện tốt) hơn rất nhiều so với tế bào *Eukaryotae* (24-48 giờ).

Quá trình sao chép DNA được bắt đầu từ **điểm xuất phát ori** kéo dài về hai phía song song với quá trình sao chép màng sinh chất, nơi có điểm gắn vào của DNA bộ gen, mọc dài tách 2 phân tử DNA về 2 tế bào con.

DNA của *E.coli* cần 40 phút cho 1 vòng sao chép tương ứng với tốc độ 50.000 cặp base/phút. Phụ thuộc vào tốc độ tăng trưởng, thời gian phân chia tế bào trong khoảng từ 18 đến 60 phút. Như vậy ở các tế bào tăng trưởng nhanh, **vòng sao chép mới** phải được bắt đầu sớm hơn sự phân bào trước đó như tế bào con đầu tiên trên hình 12.2.



Hình 12.2. Sự sinh sản vô tính ngắt đôi của vi khuẩn

1. Tế bào con có DNA sao chép một phần.
2. Sao chép vừa xong 2 điểm gắn DNA vào màng được tách đôi.
3. Giai đoạn cuối phân bào.
4. Hai tế bào con.
5. Chu trình lặp lại.

2. Đặc điểm nuôi cấy

Tế bào vi khuẩn có thể nuôi trên môi trường lỏng có bổ sung hỗn hợp các muối vô cơ thiết yếu. Mật độ có thể đạt 10^9 tế bào/ml. Có thể nuôi vi khuẩn trong môi trường rắn agar trong các hộp petri để từng tế bào mọc thành khuẩn lạc để quan sát.

Tế bào vi khuẩn có nhiều dạng khác nhau: *bacilli* (hình que), *cocci* (hình cầu), *spirilla* (hình xoắn), *spirochete* (hình xoắn ốc) và phân nhánh. Tế bào vi khuẩn rất nhỏ nên ít khi từng tế bào riêng lẻ được nghiên cứu di truyền. Vi khuẩn có thể mọc trên môi trường tối thiểu gồm carbon và nguồn năng lượng (glucose), một ít muối vô cơ và nước. Môi trường chứa đủ các chất

hữu cơ làm nguồn dinh dưỡng (amino acid, nucleotide, các vitamin...) gọi là môi trường đầy đủ.

3. Kiểu hình và kiểu gen của vi khuẩn

Các đột biến có thể tác động đến 5 loại kiểu hình :

- Biến đổi từ *nguyên dưỡng* (prototrophy) sang *khuyết dưỡng* (auxotrophy) và ngược lại. Ví dụ : mất khả năng tổng hợp một chất trao đổi của chu trình và hồi biến để lại có khả năng tổng hợp chất đó.

- Sự mất hay có được khả năng sử dụng chất dinh dưỡng khác. Ví dụ: đột biến làm mất khả năng sử dụng đường lactose.

- *Tính nhạy cảm* hay *đề kháng thuốc* như nhạy cảm streptomycin đột biến thành kháng streptomycin.

- *Nhạy cảm* với phage thành *kháng phage* hoặc ngược lại. Ví dụ : đột biến trên thụ thể ở bề mặt tế bào làm đề kháng với sự nhiễm phage.

- Sự mất đi hoặc có lại các thành phần cấu trúc của bề mặt tế bào. Ví dụ, một loại *Pneumococcus* có vỏ bao polysaccharide (polysaccharide capsule), trong khi đó dòng khác không có vỏ bao.

Các kí hiệu dùng biểu hiện kiểu hình và kiểu gen được thống nhất theo nguyên tắc :

- *Kí hiệu kiểu hình* gồm 3 *chữ thường* (chữ đầu viết hoa) với dấu phía trên góc "+" hay "-" nhằm chỉ sự hiện diện hay thiếu tình trạng tương ứng, và "s" hay "r" tương ứng chỉ tính nhạy cảm (sensitive) hay đề kháng (resistance).

- *Kí hiệu kiểu gen* được viết *chữ nghiêng*, chữ đầu không viết hoa.

Ví dụ 1 : Tế bào hoang dại tự tổng hợp được leucine thì kiểu hình được viết Leu^+ . Đột biến khuyết dưỡng mất khả năng tổng hợp leucine được kí hiệu kiểu hình Leu^- .

Tương ứng với hai kiểu hình trên kí hiệu kiểu gen là leu^+ hay leu và leu^- .

Nếu cần nhiều hơn một gen để tạo ra một chất nhất định, sau 3 chữ nghiêng kí hiệu có thêm chữ nghiêng hoa. Ví dụ: $leuA$, $leuB$... là các gen cần thiết cho tổng hợp leucine khác nhau.

Ví dụ 2 : Kiểu hình kháng hoặc nhạy cảm với penicilline được viết là Pen^r và Pen^s . Kiểu gen tương ứng là pen^r và pen^s .

Nếu lưỡng bội ở một phần thì viết thêm gạch nghiêng. Ví dụ, leu^+/leu^- .

II. BIẾN NẠP (TRANSFORMATION)

1. Hiện tượng và điều kiện

Biến nạp là hiện tượng truyền thông tin di truyền bằng DNA (xem chương V, phần chứng minh DNA là vật chất di truyền). Trong biến nạp, **DNA trần** từ một tế bào vi khuẩn (**thể cho**) này được truyền sang tế bào vi khuẩn khác (**thể nhận**). Khi tế bào vi khuẩn bị vỡ do làm tan (lysis), DNA vòng tròn của chúng thoát ra môi trường thành các đoạn thẳng với chiều dài khác nhau, có khả năng gây biến nạp cho các tế bào nhận khác.

Biến nạp được nghiên cứu kĩ nhất ở các vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* và ở một số nhóm vi khuẩn khác.

Hiệu quả của biến nạp phụ thuộc vào 3 yếu tố :

- Tính dung nạp của tế bào nhận.
- Kích thước của đoạn DNA.
- Nồng độ của DNA

a) Tính dung nạp của tế bào nhận

Một điều quan trọng của biến nạp là **tế bào nhận** phải có trạng thái sinh lí đặc biệt được gọi là **khả năng dung nạp (competence)**. Có thể gây ra sự dung nạp bằng cách tạo những điều kiện nhất định cho sự tăng trưởng của tế bào. Những tế bào dung nạp trên bề mặt có các **nhân tố dung nạp (competence factor)**. Chúng đã được tinh sạch một phần và nghiên cứu ở nhiều loại vi khuẩn. Ở *Streptococcus* (trước đây gọi là *Diplococcus*) *pneumoniae* đã trở thành dung nạp có 30 đến 80 điểm nhận trên tế bào có khả năng gắn với DNA mạch kép hầu như của bất kì nguồn nào. Mặt khác, *Haemophilus influenzae* có một số lượng hạn chế từ 4 đến 8 điểm nhận (receptors), mà những điểm nhận này trước tiên nhận biết DNA mạch kép có các cặp base trình tự như sau: 5'AAGTGCAGTCA-3' được gọi là "**điểm hấp thụ**" (uptake site). Sự kiện là các điểm hấp thụ này đặc biệt chung ở DNA của *Haemophilus* (trên bộ gen có khoảng 600 điểm như vậy) và tương đối hiếm ở DNA của các loài khác đã giải thích vì sao *Haemophilus* chỉ biến nạp giới hạn với các vi khuẩn trong loài.

Phần lớn các vi khuẩn chỉ dung nạp trong một giai đoạn giới hạn của chu trình sống. Trong giai đoạn dung nạp, tế bào tổng hợp một hay nhiều protein được gọi là "các nhân tố dung nạp", chúng biến đổi màng tế bào để có thể gắn với đoạn DNA ngoại lai. Như vậy, các điểm thụ thể chỉ hiện diện trong giai đoạn dung nạp.

b) Kích thước và nồng độ DNA

Điều kiện quan trọng thứ hai để thực hiện được biến nạp là DNA phải có **mạch kép** và đoạn biến nạp phải có trọng lượng phân tử tối thiểu là 400.000 dalton (lớn khoảng 1/200 bộ gen của vi khuẩn), dĩ nhiên đây không phải là giới hạn cao nhất. Số lượng tế bào được biến nạp (transformants - thể biến nạp) tăng tỉ lệ thuận với nồng độ của DNA cho đến lúc mà các điểm thụ thể (receptor sites) bão hòa do các đoạn DNA gắn vào (thường khoảng 10 đoạn / tế bào). DNA được hấp thụ vào tế bào và bị enzyme cắt làm giảm trọng lượng phân tử.

c) Đoạn ngoại lai và đoạn nội tại

Khi DNA mạch kép xâm nhập vào tế bào, một mạch bị phân hủy. Bất kì đoạn DNA nào từ tế bào cho xâm nhập tế bào nhận, được gọi là **đoạn ngoại lai** (exogenote), DNA nguyên vẹn của tế bào nhận gọi là **đoạn nội tại** (endogenote). Tế bào vi khuẩn nhận đoạn ngoại lai sẽ lưỡng bội ở một phần bộ gen, được gọi là **hợp tử từng phần** (merozygote). Tuy nhiên, đoạn ngoại lai mạch đơn không bền vững và bị phân hủy nếu không được gắn vào bộ gen thể nhận. Quá trình trao đổi thông tin di truyền bằng chuyển chỉ một phần vật liệu di truyền từ tế bào này sang tế bào khác được gọi là sự **giao nạp từng phần** (meromixis). Có người cho rằng đoạn ngoại lai đơn mạch được gắn với protein (như protein Rec-A ở *E. coli*), protein này hỗ trợ tìm vùng bổ sung trên đoạn nội tại, làm đứt mạch và gắn đoạn ngoại lai. Các enzyme sẽ cắt các đầu tự do (của cả thể cho và thể nhận) và ligase hàn kín lỗ trống. Khi đoạn ngoại lai đã gắn vào đoạn nội tại thì tế bào không còn là hợp tử từng phần nữa.

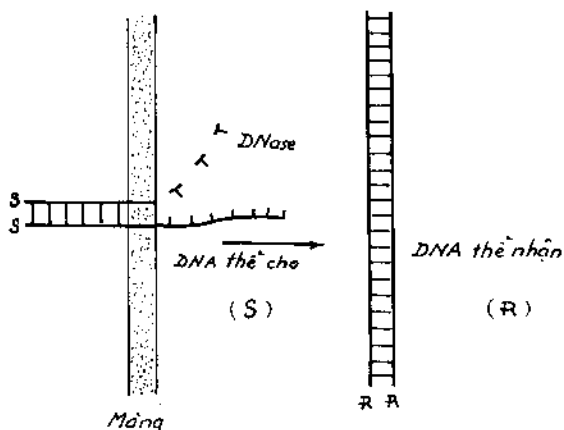
Nếu đoạn ngoại lai chứa một allele với đoạn nội tại, thì mạch kép tái tổ hợp sẽ có một hay nhiều chỗ **bất cặp sai** (mismatch base pairs) và đoạn DNA này được gọi là **heteroduplex**. Nếu các tế bào con nhận allele mới, mismatch repair được thực hiện bằng cách cắt đoạn nội tại và dùng mạch ngoại lai làm khuôn để thay thế. Sự gắn đoạn ngoại lai vào DNA tế bào nhận được thực hiện nhờ **tái tổ hợp tương đồng** (xem sau).

Hai hoặc nhiều hơn các gen liên kết chặt có thể nằm trong đoạn DNA biến nạp. Nếu sự xâm nhập của hai hay nhiều hơn các gen vào đoạn nội tại, thì tế bào nhận sẽ được **đồng biến nạp** (cotransformed). Tần số của đồng biến nạp tỉ lệ nghịch tương ứng với khoảng cách giữa các gen cùng biến nạp.

2. Cơ chế phân tử

a) Thâm nhập của DNA

Sợi DNA mạch kép của dòng vi khuẩn S sau khi chui qua màng tế bào của dòng R thì một mạch S sẽ bị *nuclease* của tế bào cắt, còn lại một mạch nguyên (hình 12.3).



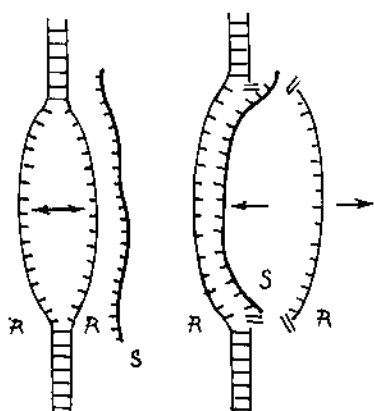
Hình 12.3. DNA thâm nhập vào tế bào

b. Bắt cặp (Synapsis)

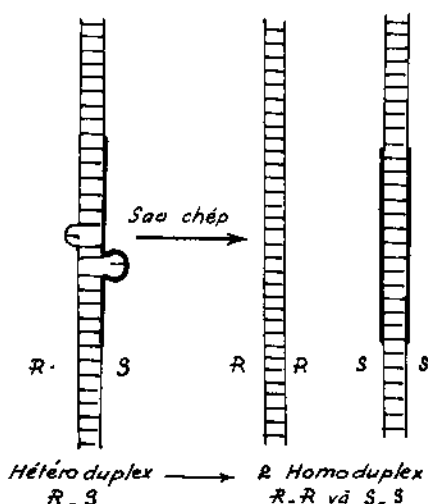
DNA của thể nhận R sẽ biến tính tách rời 2 mạch ở 1 đoạn để bắt cặp với đoạn DNA thể cho S vừa chui vào (hình 12.4)

c) Sao chép

Sau khi bắt cặp tạo đoạn lai R - S, phân tử DNA sao chép tạo ra 2 sợi, một sợi kép R-R và sợi kép khác có mang đoạn DNA thể nhận S-S (hình 12.5).



Hình 12.4. DNA thâm nhập (S) bắt cặp với DNA thể nhận (R)



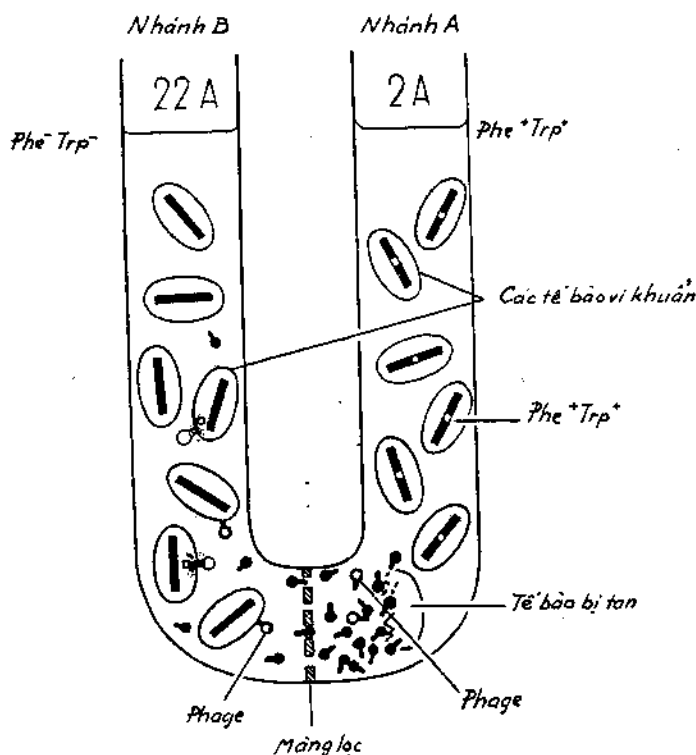
Hình 12.5. DNA lai R-S sao chép tạo ra 2 sợi : một sợi kép R và sợi kép có mang đoạn S.

III. TẢI NẠP (TRANSDUCTION)

Việc tìm ra biến nạp đã thúc đẩy nghiên cứu dẫn đến phát minh ra tải nạp, là hiện tượng truyền DNA qua *trung gian virus* từ tế bào cho đến tế bào nhận. Có hai kiểu tải nạp : chung và chuyên biệt.

1. Phage là nhân tố chuyển gen

Thí nghiệm được tiến hành trong ống hình chữ U, ở đáy ống được ngăn cách bằng màng lọc vi khuẩn. Màng có lỗ nhỏ vi khuẩn không qua được, nhưng phage qua được (hình 12.6). Nhánh A của ống chứa vi khuẩn có khả năng tổng hợp tryptophan (trp^+), còn nhánh B nuôi các vi khuẩn mất khả năng tổng hợp tryptophan (trp^-). Sau một thời gian nuôi bên nhánh B xuất hiện vi khuẩn có khả năng tổng hợp tryptophan (trp^+). Qua nhiều lần thí nghiệm việc phage tải gen trp^+ từ nhánh A sang nhánh B được chứng minh.



Hình 12.6. Thí nghiệm chứng minh hiện tượng tải nạp

2. Tải nạp chung (*General transduction*)

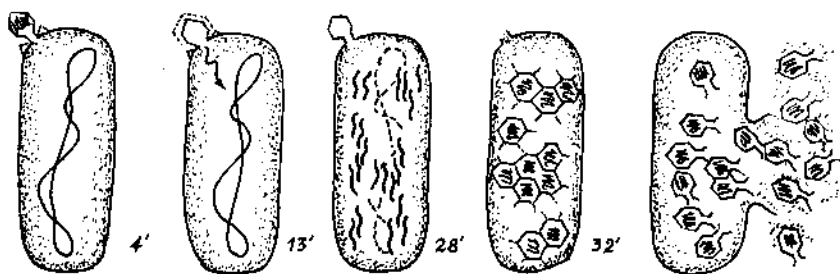
Tải nạp chung xảy ra khi phage mang **bất kì gen nào** của vi khuẩn A sang vi khuẩn B.

Tải nạp chung (generalized transduction) có các đặc điểm :

- Thường do **phage kiểu P1** thực hiện.
- **Bất kì gen nào** của vi khuẩn cũng đều được tải nạp.
- Tải nạp có được do **gói nhầm DNA** của tế bào chủ khi phage trưởng thành.
- Các **thể tái tổ hợp đơn bội** được tạo ra.

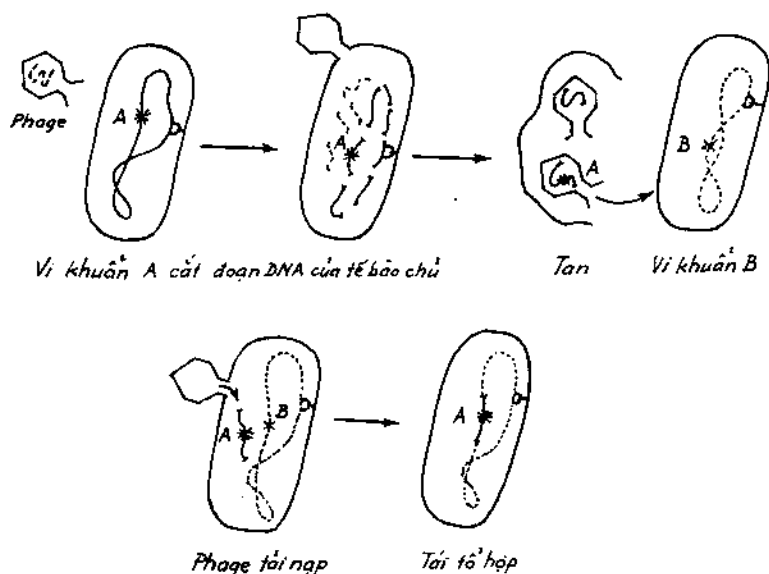
Do không có sự tương đồng giữa trình tự DNA trên các phage này với trình tự ở tế bào chủ, nên không có điểm gắn vào đặc hiệu cho prophage. Bất kì gen nào cũng được tải nạp vì đầu của phage có thể gói nhầm vào một đoạn DNA của tế bào chủ. Sự **đồng tải nạp** (cotransduction) là quá trình tải nạp đồng thời 2 gen.

Quá trình phage xâm nhập vào vi khuẩn và sinh sản được mô tả trên hình 12.7. Đầu tiên phage bám trên bề mặt của vi khuẩn, sau 4 phút bơm DNA của nó vào tế bào, sau đó chúng sinh sản và độ nửa giờ sau thì **làm tan** vi khuẩn và giải phóng các phage con mới.



Hình 12.7. Quá trình xâm nhập của phage và làm tan vi khuẩn

Khi DNA của phage xâm nhập tế bào vi khuẩn A, chúng cắt DNA của vi khuẩn A thành nhiều đoạn, đồng thời DNA của phage được sao chép thành nhiều phân tử con và các vỏ của phage cũng được tạo thành. Sau đó các vỏ được lắp ruột DNA vào, phá vỡ tế bào vi khuẩn ra ngoài và tiếp tục xâm nhập các vi khuẩn mới. Trong quá trình lắp ráp khoảng 1-2% phage vô tình mang đoạn DNA của vi khuẩn có chứa gen. Phage mang gen của vi khuẩn A xâm nhập vi khuẩn B, quá trình tái tổ hợp xảy ra làm gen A gắn vào bộ gen B (hình 12.8).



Hình 12.8. Tải nạp : chuyển gen từ vi khuẩn A sang B nhờ phage

3. Tải nạp chuyên biệt (*Special transduction*)

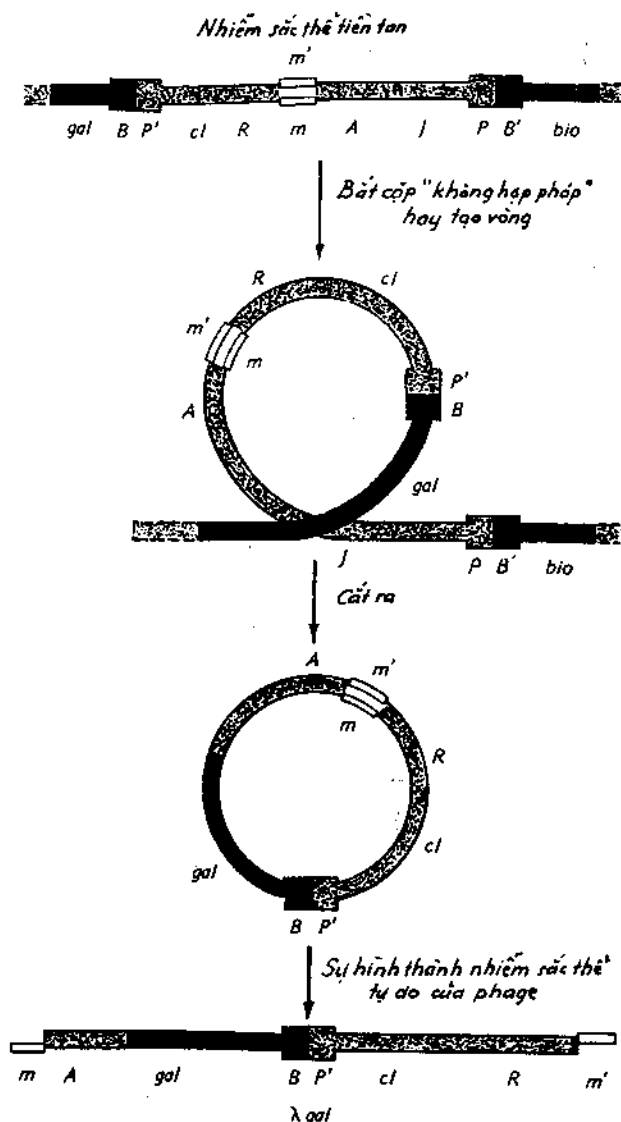
Tải nạp chuyên biệt hay **hạn chế** (restricted transduction) là trường hợp chỉ mang **một vài gen nhất định**, nó có 4 đặc điểm :

- Những **gen** được chuyển nằm **sát chỗ prophage** gắn vào.
- Chỉ **prophage kiểu λ** thực hiện.
- Do kết quả sự **cắt sai của prophage** khi tách khỏi nhiễm sắc thể của tế bào chủ.
- Các vi khuẩn tái tổ hợp có thể **lưỡng bội một phần**.

Ví dụ : Phage λ chỉ mang gen **gal** (đồng hóa đường galactose) từ vi khuẩn này chuyển sang vi khuẩn khác.

Điểm gắn của phage λ vào bộ gen của vi khuẩn nằm giữa 2 gen **gal** (galactose) và **bio** (tổng hợp biotin) (hình 12.9). Đầu của phage chỉ có thể chứa một lượng DNA giới hạn, nên khi prophage tách ra từ DNA của vi khuẩn, nó chỉ tái nạp được gen **gal** hoặc **bio**. Phage λ tái nạp các gen galactose được gọi là **λgal** hay **λdg** (d = defective : khuyết, g = galactose). Nếu tế bào **gal⁻** được nhiễm bởi **λdg** (mang gen **gal⁺**), sự ráp vào của phage biến dạng vào tế bào chủ sẽ tạo **lưỡng bội một phần**. Sự **cắt sai** của phage λ rất hiếm nên tải nạp hạn chế có **tần số thấp**. Tuy nhiên, tải nạp tần số cao có thể nhận được trong điều kiện thí nghiệm. Nếu tế bào vi khuẩn được gây

nhằm kép với phage λ hoang dại và phage λdg , phage hoang dại có thể hỗ trợ chức năng sai sót ở phage biến dạng, và thế hệ con sẽ có cả 2 kiểu với số lượng bằng nhau. Khi dịch tan được dùng tải nạp, quá trình được gọi là *tải nạp tần số cao* (high-frequency transduction).



Hình 12.9. Điểm gắn của phage λ vào bộ gen của vi khuẩn

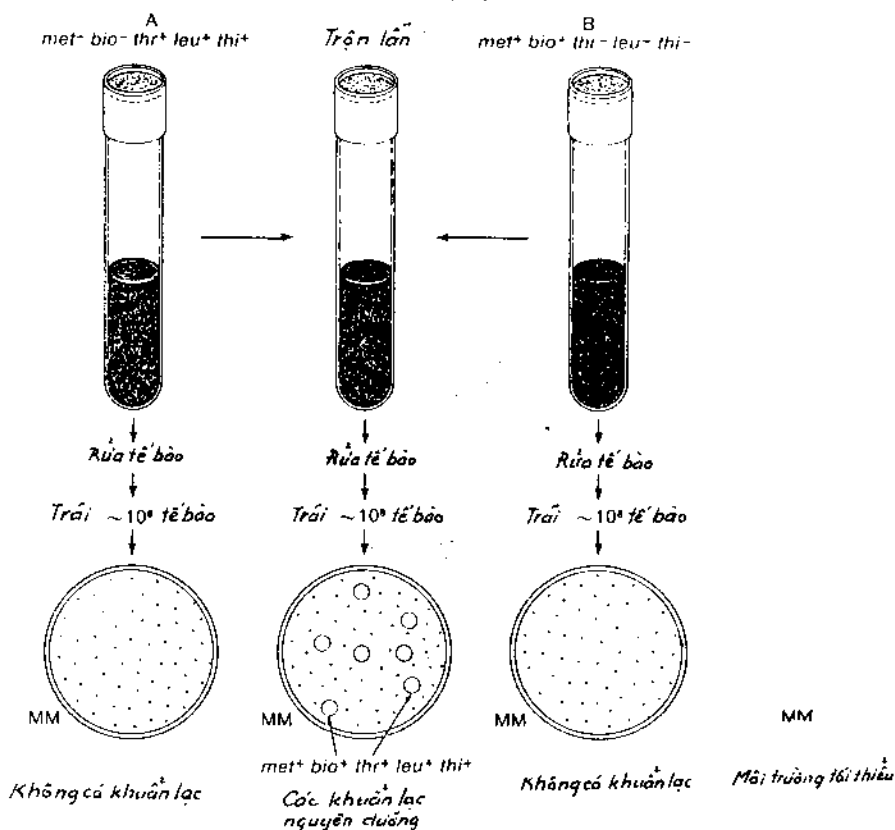
Trong nhiều trường hợp, do bộ gen biến dạng λdg không gắn được vào bộ gen của tế bào chủ (nên không sao chép được). Sau mỗi lần phân bào, chỉ một trong 2 tế bào có bộ gen của phage biến dạng; quá trình này được gọi là *tải nạp sảy* (abortive transduction).

IV. GIAO NẠP (CONJUGATION)

Giao nạp ở vi khuẩn là sự **kết hợp nhất thời** của hai tế bào có kiểu bất cặp đối nhau, được tiếp nối bằng sự chuyển một phần vật chất di truyền từ tế bào cho sang tế bào nhận qua cầu tế bào chất, và sau đó các tế bào tách nhau ra (exconjugants). Kiểu **sao chép sigma** (σ) được tế bào vi khuẩn sử dụng trong giao nạp để truyền phân tử DNA dạng thẳng sang tế bào khác. Về thuật ngữ, nhiều tác giả dùng **"tiếp hợp"** để chỉ quá trình này, theo chúng tôi, dùng **"giao nạp"** (Nguyễn Lộc - Trịnh Bá Hữu, 1975) tốt hơn, vì phản ánh được bản chất của quá trình, nhất quán với biến nạp, tải nạp ở vi khuẩn và khỏi nhầm lẫn với tiếp hợp của nhiễm sắc thể.

1. Chứng minh có hiện tượng lai ở vi khuẩn

Vào năm 1946, J.Lederberg và E.Tatum đã sử dụng các dòng **đột biến khuyết dưỡng** khác nhau ở *E.coli* để chứng minh có tái tổ hợp giữa các dòng vi khuẩn khác nhau. Cụ thể dòng A có kiểu gen $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$ (có khả năng tổng hợp threonin, leucine và vitamin B₁ (thiamin) và không tổng hợp được methionin và biotin), còn ở dạng B thì ngược lại có kiểu gen



Hình 12.10. Sơ đồ lai vi khuẩn

met⁺bio⁺thr⁺leu⁻thi⁻ (có khả năng tổng hợp methionin và biotin). Trộn A và B trong ống nghiệm, sau đó cấy lên một môi trường tối thiểu. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường tối thiểu chứng tỏ có các dạng lai, chúng chỉ mọc lên được nhờ sự bù đắp cho nhau các nhu cầu dinh dưỡng. Dạng lai có kiểu gen *met⁺bio⁺thr⁺leu⁺thi⁺*. Trong khi đó từng dạng A hoặc dạng B riêng lẻ không mọc được trên môi trường tối thiểu (hình 12.10).

2. Sự phân hóa giới tính ở vi khuẩn

Năm 1953, Hayes đã phát hiện ở vi khuẩn có các dạng khác nhau tương tự giống đực và cái ở sinh vật bậc cao. Các dạng đó được kí hiệu F^+ và F^- (từ chữ Fertility - hữu thụ). F^+ tương tự giống đực có ở sinh vật bậc cao, nó truyền gen sang F^- . Tần số lai $F^+ \times F^-$ khoảng 10^{-6} tức lai 1 triệu tế bào sẽ có 1 tế bào lai.

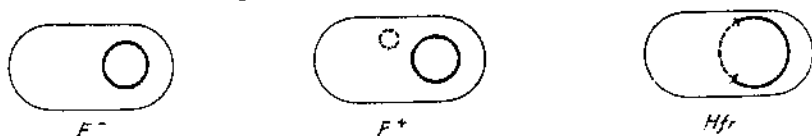
a) Episome và plasmid

Khi tiếp xúc với F^+ một thời gian tế bào F^- trở thành F^+ . Về sau dạng *Hfr* (High frequency of recombination) được phát hiện, dạng này có tần số lai với F^- cao hơn F^+ có thể đến 10^4 lần.

Khi F^+ tiếp xúc với F^- một thời gian, F^- biến thành F^+ do nó nhận được một phần tử di truyền gọi là *episome*. *Episome F^+* là phần tử di truyền ngoài nhiễm sắc thể, có thể tồn tại hoặc ở dạng phân tử DNA vòng tròn *tự sao chép* hoặc gắn vào từng phân tử DNA của tế bào chủ (ví dụ, *phage λ* ...). *Episome F^+* được gọi là *nhân tố giới tính* (sex-factor).

Plasmid lúc đầu được định nghĩa là phân tử DNA vòng tròn nhỏ có khả năng sao chép độc lập với nhiễm sắc thể tế bào chủ và không có khả năng gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ. Plasmid có thể mang một số gen khác nhau như đề kháng thuốc (ví dụ, *plasmid R* đề kháng nhiều thuốc kháng sinh),... Hiện nay "*plasmid*" được dùng cho cả hai nghĩa là *episome* lẫn *plasmid*. Các plasmid có thể tồn tại độc lập hoặc gắn vào bộ gen vi khuẩn. Về sau người ta phát hiện ở vi khuẩn còn có nhiều plasmid khác. Bản chất di truyền của các dòng F^- , F^+ và *Hfr* được xác định do các plasmid như sau (hình 12) :

- F^- không chứa plasmid.
- F^+ chứa plasmid ở dạng độc lập.
- *Hfr* - plasmid được gắn vào bộ gen vi khuẩn.



Hình 12. 11. Kiểu gen của F^- , F^+ và *Hfr*

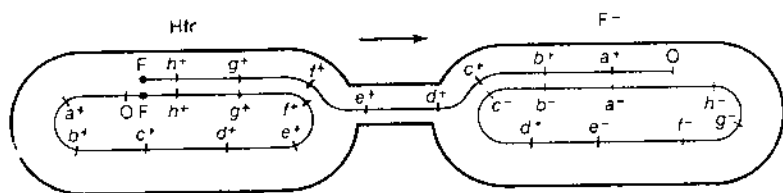
b) Các nhân tố F' và tính nạp (sexduction)

Sự cắt rời nhân tố F từ nhiễm sắc thể của dòng Hfr nhiều khi không chính xác và lúc đó một đoạn bộ gen của vi khuẩn thay thế một phần của F. Trong trường hợp này, **nhân tố F'** được tạo thành và nó có khả năng chuyển gen của vi khuẩn một cách độc lập, nhưng với các tính trạng của tế bào cho. Hiện tượng này được gọi là **tính nạp** (sexduction), có nghĩa là sự chuyển gen kèm theo nhân tố giới tính. Nhờ tính nạp có thể nhận được các thể **lưỡng bội từng phần** (merodiploid) theo các gen được gắn vào F'. Do vậy, có thể nghiên cứu mối **tương quan allele** và các hiệu quả do sự gia tăng **liều lượng gen** ở vi khuẩn.

3. Tái tổ hợp

Muốn xảy ra tái tổ hợp thì 2 dòng vi khuẩn phải tiếp xúc với nhau ($F^+ \times F^-$) hoặc ($Hfr \times F^-$). Dòng tế bào mang nhân tố F' được coi là tế bào đực và có khả năng tạo protein **pilin**, từ protein này tạo **ống giao nạp** gọi là **pilus**. Sự co lại của pilus đang nối hai tế bào làm chúng tiếp xúc gần nhau. Tế bào F' được coi là cái (female). Sau khi giao nạp tế bào F' trở thành F'.

Việc chuyển gen chỉ thực hiện khi **plasmid gắn vào bộ gen của vi khuẩn**. Trong quá trình chuyển vật chất di truyền sang F' thì DNA của tế bào chủ sao chép và mạch mới có **ori** đi đầu và F' ở cuối (hình 12.12). Quá trình chuyển DNA từ F' sang F' có thể bị ngắt quãng. Các gen a, b, c được chuyển một chiều từ Hfr sang F'.



Hình 12.12. Sự truyền DNA từ thể cho sang thể nhận

Dòng Hfr có tần số lai cao hơn nhiều vì plasmid đã nằm sẵn trong bộ gen. Còn F' phải qua giai đoạn plasmid gắn vào bộ gen rồi mới chuyển gen.

Trong điều kiện thí nghiệm ở 37°C, nguyên bộ gen của tế bào *E. coli* được chuyển sang tế bào nhận trong vòng 90 phút. Thường sự giao nạp bị ngắt giữa chừng do các **pilus** bị gãy, nên ít khi bộ gen được chuyển nguyên vẹn vào tế bào nhận. Lúc đó tế bào F' vẫn là F'. Bằng cách ngắt quãng quá trình giao nạp mà bản đồ di truyền của *E. coli* được xây dựng nên có dạng 1 vòng tròn.

V. LẬP BẢN ĐỒ DI TRUYỀN NHIỄM SẮC THỂ CỦA VI KHUẨN

1. Giao nạp ngắt quãng (*Interrupted conjugation*)

Khi trộn dịch tế bào Hfr với F^- , sự tiếp hợp có thể bị ngắt quãng vào thời điểm tùy ý bằng rung lắc mạnh. Mẫu được pha loãng nhanh và cấy lên môi trường chọn lọc. Ngoài ra, dòng Hfr phải có gen đánh dấu hay khuyết dưỡng để chúng không mọc được trên môi trường chọn lọc và chỉ có các dạng tái tổ hợp mọc lên. Sự truyền DNA của Hfr sang F^- có tính phân cực, các gen ở đầu sang trước và lần lượt các gen khác theo sau. Nhờ ngắt quãng có thể xác định được thời gian mà một gen được truyền sang F^- và khoảng cách giữa chúng.

Ví dụ, dòng Hfr có mang các gen nguyên dưỡng (prototrophic) đánh dấu a^+ , b^+ , c^+ được trộn với dòng F^- mang các allele khuyết dưỡng a, b, c . Sự tiếp hợp được ngắt quãng với khoảng cách 5 phút và pha loãng cấy lên môi trường chọn lọc (ví dụ, môi trường tối thiểu). Kết quả như sau :

Thời gian (phút)	Các thể tái tổ hợp
5	$a^+ b^+ c$
10	$a^+ b^+ c^+$
15	$a^+ b^+ c^+$

Trình tự gen ở dòng Hfr là $b^+ - c^+ - a^+$; b cách đầu mút truyền sang ít hơn 5 phút; c ít hơn 10 phút ; a ít hơn 15 phút . Ở đây đơn vị thời gian là phút.

2- Giao nạp không ngắt quãng (*Uninterrupted conjugation*)

Nếu không rung mạnh để ngắt quãng nhân tạo, cầu tế bào chất giữa hai gen càng gần ori (ở đầu của DNA thể cho), xác suất được chuyển sang tế bào nhận càng lớn. Tần số của các gen xuất hiện ở dạng tái tổ hợp trong thể nhận, được phát hiện trên môi trường chọn lọc, tỉ lệ nghịch với khoảng cách so với gen đánh dấu ở đầu. Các gen có nhiều dạng tái tổ hợp xuất hiện thì càng nằm gần phía đầu được chuyển sang tế bào nhận.

Khoảng cách giữa các gen có thể tính bằng 3 loại đơn vị: đơn vị thời gian, đơn vị tái tổ hợp và đơn vị cặp base.

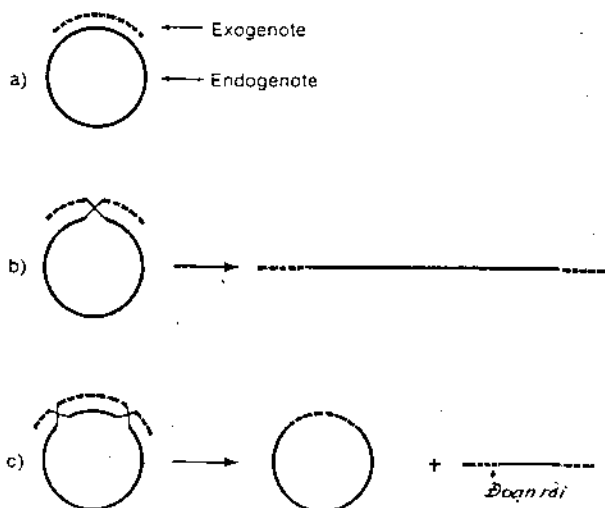
Ví dụ : Nếu một phút giao nạp tương đương 20 đơn vị tái tổ hợp ở E.coli, và nguyên nhiễm sắc thể(DNA) được chuyển sang trong 100 phút, thì tổng chiều dài là 2000 đơn vị tái tổ hợp. Nếu DNA có 10^7 cặp nucleotide, thì 1 đơn vị tái tổ hợp bằng $10^7/2000 = 5000$ bp.

3. Lập bản đồ bằng tái tổ hợp

Đặc điểm của tái tổ hợp ở vi khuẩn là chỉ một phần bộ gen được chuyển sang tế bào nhận. Một hay nhiều gen có thể được gắn vào nhiễm sắc thể tế bào nhận nhờ giao nạp và phụ thuộc độ dài đoạn truyền sang. Exogenote phải được gắn vào nhiễm sắc thể nhận thì mới được sao chép và chia về các tế bào trong dòng. Chỉ một đoạn ngắn DNA thường được gắn nhờ biến nạp và tải nạp. Như vậy, nếu hai gen cùng biến nạp (cotransformation) thì hai locus phải liên kết chặt. Tương tự như vậy, hai gen cùng được tải nạp vào phage sẽ ở gần nhau. Mức độ liên kết giữa các gen có chức năng khác nhau (intercistronic) hay giữa các đột biến bên trong một gen chức năng (intracistronic) có thể đánh giá từ các kết quả lai chuyên biệt.

Ở hệ thống hợp tử một phần (merozygote), exogenote muốn gắn vào endogenote phải xảy ra 2 trao đổi chéo ở hai đầu (hình 12.13) vì nếu chỉ có 1 trao đổi chéo thì cả hai sản phẩm nhận được đều mất cân bằng.

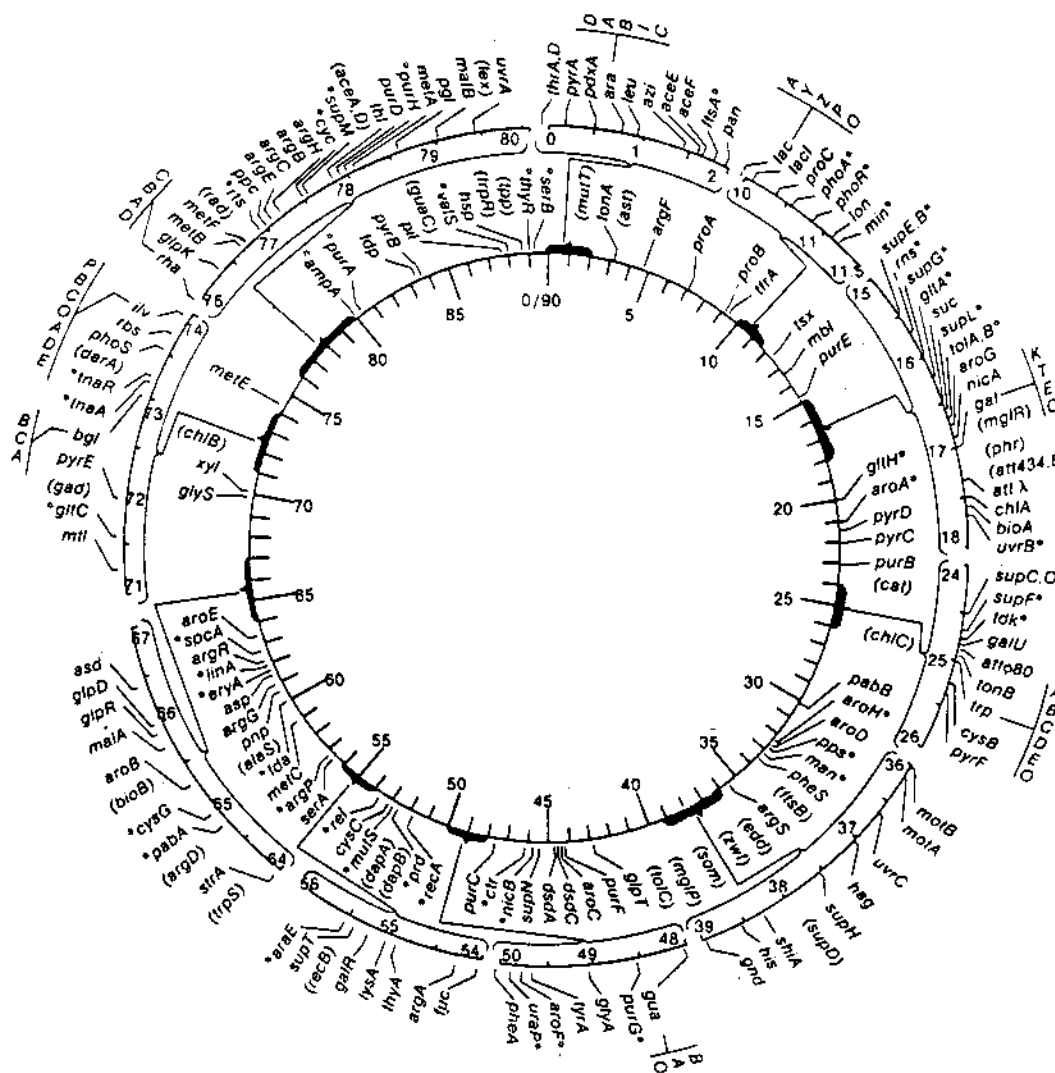
Trong các hệ thống này, tổng cá thể tham gia tái tổ hợp không biết được, nên tần số tái tổ hợp không thể tính như ở ruồi giấm (trên tổng số cá thể). Do đó, tần số tái tổ hợp được trình bày tương đối theo một số tiêu chuẩn chung cho tất cả các tổ hợp lai. Ví dụ, số lượng các cá thể tái tổ hợp nguyên dưỡng được tạo ra khi lai hai dòng đột biến có so sánh với kết quả khi lai dạng hoang dại với mỗi loại đột biến. Tuy nhiên có nhiều sai lệch và cần chỉnh lí.



Hình 12.13. Exogenote gắn vào endogenote

Xác định trình tự gen ở vi sinh vật thường phức tạp vì có thể xảy ra hiện tượng nhiễu âm cục bộ (localized negative interference). Phương pháp xác định trình tự gen thường dùng là lai 3 điểm hoán đổi (three - factor reciprocal crosses).

Ngoài ra, có thể xây dựng bản đồ di truyền bằng sử dụng các mất đoạn ở phage.



Hình 12.14. Bản đồ di truyền ở *E. coli*

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các vi khuẩn có quá trình *sinh sản cận hữu tính* nên vẫn thực hiện được tái tổ hợp di truyền. Ở vi khuẩn, thông tin di truyền được *truyền một chiều* từ thể cho sang thể nhận và tạo ra *hợp tử từng phần*. Tái tổ hợp di truyền ở vi khuẩn có thể thực hiện bằng các đoạn DNA trần trong *biến nạp*, hay phage trong *tải nạp*, nhờ giao nạp khi 2 tế bào khác giới tính gần với nhau. *Bản đồ di truyền* vi khuẩn được xây dựng nhờ các phương pháp khác nhau: giao nạp gián đoạn hoặc không gián đoạn, tái tổ hợp hay dùng các mất đoạn.

CÂU HỎI ÔN TẬP

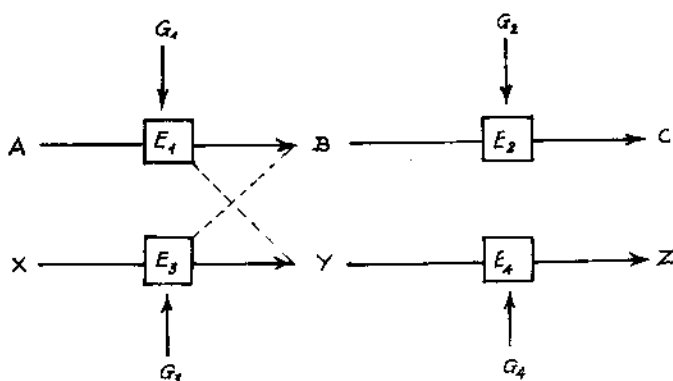
1. Biến nạp được thực hiện với những điều kiện nào ?
2. Nồng độ DNA ảnh hưởng đến biến nạp như thế nào ?
3. Biến nạp và tải nạp khác nhau và giống nhau ở những điểm nào ?
4. Tải nạp chung và tải nạp chuyên biệt khác nhau và giống nhau ở những điểm nào?
5. Đồng biến nạp và đồng tải nạp có điểm nào giống nhau và được sử dụng vào mục đích gì ?
6. Tế bào F^- có thể biến thành F^+ và Hfr không ? Bằng cách nào ?
7. Vì sao trong giao nạp cần thời gian khác nhau để tạo các thể tái tổ hợp theo các gen khác nhau ?
8. Phương pháp lập bản đồ di truyền nào có thể dùng cho cả biến nạp, tải nạp và giao nạp ? Phương pháp nào chỉ dùng cho giao nạp ?
9. Vì sao bản đồ di truyền của E.Coli và phage T_4 có dạng vòng tròn ?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Giả sử có hai con đường sinh tổng hợp (được mô tả ở hình 12.5) trong một sinh vật, chúng hoạt động đối nhau. Ở bất kì thời điểm nào, sinh vật chỉ tạo ra một trong các chất C hoặc Z. Khi chất trao đổi trung gian B đạt ngưỡng nhất định, nó kìm hãm enzyme 3 (E_3) bởi quá trình chuyển đổi lập thể (allosteric). Tương tự như vậy chất trao đổi Y có thể kìm hãm E_1 .

a) Các nhân tố cho phép một trong những trình tự phản ứng được thiết lập ban đầu trong cơ thể sinh vật sẽ như thế nào ?

b. Hệ thống này khác mô hình operon như thế nào ?



Hình 12.15

Lời giải

a) Trong quá trình phát triển bình thường của sinh vật, nó chỉ có thể có chất A trước khi chất Y hữu dụng trong trường hợp chỉ có chất B được tổng hợp. Tiếp theo, chất B có thể trở thành chất tiền thân cho một hợp chất khác trong một chuỗi phản ứng khác, khi nồng độ của nó giảm xuống dưới ngưỡng kim hãm E_3 . Lúc đó, Y và Z sẽ được tổng hợp và việc tạo ra B với C sẽ bị gián đoạn. Việc tạo ra Y và Z sẽ bị gián đoạn khi việc tạo B với C được bắt đầu trở lại. Người ta có thể hình dung rằng các enzyme của chuỗi phản ứng này có thể nhạy cảm hơn với nhiệt độ so với các enzyme của chuỗi kia: nếu E_1 bị mất hoạt tính ở nhiệt độ cao còn E_3 vẫn hoạt động, một sự thay đổi nhiệt độ có thể làm mất cân bằng hệ thống. Như vậy có thể biến đổi kiểu hình bằng thay đổi thành phần môi trường hoặc nhiệt độ, hoặc tác động lên nồng độ các chất trao đổi trung gian ở chuỗi phản ứng này hay khác.

b) Trong một operon, sự điều hòa thực hiện ở mức cao hơn: sự biểu hiện của gen tức sự phiên mã thành RNA; sự nhạy cảm của gen chỉ huy (locus operator) đối với sản phẩm của một gen điều hòa (chất kim hãm). Trong mô hình giả sử trên đây, sự điều hòa không tác động lên tổng hợp enzyme, mà lên hoạt tính của chúng.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Xét một gen vi khuẩn chứa 1000 cặp base. Do xử lí tác nhân gây đột biến, các đột biến của gen này được phát hiện với tần số là $1/10^5$ tế bào. Một trong các thể đột biến này được nuôi thành dòng thuần. Dòng này lại

được xử lí với cùng một tác nhân gây đột biến nói trên và tìm thấy tần số hồi biến cũng là $1/10^5$ tế bào. Có thể cho rằng sản phẩm gen nhận được từ thể hồi biến có cùng trình tự amino acid như dạng hoang dại ban đầu không? Giải thích?

2. 100 đột biến *lac* được xem xét riêng rẽ để đo các tần số hồi biến. Trong số đó 45 hồi biến với tần số 10^{-5} , 49 với tần số 3×10^{-6} , 3 với 3×10^{-11} và 3 với 10^{-10} . Kiểu đột biến nào ở trong nhóm có tần số hồi biến là 10^{-10} ? Các thể đột biến điểm, các đột biến *amper*, đột biến kép hay mất đoạn?

3. Một số kháng sinh, ví dụ sulfonamide, kìm hãm vi khuẩn một cách thuận nghịch với nghĩa rằng sự tăng trưởng của vi khuẩn sẽ được hồi phục nếu chất kháng sinh được loại khỏi môi trường nuôi cấy chúng. Hãy nêu phương pháp phân lập đột biến sul (sul kháng sulfonamide) từ quần thể vi khuẩn Sul^+ .

4. Sau khi thí nghiệm biến nạp của Avery được công bố, những người chống lại việc công nhận gen là DNA cho rằng biến nạp được thực hiện nhờ protein còn lẫn trong mẫu DNA.

a) Nếu biến nạp do protein chứ không phải DNA và nếu mẫu DNA có lẫn hơn 0,02% protein, trong 1 ml của dung dịch DNA ở nồng độ 10^{-7} mg/ml có lẫn bao nhiêu phân tử protein (mỗi protein khoảng 300 amino acid).

b) Nếu protein là tác nhân có hoạt tính biến nạp thì con số tính ở phần a có dùng được cho thí nghiệm điển hình tạo 1000 thể biến nạp (transformants) từ 0,0001g của DNA *Pneumococcus* không?

5. Người ta phê phán thí nghiệm biến nạp rằng DNA bằng cách nào đó thúc đẩy sự tổng hợp vỏ polysaccharide của *Pneumococcus* độc. Như vậy, thể đột biến có thể bị mất một số phản ứng cần cho tổng hợp polysaccharide và bước đó được trải qua nhờ thêm DNA. Với lí lẽ như vậy DNA không phải là chất di truyền. Các thí nghiệm loại nào có thể bỏ lí lẽ nói trên?

6. Về thí nghiệm phage nhiễm khuẩn của Herskey - Chase.

a) Giải thích như thế nào về sự kiện không phải tất cả S^{35} được tách khỏi tế bào vi khuẩn?

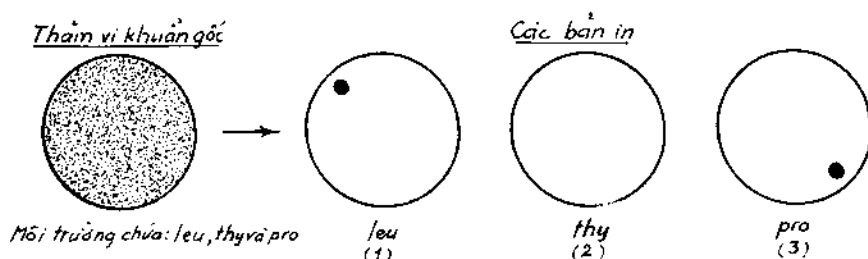
b) Vì sao 30% P^{32} còn ở ngoài tế bào vi khuẩn?

c) Sự kiện là phage được tạo ra từ vi khuẩn bị nhiễm cổ ý

7. Các tế bào vi khuẩn nhạy cảm với streptomycine (Str^S) có thể đột biến sang trạng thái kháng (Str^R). Những "thay đổi chức năng" như vậy do

đột biến xảy ra ít hơn so với “mất chức năng” do đột biến sử dụng các chất dinh dưỡng (ví dụ : đột biến $\text{His}^+ \rightarrow \text{His}^-$) hay sự lên men các đường ($\text{Lac}^+ \rightarrow \text{Lac}^-$). Xây dựng giả thuyết tính đến các quan sát trên.

8. Khoảng 10^8 tế bào *E. coli* của một dòng đột biến khuyết dưỡng (mất khả năng tổng hợp một hoặc vài chất) được cấy lên môi trường đầy đủ và mọc lên dày thành thảm. Thảm này được in lên các môi trường tối thiểu có bổ sung leucine, thymine và proline như hình vẽ.



Hình 12.16. Các khuẩn lạc mọc trên các môi trường khác nhau

a) Xác định kiểu gen của dòng nói trên?

b) Giải thích hiện tượng các khuẩn lạc mọc trên các môi trường tối thiểu có bổ sung.

9. Giả sử vi khuẩn được xử lí với hóa chất làm biến đổi một adenin ở một điểm trên gen. Do biến đổi đó A được thay bằng G và sau vài dòng sao chép sẽ có phân tử DNA mà cặp GC thay thế cho cặp AT trước đây. Chúng ta hãy xem xét vi khuẩn trước khi xảy ra sao chép. Hai đòi hỏi cần phải có vào thời điểm đó mới xảy ra đột biến làm gen bị biến đổi tạo sản phẩm mất hoạt tính.

DI TRUYỀN HỌC VI NẤM VÀ VI TẢO

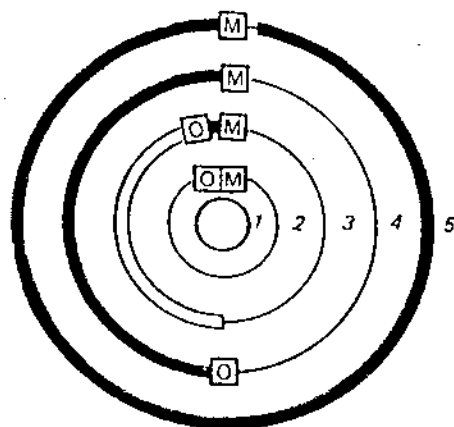
Các vi sinh vật *Eukaryotae* gồm vi nấm, vi tảo và nguyên sinh động vật. Sự đa dạng trong chu trình sống của chúng dẫn đến nhiều cơ chế di truyền khác nhau. Một số vi nấm, vi tảo là những đối tượng thuận tiện cho di truyền học trong nghiên cứu cấu trúc, chức năng và điều hòa hoạt động của bộ gen. Số khác là những vi sinh vật được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp.

I. CÁC VI NẤM

Trong số gần 50.000 loài vi nấm, đến nay đã nghiên cứu di truyền được khoảng 30 loài. Những vi sinh vật đầu tiên được sử dụng vào nghiên cứu di truyền học từ những năm 30 của thế kỷ này là các vi nấm. Đó là *Neurospora* và các loài khác nhau của giống *Saccharomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* là *Eukaryotae* đơn bào, là mô hình cho nghiên cứu di truyền của *Eukaryotae* nên được hiểu biết chi tiết hơn cả.

1. Các đặc điểm sinh học của vi nấm

Chu trình sống của các loài nấm khác nhau rất đa dạng, nhưng có thể xếp vào 5 kiểu căn bản khác nhau (hình 13.1).

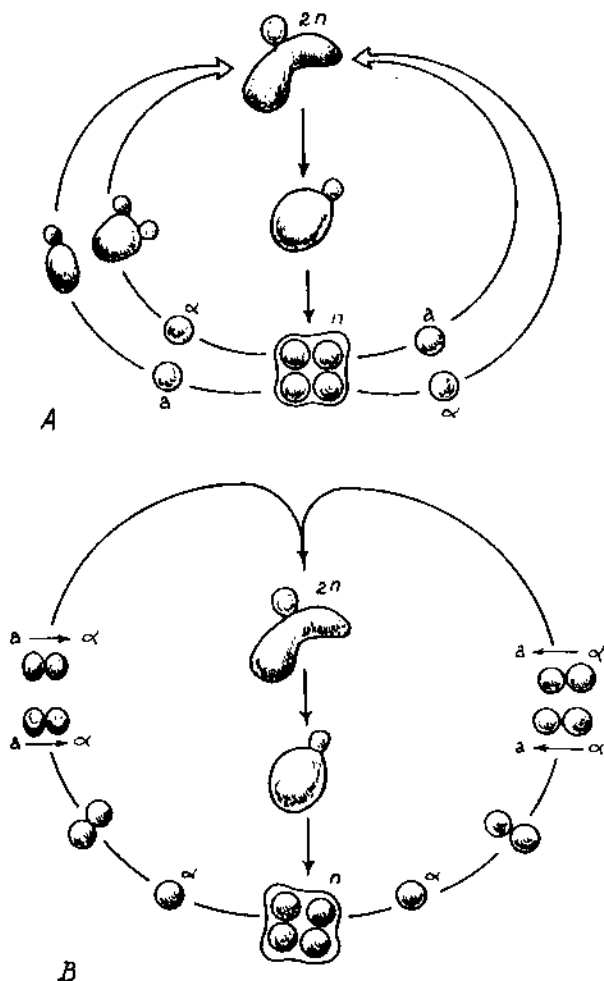


Hình 13.1. Sơ đồ về các kiểu chu trình sống cơ bản ở nấm

1. Sinh sản vô tính ; 2. Thể đơn bội ;
3. Thể đơn bội với giai đoạn dị nhân ;
4. Đơn bội - Lương bội ; 5. Lương bội.

— Đơn bội
 — Lương nhân
 — Lương bội

Ngay trong các nấm sinh sản hữu tính cũng có sự dao động từ hoàn toàn đơn bội như *Neurospora* (xem hình 13.3) đến hoàn toàn lưỡng bội (hình 13.1-5), như ở *Saccharomyces cerevisiae* (hình 13.2).



Hình 13.2. Chu trình sống của *Saccharomyces cerevisiae*.

A. Dị tần (thấy rõ bộ bốn) ;

B. Đồng tần ($a \rightarrow \alpha$ hoặc $\alpha \rightarrow a$).

Nấm men sinh sản vô tính bằng cách mọc chồi. Sự kết hợp của hai loại tế bào khác giới tính là (+) và (-) (hoặc a và α) sẽ tạo tế bào lưỡng bội $2n$. Các tế bào đơn bội và lưỡng bội đều có thể sinh sản vô tính tạo ra các dòng tương ứng. Khi tế bào lưỡng bội chia giảm nhiễm sẽ tạo 4 nang bào tử cùng nằm trong nang.

Đối với phần lớn nấm sợi, điểm đặc trưng là nhiều nhân cùng hiện diện trong một tế bào. Các nhân này có thể có kiểu gen khác nhau. Trong trường hợp này được gọi là **thể dị nhân** (heterokaryon) tương tự dị hợp tử.

Ở các vi sinh vật nói chung, các tính trạng **hình thái** thường không nhiều, nhưng có sự đa dạng lớn về **nhiều loại phản ứng hóa học** khác nhau. Sự ra đời của giả thuyết nổi tiếng 1 gen - 1 enzyme đã dựa trên các **đột biến sinh hóa** ở *Neurospora crassa*. Các môi trường chọn lọc được sử dụng để thu thập các dạng lai hiếm hoi giữa các dòng cha mẹ đơn bội mang các đột biến khuyết dưỡng lặn, khi sai hỏng trong chuỗi phản ứng sinh hóa của chúng bổ sung cho nhau. Ngoài ra **tính đề kháng** với các tác nhân bất lợi được sử dụng rộng rãi làm tính trạng đánh dấu trong các nghiên cứu di truyền ở nấm.

Nói chung, các vi sinh vật *Eukaryotae* có ưu thế đặc biệt là sự kết hợp giữa cấu tạo tế bào và chu trình sống như sinh vật bậc cao với cơ thể đơn bào của vi sinh vật. Nếu như trong những năm 70, các đối tượng căn bản của di truyền học phân tử là phage và vi khuẩn, thì những năm 80 cho đến nay các *Eukaryotae* đơn bào đã thay thế dần.

Bốn vấn đề căn bản được chú ý trong nghiên cứu di truyền ở nấm là: **tính không dung hợp** (incompatibility), **phân tích bộ bốn** (tetrad analysis), **tái tổ hợp nguyên phân** (mitotic recombination), và **sự đơn bội hóa** (haploidisation).

Nhiều nấm sợi có quả thể nhìn thấy được không phải là vi nấm, nhưng có thể sử dụng các phương pháp dùng cho vi nấm để nghiên cứu.

2. Tính không dung hợp ở nấm

Khái niệm tính **không dung hợp** (incompatibility) ở nấm được dùng để chỉ khả năng kết hợp với nhau giữa các dòng nấm trong sinh sản hữu tính. Cho đến nay, gần 450 loài nấm đã được nghiên cứu về các kiểu không dung hợp. Sự không dung hợp được xác định về mặt di truyền. Theo kiểu dung hợp thì nấm được phân làm 2 loại :

- **Đồng tản** (Homothallic) là khi có sự kết hợp với nhau giữa các tế bào (hay hệ sợi tơ-mycelium) giống nhau trong sinh sản hữu tính. Ví dụ, tế bào a kết hợp với tế bào a hay α với α tạo dạng lưỡng bội ($2n$) tương ứng aa hay $\alpha\alpha$ (hình 13.2B).

- **Dị tản** (Heterothallic) là kiểu khi có sự lai nhau giữa 2 loại tế bào khác nhau như a với α tạo dạng dị hợp tử lưỡng bội $a\alpha$ (hình 13.2B). Các nấm dị tản có thể chia thành : **lưỡng cực** (bipolar) và **tứ cực** (tetrapolar).

Đại diện điển hình của nấm *dị tản lưỡng cực* (bipolar heterothallic) là nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (hình 13.2A). Ở nấm men này, sự **hợp bào** (cytogamy) và **hợp nhân** (karyogamy) chỉ xảy ra giữa các tế bào (hay nang bào tử-ascospore) có **kiểu bất cặp** (mating type) khác nhau như a và α , và các allele khác nhau của locus *MAT*. Do có sự tham gia của 2 allele, nên gọi là **lưỡng cực**. Nấm mốc vàng bánh mì *Neurospora crassa* cũng thuộc kiểu không dung hợp này (hình 13.3). Nấm rơm (*Volvariella volvacea*) và nấm mỡ (*Agaricus bisporus*) cũng thuộc loại này.

Kiểu **dị tản tứ cực** (tetrapolar heteropolic) đặc trưng cho nhiều loại nấm đảm *Basidiomycetes*, mà đại diện là *Schizophyllum commune*. Nấm bào ngư (*Pleurotus*) và nấm hương (*Lentinus edodes*) thuộc kiểu không dung hợp này. Sự xác định di truyền không dung hợp ở các loài nấm này do 2 **gen** *A* và *B*. Mỗi gen có 2 allele hoặc nhiều hơn; thường là A_1 , A_2 và B_1 , B_2 . Sự kết hợp giữa các dòng đơn bội chỉ tạo dạng hữu thụ có kiểu gen $A_1A_2B_1B_2$ tức bốn nhân tố khác nhau (do đó gọi là tứ cực) như trên bảng 13.1.

BẢNG 13.1 Sự kết hợp giữa các dòng đơn bội có các kiểu không dung hợp khác nhau ở nấm **dị tản tứ cực**

	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	—	—	—	+
A_1B_2	—	—	+	—
A_2B_1	—	+	—	—
A_2B_2	+	—	—	—

Ở *Podospora anserina*, trong các giới hạn của mỗi chủng địa lí có 2 kiểu bất cặp “+” và “—”. Quá trình sinh sản hữu tính bình thường chỉ có được khi lai dòng “+” và dòng “—” giống nhau theo allele của gen *t*. Trường hợp này có thể gọi là **đồng tản khác allele**.

Sự đa dạng của các chu trình sống và các kiểu không dung hợp ở nấm có ảnh hưởng đến các phương pháp phân tích di truyền (genetic analysis). Ở một số nấm sinh sản hữu tính thực hiện trên cơ sở **dị hợp bào** (heterogamy) như ở *Neurospora crassa*. Ở những loài khác trên cơ sở **đồng hợp bào** (isogamy). Song song với sinh sản hữu tính còn có **chu trình cận hữu tính hoàn toàn** hay **không hoàn toàn** phụ thuộc vào loại nấm. Chu trình cận hữu tính (parasexual cycle) là quá trình kết hợp và

tái tổ hợp gen diễn ra trong nguyên phân chứ không phải giảm phân, không có sự thụ tinh như sinh sản hữu tính.

3. Phân tích bộ bốn ở nang khuẩn

Lớp Nang khuẩn (*Ascomycetes*) có đặc điểm là khi các tế bào lưỡng bội chia giảm nhiễm sẽ tạo ra các bào tử nằm trong một vỏ bao được gọi là **nang** (*ascus*). Nấm men bánh mì, men rượu *Saccharomyces cerevisiae* (hình 13.2) và nấm mốc bánh mì (*Neurospora crassa*) là những nang khuẩn được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu di truyền học.

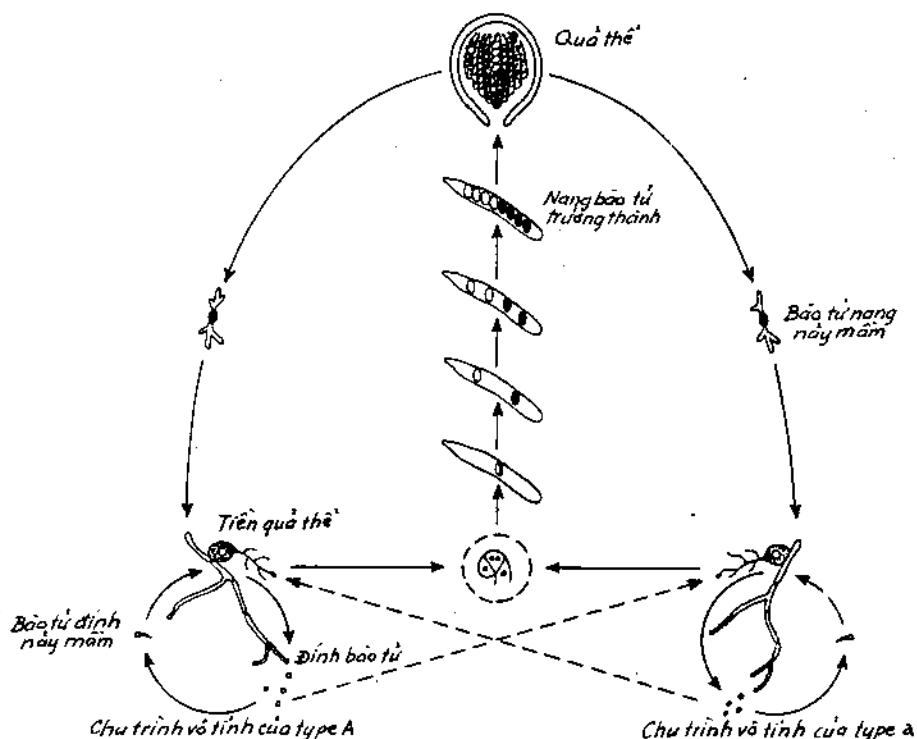
Điểm đặc biệt của nấm mốc *Neurospora crassa* là các **nang bào tử xếp thẳng hàng** trong nang như lúc các chromatid xếp trên mặt phẳng xích đạo của kì giữa. Chúng xếp theo một **trình tự** nhất định phản ánh được tiến trình giảm phân I và II (hình 13.3).

Ở nấm men, bốn nang bào tử đại diện cho 4 chromatid của giảm phân (xét một cặp nhiễm sắc thể tương đồng) xếp theo một thứ tự nào đó, khó biết trình tự. Sử dụng **máy vi thao tác** (*micromanipulator*), người ta có thể tách rời từng nang bào tử một của một nang để nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu trực tiếp các sản phẩm của mỗi lần giảm phân được gọi là **phân tích bộ bốn** (*tetrad analysis*).

Khi có sự phân li của một cặp allele thì trong mỗi nang của *Neurospora* sẽ có sự phân bố nang bào tử 4 : 4 nếu sự phân li xảy ra ở giảm phân I hoặc sự phân bố 2 : 2 : 2 : 2 nếu sự phân li xảy ra ở giảm phân II.

a) Sự phân li ở giảm phân I

Hình 13.4 mô tả quá trình lai một dòng *Neurospora* hoang dại (c^+) với một dòng đột biến (c) có khuẩn lạc cụm (*colonial*). Nếu tách các nang bào tử theo thứ tự trong nang và để chúng mọc lên thành dòng thì sẽ có thứ tự $4c : 4c^+$. Sự phân bố 4 : 4 cho thấy không có trao đổi chéo xảy ra giữa gen và tâm động (*centromere*). Gen càng cách xa tâm động xác suất xảy ra trao đổi chéo giữa gen và tâm động càng lớn. Do đó nếu số phần trăm nang $4c : 4c^+$ càng lớn, tức trao đổi chéo ít xảy ra thì gen c càng gần tâm động.



Hình 13.3. Chu trình sống của *Neurospora crassa*

Sợi nấm phân đoạn có chứa nhiều **nhân đơn bội**. Có hai kiểu giới tính được điều khiển bởi một cặp allele A và a . Sinh sản hữu tính chỉ thực hiện khi có sự kết hợp của các tế bào khác allele. Như hình vẽ mô tả khi **đỉnh bào tử** a rơi trên tiền quả thể dạng chai (protoperithecium). Các cơ quan sinh dục cái hay A rơi lên **tiền quả thể** a thì sự thụ tinh sẽ được xảy ra. Lúc đầu hai nhân đơn bội A và a tồn tại song song và chia đồng thời. Sau đó xảy ra **sự hợp nhân** và tiền quả thể dạng chai biến thành **quả thể** dạng chai (perithecium). Mỗi hợp tử lưỡng bội tạo thành một tế bào kéo dài gọi là nang (ascus) và lập tức chia **giảm nhiễm** được 4 nhân, mà 4 nhân này lại chia **nguyên nhiễm** một lần nữa tạo thành 8 nhân của 8 bào tử nang (ascospores).

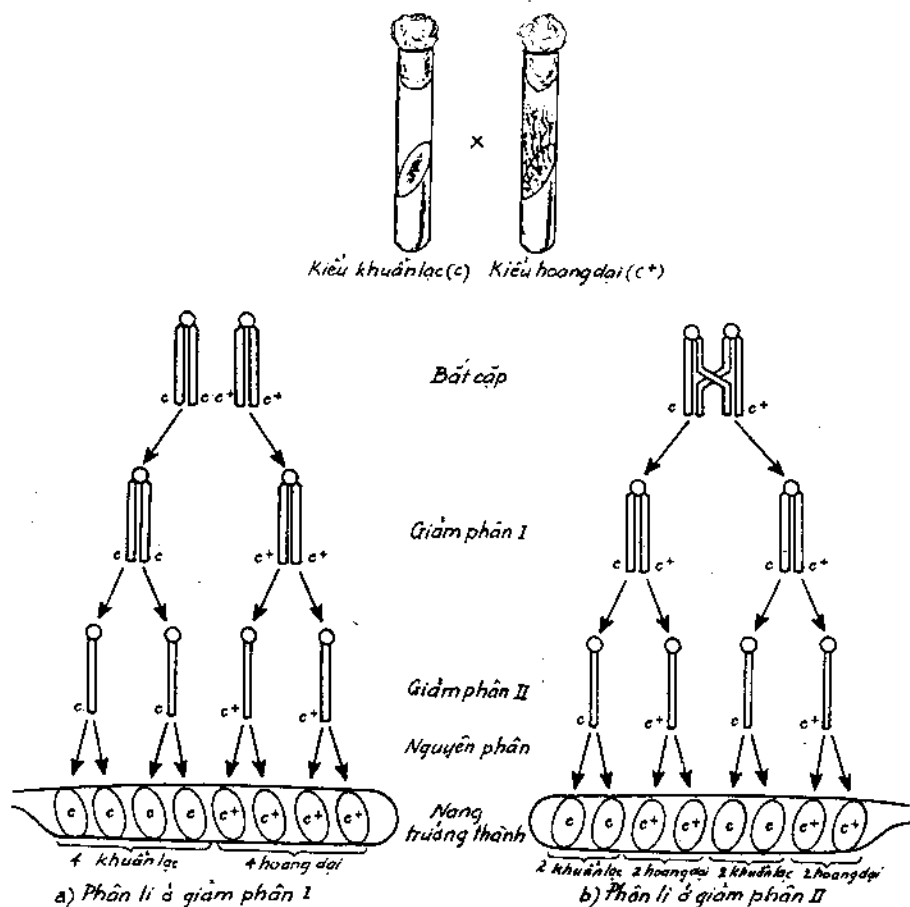
b) Sự phân li ở giảm phân II

Trường hợp b (hình 13.4), khi có trao đổi chéo xảy ra giữa gen và tâm động. Sau lần chia thứ nhất hai nhiễm sắc thể chị và em vẫn còn giống nhau. Đến lần chia thứ hai mới có sự khác nhau thể hiện ở sự phân li và tỉ lệ $2c : 2c^+ : 2c : 2c^+$ phản ánh điều đó. Kết quả này chứng minh rằng trao đổi chéo xảy ra giữa 4 chromatid.

c) Lập bản đồ di truyền bằng phân tích bộ bốn

Đối với trường hợp **bộ bốn sắp theo thứ tự** như ở *Neurospora*, số phần trăm các nang tái tổ hợp phản ánh khoảng cách giữa gen và tâm động. Cần

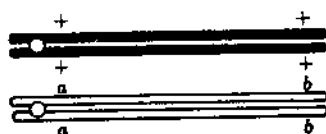
nhớ rằng trao đổi chéo chỉ liên quan đến hai chromatid, nên chỉ có hai sản phẩm của giảm phân chứa chromatid tái tổ hợp. Do đó để tính phần trăm các chromatid tái tổ hợp, lấy phần trăm nang tái tổ hợp chia đôi.



Hình 13.4. Phương thức tạo bào tử ở nấm mốc *Neurospora crassa*

Trường hợp **bộ bốn không theo thứ tự** như ở nấm men thì việc tính tần số tái tổ hợp có phức tạp.

Ví dụ : Phân tích bộ bốn từ tổ hợp lai hai gen $AB \times ab$. Sự thụ tinh cho nhân lưỡng bội (AB/ab) và nó chia giảm nhiễm ngay. Nếu không có trao đổi chéo xảy ra hoặc trao đổi chéo đôi xảy ra trên cùng hai chromatid thì sẽ có các bộ bốn kiểu cha mẹ $2AB : 2ab$ được gọi **kiểu đôi cha mẹ** (parental ditype) (**PD**).



Hình 13.5. Kiểu PD (không trao đổi chéo)

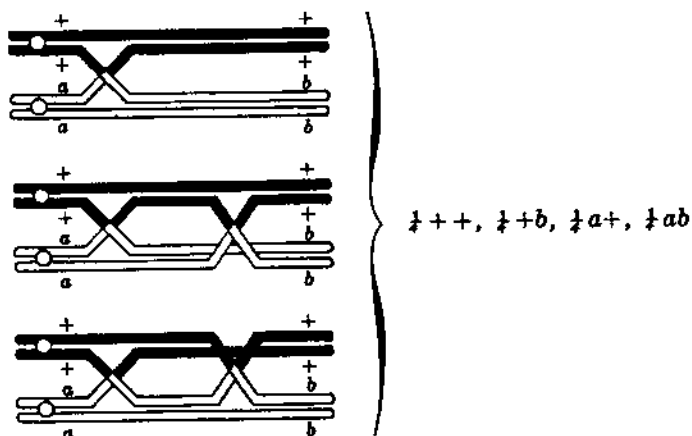


Hình 13.6. Kiểu PD (trao đổi chéo đôi)

Nếu trao đổi chéo xảy ra giữa chromatid 2 với 3 và 1 với 4, sẽ có 2Ab : 2aB. Kiểu này được gọi *kiểu đôi tái tổ hợp* (Recombinational Ditype - **RD**) hay kiểu đôi không cha mẹ (Nonparental Ditype - **NPD**). Kiểu này ít nhất trong các bộ bốn có tái tổ hợp.



Hình 13.7. Kiểu RD hay NPD (trao đổi chéo giữa các chromatid 2 x 3 và 1 x 4)



Hình 13.8. Kiểu TT

Các trường hợp tạo ra mỗi nang bốn loại bào tử có kiểu gen khác nhau 1AB : 1Ab : 1aB : 1ab, được gọi *kiểu bốn* (tetratype - **T**).

Nếu số lượng PD và RD không bằng nhau, 2 gen liên kết. Số phần trăm tái tổ hợp giữa hai gen tính theo công thức sau :

$$\text{Tần số tương đối của tái tổ hợp} = \frac{\text{RD} + 1/2\text{T}}{\text{Tổng các bộ bốn}}$$

d) Hiện tượng conversion

Conversion là hiện tượng *lệch* khỏi sự phân li bình thường 2 : 2 của các bộ bốn, khi có sự di truyền của 1 gen, được Lindegren phát hiện năm 1949.

Ví dụ : Dị hợp tử của nấm men $a+/+b$ tạo các bộ bốn bất thường như : $(a+) (a+) (a b) (+ b)$ và $(a+) (++) (+ b) (+ b)$ hoặc $(a+) (a b) (+ b) (+ b)$ và

$(a +) (a +) (+ +) (+ b)$. Sự phân li bất thường có thể liên quan đến cả 2 gen như: $(a +) (a +) (a +) (+ b)$ hay $(a +) (+ b) (+ b) (+ b)$.

Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy conversion là hiện tượng bình thường ở các gen khác nhau của nấm men với tần số 1%. Hiện tượng này cũng được mô tả ở các loài nấm khác như *Neurospora crassa*, *Sordaria fimicola* và nó có ý nghĩa quan trọng trong giải thích cơ chế tái tổ hợp.

4. Phân tích di truyền trong chu trình cận hữu tính

Nhiều loại nấm có sợi dinh dưỡng (vegetative hyphae) kết hợp với nhau, làm cho các nhân đơn bội từ các dòng cùng ở chung trong tế bào chất. Các **thể dị nhân** (heterocaryon) được tạo nên có thể tồn tại lâu dài như ở *N. crassa*. Sự tạo thành các thể dị nhân được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu sự tương tác giữa các gen, giữa các allele và giữa các gen của nhân với tế bào chất. Trong một số trường hợp, sự so sánh các dị hợp tử và dị nhân cho thấy sự khác nhau trong tương tác giữa các allele, có lẽ do:

- Tỷ lệ số lượng nhân và tương ứng các allele trong thể dị nhân có thể khác nhau.

- Các allele của các gen ở một nhân không được ngăn cách như ở giữa các thể dị nhân.

Các nhân ở thể dị nhân đôi khi hợp nhau tạo nên **đoạn lưỡng bội**. Hơn nữa, trong quá trình chia nguyên phân tiếp theo, nhân lưỡng bội có thể chịu tác động của 2 quá trình: đơn bội hóa hoặc tái tổ hợp nguyên phân.

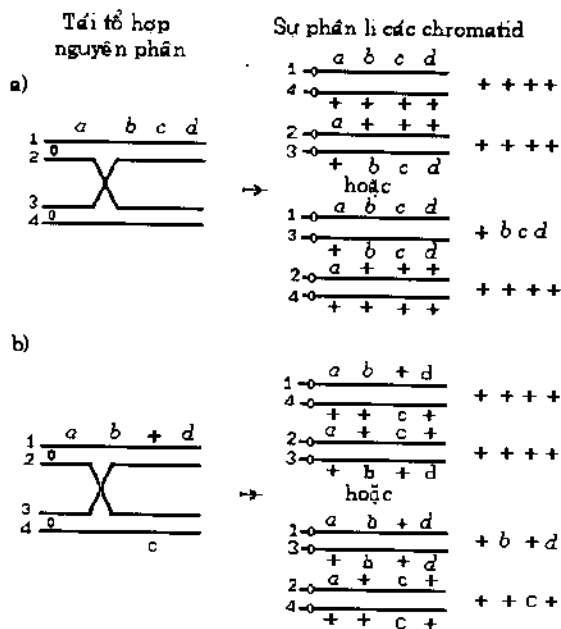
a) Sự đơn bội hóa

Sự đơn bội hóa (Haploidisation) diễn ra ngẫu nhiên. Nó có thể được gây tạo có hiệu quả bởi chất n-fluorophenylalanin.

Nếu như các nhân trong nhiều nguyên phân bị mất 1 nhiễm sắc thể $(2n-1)$, thì nhân lệch bội vừa xuất hiện trở nên không ổn định và tiếp tục mất các nhiễm sắc thể khác của một bộ đơn bội, cho đến khi trở thành nhân đơn bội (n) ổn định. Trong quá trình đó nhiễm sắc thể bị mất độc lập nhau, các gen của cùng một nhiễm sắc thể có sự **liên kết hoàn toàn**. Dựa vào đặc điểm này có thể xác lập sự liên kết gen dựa vào gen đánh dấu trên mỗi nhiễm sắc thể. Ví dụ, nếu có lưỡng bội dị hợp tử $(AB/ab\ N/n)$ khi đơn bội hóa sẽ có các kiểu gen: (ABN) , ABn , (abN) và (abn) .

b) Tái tổ hợp trong nguyên phân

Tái tổ hợp nguyên phân (Mitotic recombination) là hiện tượng thường gặp ở nhiều sinh vật, khi xảy ra trao đổi chéo giữa các chromatid tương đồng trong nguyên phân (hình 13.9).



Hình 13.9. Trao đổi chéo nguyên phân (Mitotic crossing-over) ở đoạn a-b...

- a) Trong tứ dị hợp tử theo các gen liên kết, khi allele lặn c (cần được xác định vị trí) nằm trên đoạn tương đồng được đánh dấu.
- b) Trong đoạn tương đồng không đánh dấu, trao đổi chéo ở đoạn giữa gen và tâm động đưa đến sự đồng hợp tử của các gen xa điểm trao đổi ở một nửa số nhân của tế bào (thể hệ con của nhân tái tổ hợp). Nhờ đó, có thể sử dụng trao đổi chéo nguyên phân để xác định vị trí gen ở một vai của nhiễm sắc thể so với tâm động.

Trong trường hợp này, khoảng cách của gen đánh dấu xa tâm động nhất, sự đồng hợp tử hóa thường xảy ra hơn cả (được coi là 100%) và sự phân bố các gen được tính theo công thức :

$$D = \frac{Nab}{Nb} \cdot 100\%$$

D biểu thị khoảng cách của gen đến tâm động.

Nb - tổng số các dạng phân li, đồng hợp tử theo b.

Nab - số các dạng phân li đồng hợp cả a và b, nếu như b là gen đánh dấu xa tâm động nhất.

Bản đồ liên kết gen được xây dựng bằng tái tổ hợp giảm phân và tái tổ hợp nguyên phân (trong chu trình cận hữu tính) có thứ tự gen xếp giống nhau ở *Aspergillus nidulans*.

II. CÁC TẢO LỤC ĐƠN BÀO

Các tảo lục đơn bào (Microalgae) cũng được làm đối tượng nghiên cứu của di truyền học, đặc biệt là **di truyền quang hợp** và di truyền của bào quan **lục lạp**. So với nấm, các vi tảo và nói chung là tất cả thực vật, các đột biến khuyết dưỡng ở tảo lục đơn bào chỉ hạn chế trong một phạm vi hẹp như mất khả năng tổng hợp **arginine** (*arg⁻*) và một số vitamin. Nguyên nhân của hiện tượng này đến nay chưa rõ.

1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Loài vi tảo được sử dụng sớm nhất và nghiên cứu di truyền chi tiết hơn cả là *Chlamydomonas reinhardtii*, mà chu trình sống đã mô tả ở chương IV-hình 4.16. Ưu thế của đối tượng này là có thể tiến hành **lai** và **phân tích bộ bốn** không xếp theo thứ tự.

Trong điều kiện thí nghiệm, có thể nuôi các tế bào *Chlamydomonas reinhardtii* để nhận các **tế bào đồng nhất** (synchronous culture), khi thay đổi chu kì 12 giờ sáng 12 giờ tối đều đặn. Theo dõi tổng hợp DNA cho thấy **DNA của lục lạp** tổng hợp vào giờ thứ 5-6 ngoài sáng, còn DNA của nhân tổng hợp khoảng giờ thứ 16 - 18, sau đó chia tế bào đồng loạt.

Một số đột biến kháng streptomycine đã được thu nhận và nhận thấy ở một số có sự di truyền trong nhân, số khác có sự di truyền ngoài nhân (chi tiết ở chương XV).

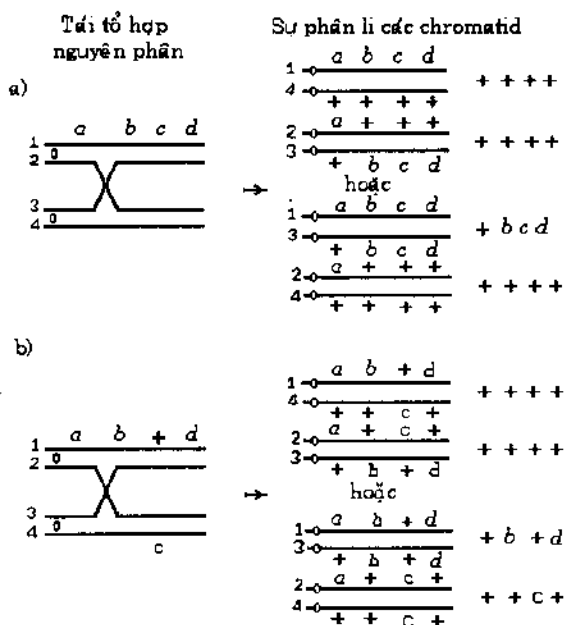
2. Các vi tảo sinh sản vô tính

Các thí nghiệm di truyền được tiến hành ở các vi tảo sinh sản vô tính như: *Chlorella*, *Euglena*, *Scenedesmus*. Do không tiến hành lai được nên phân tích di truyền chỉ giới hạn ở **thu nhận các đột biến**. Các **đột biến sắc tố** ở *Chlorella* góp phần hiểu sâu về cơ chế di truyền quang hợp.

Các **nguyên sinh động vật** (Protozoa) là một nhóm lớn gồm hơn 65.000 loài, trong đó có khoảng 10.000 loài kí sinh. Di truyền học của nhóm này hầu như chưa được nghiên cứu.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các vi sinh vật *Eukaryotae* như vi nấm, vi tảo có **chu trình sống đa dạng** và ở nhiều điểm giống với các *Eukaryotae* bậc cao. **Cấu tạo đơn bào** giúp cho việc sử dụng có hiệu quả các phương pháp phân tích di truyền ở vi sinh vật. **Phân tích bộ bốn** giúp nghiên cứu được chi tiết từng sản phẩm của giảm phân. Các nghiên cứu di truyền vi nấm tập trung ở 4 vấn đề căn bản : **tinh**



Hình 13.9. Trao đổi chéo nguyên phân (Mitotic crossing-over) ở đoạn a-b...

a) Trong tứ dị hợp tử theo các gen liên kết, khi allele lặn c (cần được xác định vị trí) nằm trên đoạn tương đồng được đánh dấu.

b) Trong đoạn tương đồng không đánh dấu, trao đổi chéo ở đoạn giữa gen và tâm động đưa đến sự đồng hợp tử của các gen xa điểm trao đổi ở một nửa số nhân của tế bào (thể hệ con của nhân tái tổ hợp). Nhờ đó, có thể sử dụng trao đổi chéo nguyên phân để xác định vị trí gen ở một vai của nhiễm sắc thể so với tâm động.

Trong trường hợp này, khoảng cách của gen đánh dấu xa tâm động nhất, sự đồng hợp tử hóa thường xảy ra hơn cả (được coi là 100%) và sự phân bố các gen được tính theo công thức :

$$D = \frac{Nab}{Nb} \cdot 100\%$$

D biểu thị khoảng cách của gen đến tâm động.

Nb - tổng số các dạng phân li, đồng hợp tử theo b.

Nab - số các dạng phân li đồng hợp cả a và b, nếu như b là gen đánh dấu xa tâm động nhất.

Bản đồ liên kết gen được xây dựng bằng tái tổ hợp giảm phân và tái tổ hợp nguyên phân (trong chu trình cận hữu tính) có thứ tự gen xếp giống nhau ở *Aspergillus nidulans*.

II. CÁC TẢO LỤC ĐƠN BÀO

Các tảo lục đơn bào (Microalgae) cũng được làm đối tượng nghiên cứu của di truyền học, đặc biệt là **di truyền quang hợp** và di truyền của bào quan **lục lạp**. So với nấm, các vi tảo và nói chung là tất cả thực vật, các đột biến khuyết dưỡng ở tảo lục đơn bào chỉ hạn chế trong một phạm vi hẹp như mất khả năng tổng hợp **arginine** (*arg⁻*) và một số vitamin. Nguyên nhân của hiện tượng này đến nay chưa rõ.

1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Loài vi tảo được sử dụng sớm nhất và nghiên cứu di truyền chi tiết hơn cả là *Chlamydomonas reinhardtii*, mà chu trình sống đã mô tả ở chương IV-hình 4.16. Ưu thế của đối tượng này là có thể tiến hành **lai** và **phân tích bộ bốn** không xếp theo thứ tự.

Trong điều kiện thí nghiệm, có thể nuôi các tế bào *Chlamydomonas reinhardtii* để nhận các **tế bào đồng nhất** (synchronous culture), khi thay đổi chu kỳ 12 giờ sáng 12 giờ tối đều đặn. Theo dõi tổng hợp DNA cho thấy **DNA của lục lạp** tổng hợp vào giờ thứ 5-6 ngoài sáng, còn DNA của nhân tổng hợp khoảng giờ thứ 16 - 18, sau đó chia tế bào đồng loạt.

Một số đột biến kháng streptomycine đã được thu nhận và nhận thấy ở một số có sự di truyền trong nhân, số khác có sự di truyền ngoài nhân (chi tiết ở chương XV).

2. Các vi tảo sinh sản vô tính

Các thí nghiệm di truyền được tiến hành ở các vi tảo sinh sản vô tính như: *Chlorella*, *Euglena*, *Scenedesmus*. Do không tiến hành lai được nên phân tích di truyền chỉ giới hạn ở **thu nhận các đột biến**. Các **đột biến sắc tố** ở *Chlorella* góp phần hiểu sâu về cơ chế di truyền quang hợp.

Các **nguyên sinh động vật** (Protozoa) là một nhóm lớn gồm hơn 65.000 loài, trong đó có khoảng 10.000 loài kí sinh. Di truyền học của nhóm này hầu như chưa được nghiên cứu.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các vi sinh vật *Eukaryotae* như vi nấm, vi tảo có **chu trình sống đa dạng** và ở nhiều điểm giống với các *Eukaryotae* bậc cao. **Cấu tạo đơn bào** giúp cho việc sử dụng có hiệu quả các phương pháp phân tích di truyền ở vi sinh vật. **Phân tích bộ bốn** giúp nghiên cứu được chi tiết từng sản phẩm của giảm phân. Các nghiên cứu di truyền vi nấm tập trung ở 4 vấn đề căn bản: **tinh**

không dung hợp, phân tích bộ bốn, tái tổ hợp nguyên phân và sự đơn bội hóa. *Neurospora crassa* và *Saccharomyces cerevisiae* là những đối tượng nghiên cứu quan trọng của di truyền. Ở vi tảo *Chlamydomonas reinhardtii* được nghiên cứu chi tiết hơn cả trong số các vi tảo. Các nghiên cứu ở vi tảo làm sáng tỏ nhiều vấn đề của *di truyền quang hợp* và sự xác định các sắc tố.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. So sánh những điểm giống nhau và khác nhau giữa nghiên cứu di truyền ở *Eukaryotae* vi sinh vật với *Eukaryotae* sinh vật bậc cao và với *Prokaryotae*.
2. Sự xác định "giới tính" ở nấm như thế nào và có những kiểu gì ?
3. Phân tích bộ bốn có ý nghĩa như thế nào trong nghiên cứu di truyền học.
4. Sự nghiên cứu đồng thời các dị hợp tử và thể dị nhân nhằm tìm hiểu vấn đề gì ?
5. Nêu ứng dụng của đơn bội hóa trong xác định vị trí gen.
6. Tái tổ hợp nguyên phân và ứng dụng.
7. Loài vi tảo nào được nghiên cứu chi tiết hơn cả, vì sao ?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Ở *Neurospora* người ta lai 2 dòng $a b +$ với $a + b$. Trong đó, a và b là hai gen liên kết, mà a gần tâm động hơn. Hãy trình bày sơ đồ đơn giản nhất, cho phép giải thích nguồn gốc các bộ bốn sau đây.

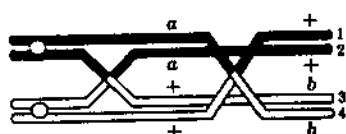
1. $(a b) (+ b) (a +) (+ +)$.
2. $(+ b) (a +) (+ b) (a +)$.
3. $(a +) (+ b) (a b) (+ +)$.

Lưu ý : các chữ trong ngoặc chỉ kiểu gen của 1 nang như $(a +)$, $(b +)$; dấu $+$ chỉ allele tương ứng, nên có thể viết $(+ +)$.

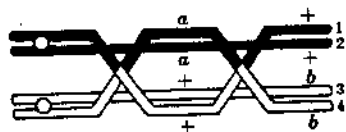
Lời giải

– **Bộ bốn 1** : Nhận xét đầu tiên, đây là bộ bốn **kiểu bốn T** (tetratype) tức trong một nang có 4 kiểu bào tử khác nhau. Như vậy đã xảy ra một trao đổi chéo giữa a và b . Mặt khác a phân li ở giảm phân II, chứng tỏ một trao

đổi khác xảy ra giữa a và tâm động. Vì b nằm xa tâm động hơn a , nó phân li ở giảm phân I, sẽ có 2 trao đổi chéo xảy ra giữa b và tâm động. Các trao đổi chéo này hoặc xảy ra trên cùng 2 chromatid hoặc trên 4 chromatid. Các sơ đồ dưới đây minh họa cho kết luận trên.



$$(a\ b)(+b)(a+)(++)$$

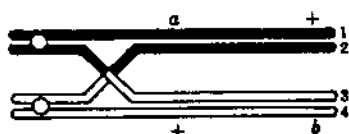


$$(+ +)(a+)(+b)(ab)$$

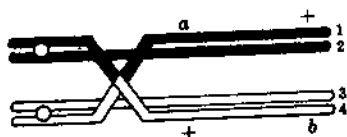
Giữa chromatid 1 và 4 xảy ra trao đổi chéo đôi, 1 giữa a với tâm động và 1 giữa a và b .

Trao đổi chéo xảy ra giữa a và b của chromatid 1 và 4 và giữa a với tâm động của sợi 2 và 3.

- **Bộ bốn 2** : Tất cả các bào tử đều kiểu cha mẹ nên không có trao đổi chéo nào xảy ra giữa a và b . Ngược lại, cả a lẫn b đều phân li ở giảm phân II chứng tỏ có một trao đổi chéo xảy ra giữa tâm động và a . Điều này được minh họa bằng các sơ đồ sau.

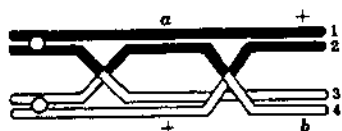


$$(a+)(+b)(a+)(+b)$$

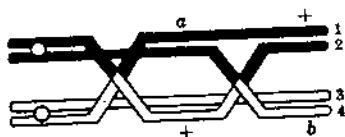


$$(+b)(a+)(+b)(a+)$$

- **Bộ bốn 3** : Đây là nang kiểu bốn T, vậy có một trao đổi chéo xảy ra giữa a và b . Ngoài ra a còn phân li ở giảm phân II nên có một trao đổi chéo giữa a và tâm động. Mặc dù có hai trao đổi chéo xảy ra giữa b và tâm động, b vẫn phân li ở giảm phân II (ngược với trường hợp a), như vậy hai trao đổi chéo trên liên quan đến 3 trong 4 chromatid, điều này được thể hiện ở hai sơ đồ dưới đây :



$$(a+)(+b)(ab)(++)$$



$$(++) (ab)(+b)(a+)$$

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Các kiểu bộ bốn nào được tạo ra do dòng nấm men lưỡng bội có kiểu gen AB/ab, nếu A và B liên kết hoàn toàn ?

2. Các kiểu bộ bốn nào và tỉ lệ bao nhiêu xuất hiện ở hậu thế của dòng nấm men nhận được do lai đột biến khuyết dưỡng *ade* và *his* ? Biết rằng, các gen xác định tổng hợp adenine và histidine không liên kết với nhau và với tâm động.

3. Ở dòng *Aspergillus nidulans* lưỡng bội dị hợp tử ABC/abc nhận được sự phân li kiểu hình: aBC (80), abc (20), abC (60). Số trong ngoặc chỉ các thể phân li. Có thể giải thích kết quả này như thế nào? Có thể xác định vị trí gen hay không?

4. Một nòi đặc biệt của *Neurospora*, *ad*, không thể mọc trên môi trường tối thiểu khi không có adenine. Một nòi khác *ylo* có các đỉnh bào tử (conidies) vàng (yellow). Kết quả lai giữa hai nòi được nêu dưới đây. Tính khoảng cách giữa hai gen.

Số nang	106	14
Thành phần các bộ bốn	$(ad +) (ad +)$ $(+ ylo) (+ ylo)$	$(ad +) (ad ylo)$ $(+ +) (+ ylo)$

KỸ THUẬT DI TRUYỀN

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA (Recombinant DNA technology) thường được gọi là **kỹ thuật di truyền**; ra đời trên cơ sở hàng loạt thành tựu của sinh học phân tử trong việc **tách, cắt, nối, chép, chuyển** và cho các **gen biểu hiện đúng như mong muốn**. Nó có vai trò **cách mạng hóa** đối với sự phát triển sinh học và tạo **quyền lực ghê gớm** cho con người trong việc cải tạo sinh giới và bản thân mình.

Việc nghiên cứu về kỹ thuật tái tổ hợp DNA và **các phương pháp dẫn xuất** của nó có ý nghĩa quan trọng là trang bị **phương pháp luận mới** để đi sâu vào bản chất sự sống và hiểu rõ hơn vì sao **công nghệ sinh học** được coi là **"Bà hoàng của thế kỉ 21"**.

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA (Recombinant DNA technology), thường gọi là **kỹ thuật di truyền**, bao gồm một tập hợp của nhiều kỹ thuật, trong đó vai trò hàng đầu thuộc về các tư duy và phương pháp của di truyền học vi sinh vật, sinh học phân tử và hóa học của nucleic acid. Về hình thức, sự ra đời được coi là vào năm 1972-1973, khi nhóm nghiên cứu của Berg, Boyer và Cohen ở Mỹ đã tạo nên phân tử **DNA tái tổ hợp in vitro** từ ba nguồn vật liệu di truyền khác nhau: nguyên bộ gen của virus SV 40 gây ung thư ở khỉ, một phần bộ gen của phage trung hòa λ và các gen của operon lactose của vi khuẩn *E. coli*. Thoạt đầu các nhà khoa học có ý định đưa DNA ghép vào trực khuẩn *E. coli*, nhưng sau khi thảo luận họ **đã dừng thí nghiệm** vì sợ rằng loài vi khuẩn mới (*E. coli* có mang gen của virus gây ung thư) nếu thoát ra môi trường sống có thể gây một bệnh dịch (ung thư) mà loài người chưa có cách trị thì tai họa khó lường. Chẳng bao lâu sau đó, ở Mỹ đã thành lập một ủy ban đặc biệt do P. Berg đứng đầu **kiểm soát sự an toàn** trong các thí nghiệm lắp ghép gen. Ở nhiều nước các ủy ban này cũng đã được thành lập. Thực tế đến nay mức nguy hiểm không lớn lắm, nhưng vẫn phải hết sức thận trọng.

Tiếp theo, vào năm 1973-1974 nhóm Cohen, Helinski, Boyer lần đầu tiên đã nhận được các sản phẩm có hoạt tính từ DNA tái tổ hợp. Nhóm Cohen đã giải quyết vấn đề lắp ghép và tạo dòng DNA. Sau đó nhiều nhà khoa học đã lao vào các thí nghiệm lắp ghép gen và nhanh chóng thu được các kết quả có ứng dụng thực tiễn.

Trước khi tìm hiểu chi tiết vấn đề cần thống nhất quan điểm về một số **thuật ngữ căn bản**. Sự khác nhau căn bản của kỹ thuật mới với những phương pháp truyền thống được sử dụng trước đây (Ví dụ, gây đột biến bằng

tia phóng xạ hay tạo đa bội thể nhờ sử dụng chất colchicine) để biến đổi kiểu gen là ở chỗ nó cho phép *trong điều kiện thí nghiệm in vitro* (trong ống nghiệm) có thể *cấu tạo (ghép nối)* theo chủ ý có lựa chọn từ các đoạn chất di truyền DNA khác nhau thành dạng ghép nối được gọi là các *DNA tái tổ hợp*, chúng có *hoạt tính* khi đưa trở vào tế bào sống. Do đó, kĩ thuật này được gọi là *kĩ thuật tái tổ hợp DNA*. Các khái niệm *kĩ thuật "gen"* (Gene engineering) và *kĩ thuật "di truyền"* (genetic engineering hay genetic technology gọi tắt là *gentech* hay còn gọi là *gene manipulation* - điều khiển gen) thường được sử dụng và được coi là đồng nghĩa.

Kĩ thuật này còn được gọi là *tạo dòng phân tử* (molecular cloning), vì nhờ nó một đoạn gen hay đoạn nucleic acid có thể được nhân lên thành *dòng* gồm vô số bản sao giống nhau.

Tuy nhiên, trải qua 25 năm phát triển, thực tế cho thấy khái niệm *kĩ thuật di truyền* có nghĩa rộng hơn, bao trùm hơn, bao gồm thao tác không chỉ với từng gen riêng lẻ mà cả những phần lớn hơn của bộ gen và nhiều phương pháp khác như khuyếch đại gen không qua tạo dòng.

Kĩ thuật di truyền được thực hiện qua nhiều công đoạn phức tạp và tinh vi, có thể nói là một *công nghệ*. Từ đó, thuật ngữ "*công nghệ sinh học*" (biotechnology) ra đời.

I. CÁC ENZYME RESTRICTION ENDONUCLEASE

Sinh học phân tử đã phát hiện và hiểu rõ cơ chế tác động của hàng loạt enzyme. Nhờ đó đã sử dụng chúng thành những công cụ hữu hiệu trong *cắt, nối và chép gen*. Đó là các enzyme như các nuclease, DNA - polymerase, ligase, reverse transcriptase, terminal transferase, trong đó vai trò hàng đầu là các enzyme restriction.

1. Restriction endonuclease hay enzyme hạn chế

Vào năm 1962, V.Arber lần đầu tiên chứng minh rằng có những *enzyme đặc biệt* hoạt động trong tế bào vi khuẩn, chúng có khả năng phân biệt DNA "của mình" với DNA "lạ" của phage. Các enzyme này "*hạn chế*" (restriction) khả năng sinh sản của phage trong tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy chúng một cách đặc hiệu, do đó được gọi là *restriction enzyme*. Chữ *restriction* (hạn chế) có nguồn gốc lịch sử từ đó và được dùng đến nay.

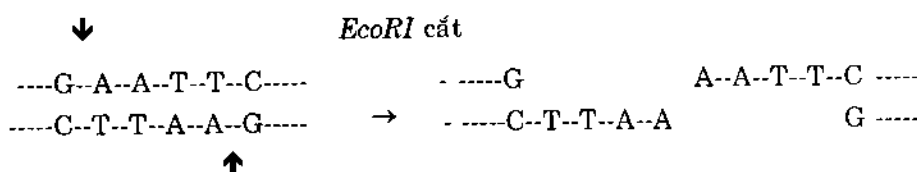
Các enzyme phân cắt DNA được gọi là *nuclease* gồm 2 loại: *exonuclease* và *endonuclease*. Exonuclease cắt DNA từ hai đầu mút, còn endonuclease cắt DNA ở giữa phân tử. Các restriction enzyme cắt phân tử

DNA ở giữa một cách đặc hiệu nên được gọi là **restriction endonuclease**, ta có thể gọi là **enzyme hạn chế**, vài sách Nga gọi là **restrictaza**.

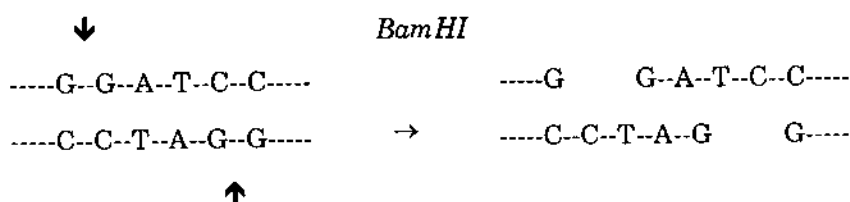
Vào năm 1970, H.Smith và các cộng sự đã tách được restriction endonuclease đầu tiên từ vi khuẩn *Haemophilus influenzae* được gọi là *HinII*. Ngay sau đó không lâu đã xác nhận được rằng phần lớn các loài vi khuẩn có hệ thống chuyên biệt **hạn chế - biến đổi** (restriction - modification system) để bảo vệ tế bào khỏi sự xâm nhập của DNA lạ (xem chương X).

Các restriction enzyme được chia thành 3 nhóm, các enzyme nhóm II thường được sử dụng trong kỹ thuật di truyền. Các enzyme nhóm II này nhận biết DNA mạch kép ở những trình tự **điểm nhận biết** và cắt DNA ở ngay điểm này hay kế cận. Các điểm nhận biết này thường có trình tự 4 - 6 cặp nucleotide đối xứng đảo ngược nhau, được gọi là các **palindrom**. Mỗi restriction endonuclease có trình tự nhận biết đặc trưng. Ví dụ :

- Restriction endonuclease *EcoRI* (từ *E.coli*) có trình tự nhận biết :



- Enzyme *BamHI* (từ vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*)

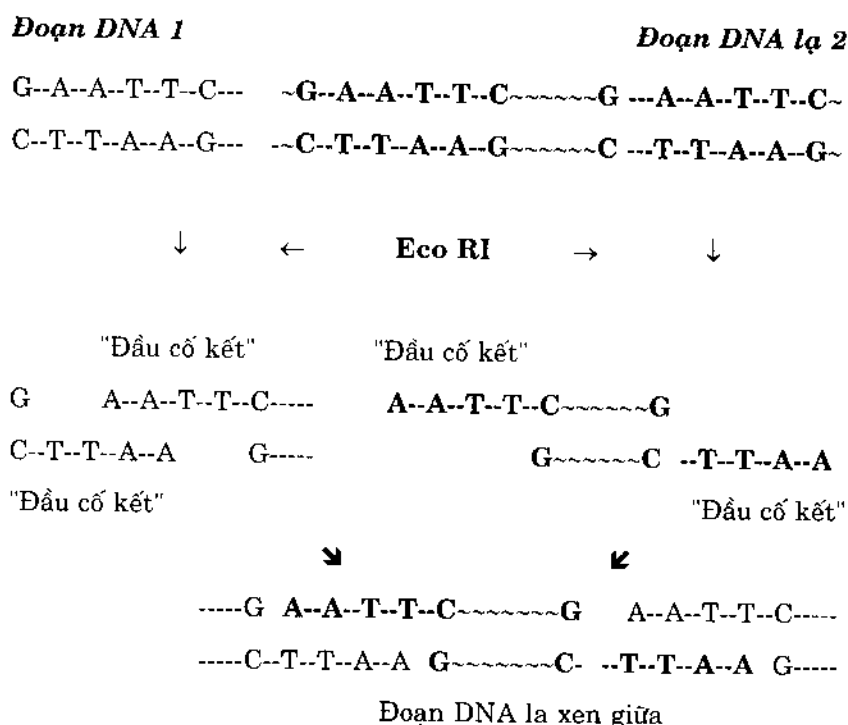


- Enzyme *HaeIII* (từ vi khuẩn *Haemophilus aegyptium*) có trình tự:



Như đã mô tả trên đây, các enzyme *EcoRI* và *BamHI* khi cắt DNA mạch kép tạo ra các đầu lách **cố kết** hay "**đính**" (cohesive ends) vì các base bổ sung dễ bắt cặp để gắn lại với nhau như lúc chưa bị cắt rời. Nếu có một đoạn

DNA lạ khác cùng bị cắt bởi một loại enzyme hạn chế, ví dụ Eco RI thì nhờ các đầu cố kết đoạn DNA lạ có thể xen vào giữa như hình 14.1 sau :



Hình 14.1. Đoạn DNA lạ có thể xen vào giữa nhờ các đầu cố kết

Tính chất quan trọng này được dùng để cắt và ghép gen.

Các đoạn DNA do enzyme *HaeIII* cắt có đầu tà và cần phải nối thêm một số nucleotide để có thể bắt cặp bổ sung (chi tiết ở phần sau).

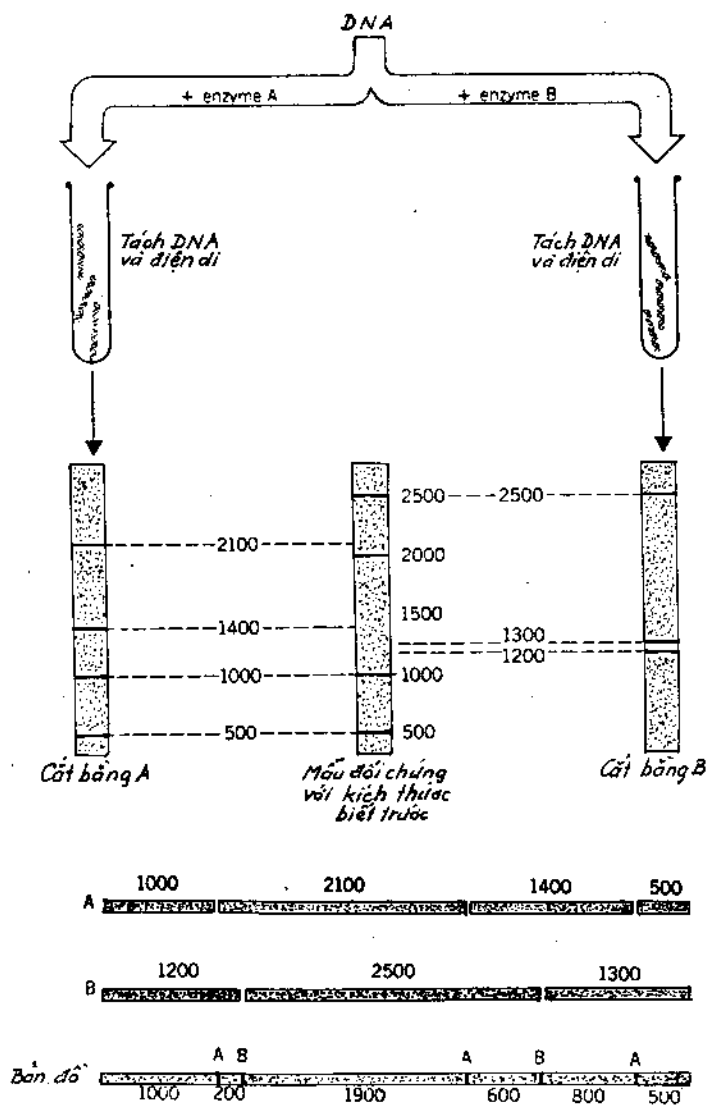
Ngày nay hơn 500 loại restriction endonuclease đã được phát hiện, chúng có khả năng cắt DNA tổng cộng với hơn 120 trình tự nhận biết khác nhau.

2. RFLP

RFLP (Restriction fragment length polymorphism) được hiểu là sự đa hình của các đoạn DNA bị cắt bởi restriction endonuclease. Thuật ngữ RFLP đến nay được sử dụng rộng rãi.

Mỗi loại DNA của các sinh vật sẽ có những **điểm nhận biết** đối với một loại restriction endonuclease phân bố đặc trưng dọc theo chiều dài của phân

tử. Đặc điểm này được sử dụng để lập **bản đồ restriction (restriction map)**. Nguyên tắc lập bản đồ restriction được mô tả trên hình 14.2.

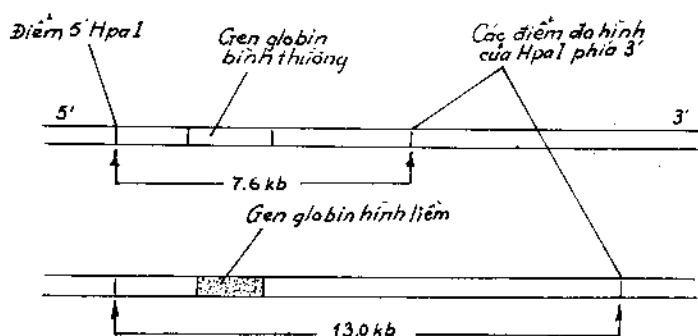


Hình 14.2. Nguyên tắc lập bản đồ restriction

Các số nêu trên hình chỉ số lượng các nucleotide phản ánh độ dài của các đoạn bị cắt rời ra. Restriction enzyme A cắt DNA thành 4 đoạn ở những điểm đặc trưng, enzyme B cắt cũng đoạn DNA đó, nhưng ở 3 điểm đặc trưng khác. Trình tự các điểm cắt đặc trưng của cả hai enzyme được mô tả trên bản đồ (hàng cuối cùng) phản ánh các đoạn DNA có chiều dài

khác nhau được cắt rời. Việc phát hiện các đoạn này thực hiện dễ dàng nhờ sử dụng điện di trên gen (gen electrophoresis). Trên bản điện di, các đoạn DNA ngắn di chuyển xa, đoạn dài di chuyển gần tạo nên các vệt đặc trưng. So sánh hai bản điện di riêng rẽ do phân cắt bởi enzyme A và B với bản điện di các đoạn DNA mẫu chuẩn có độ dài các nucleotide biết trước (ví dụ, các đoạn có chiều dài 500N, 1000N, 1500N và 2000N) sẽ xác định được độ dài của các đoạn bị cắt do enzyme A và B. Như vậy, khi cho một số enzyme restriction endonuclease nhất định cắt một mẫu DNA nào đó sẽ xuất hiện một **sự đa hình các đoạn DNA** với độ dài khác nhau biểu hiện bằng những vệt (band) đặc trưng trên gen điện di nên chúng được gọi theo tiếng Anh viết tắt là RFLP.

Các nhà nghiên cứu còn phát hiện rằng các allele khác nhau của một gen đôi khi biểu hiện RFLP khác nhau (hình 14.3). Điều này không lạ vì sự khác nhau trong trình tự các nucleotide sẽ tạo nên sự khác nhau trong số lượng và vị trí của các điểm nhận biết đối với restriction endonuclease. Điều đáng ngạc nhiên là DNA có kiểu hình giống nhau hoặc các vùng không mã hóa (non coding) tương đồng của nhiễm sắc thể thường có RFLP khác nhau nhiều hơn dự kiến.



Hình 14.3. Sự đa hình khi chẩn đoán bệnh hồng cầu hình liềm.

(Các RFLP do restriction endonuclease *HpaI* tạo ra cho thấy sự khác nhau giữa allele globin bình thường với allele bệnh hồng cầu hình liềm).

Trong kĩ thuật di truyền, RFLP được dùng để xác định gen tạo dòng có đúng như ban đầu mong muốn không (đối chiếu các điểm cắt) hoặc dùng để ráp nối xếp dọc theo chiều dài các đoạn DNA riêng lẻ căn cứ vào các **chỗ trùng lặp** khi phân tích thư viện gen.

II. THU NHẬN GEN

Khả năng tách từng gen riêng lẻ từ các đoạn DNA không dài được chứng minh ngay trước khi kĩ thuật di truyền ra đời. Vào năm 1969 nhóm

Becwitt, Shapiro đã thông báo về công trình tách gen từ operon lactose của *E.coli* dựa trên cơ sở kết hợp các phương pháp di truyền vi sinh cổ điển với các phương pháp vật lý để tách và lai các phân tử DNA.

Có thể thu nhận gen để thực hiện kĩ thuật tái tổ hợp DNA bằng ba phương pháp khác nhau.

1. Tách các đoạn DNA từ bộ gen

Đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi ngay từ buổi đầu của sự phát triển kĩ thuật tái tổ hợp DNA. Toàn bộ DNA của một sinh vật được cắt đoạn nhỏ dài khoảng 15.000 - 20.000 cặp base bằng lacc cơ học hay bởi các restriction endonuclease rồi gắn vào các vector mang gen tạo plasmid tái tổ hợp.

Phương pháp này mang nhiều tính chất mờ mẫm vì nguyên bộ gen tức toàn bộ DNA của các sinh vật khác nhau chứa rất nhiều gen. Phương pháp này được gọi bằng tiếng Anh là *shotgun* (bắn đạn chài). Tuy nhiên, hiện nay nó vẫn được sử dụng có hiệu quả trong việc lập ngân hàng gen hay thư viện gen của các sinh vật, được gọi là *ngân hàng của DNA bộ gen* (bank of genomic DNA) hay *thư viện của DNA bộ gen* (genomic DNA libraries).

2. Tổng hợp gen bằng phương pháp hóa học

Năm 1969, nhóm của Khorana đã thực hiện được *tổng hợp nhân tạo gen* lần đầu tiên. Đó là *gen mã hóa việc tổng hợp tRNA^{ala} vận chuyển* amino acid alanin ở nấm men, mà lúc đó cấu trúc đã được biết rõ. Gen này dài 77 cặp nucleotide, không có các trình tự điều hòa và vì thế không có hoạt tính. Về sau cũng chính nhóm trên đã tổng hợp được gen đầu tiên có hoạt tính, đó là gen mã hóa cho chất ức chế tRNA vận chuyển của tyrosin ở *E.coli* có chiều dài khoảng 200 cặp nucleotide.

Muốn tổng hợp gen bằng phương pháp hóa học phải *biết trình tự nucleotide của gen*. Sự hoàn thiện các phương pháp nghiên cứu cấu trúc bậc một của protein và các sản phẩm khác của gen, cùng các phương pháp xác định trình tự các nucleotide đã thúc đẩy nhanh đáng kể việc tổng hợp nhân tạo các gen.

Kĩ thuật di truyền đã nhanh chóng đưa các gen được tổng hợp hóa học vào sản xuất. Lần đầu tiên vào năm 1977, K.Itakura và Boyer đã thành công trong việc tổng hợp nhân tạo *gen mã hóa cho việc tổng hợp hormone somatostatin* của động vật có vú biểu hiện trong tế bào *E.coli*. Gen somatostatin đã nhận được nhờ biết cấu trúc peptide của hormone chỉ gồm có 14 amino acid. Phương pháp sử dụng trong công trình này hứa hẹn nhiều

triển vọng trong thu nhận nhiều hormone peptide khác. Sau đó, các nòi *E.coli* mang gen tổng hợp hóa học được tạo ra, chúng sản sinh **hormone tăng trưởng ở người** (somatotropin) và các hormone peptide như bradikinin và angiotensin, neuropeptide leuencephalin.... Gen hormone tăng trưởng ở người dài 584 cặp nucleotide là gen khá dài được tổng hợp nhân tạo. Nó được gắn vào plasmid của *E.coli* và chịu sự kiểm soát của promoter thuộc operon tryptophan. Các tế bào *E.coli* mang plasmid tái tổ hợp đã tạo ra khoảng 3 triệu phân tử hormone trong một tế bào. Polypeptide này được xác nhận trong các thí nghiệm kiểm định ở chuột bị lấy mất tuyến yên (hypophyse) hoàn toàn tương tự hormone tăng trưởng ở người.

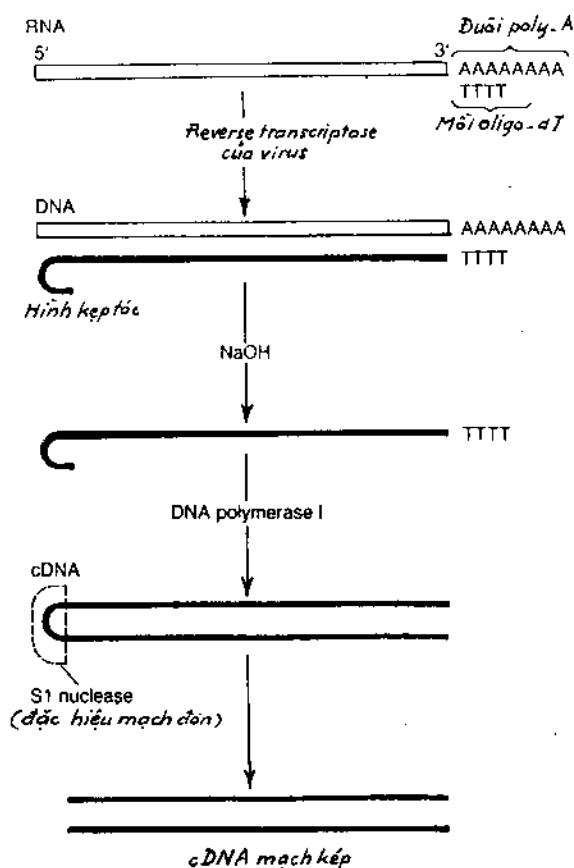
Phương pháp tổng hợp hóa học các gen cũng được sử dụng để tạo nòi vi khuẩn sản sinh ra **insulin**, hormone quan trọng để chữa bệnh tiểu đường (diabet). Gen insulin được tổng hợp ở dạng gồm từ hơn 40 đoạn oligonucleotide, mỗi đoạn căn bản có 6 nucleotide. Các đoạn này được ligase nối lại thành một cấu trúc thống nhất. Các mạch kép polynucleotide có chiều dài 271 và 286 cặp base được gắn vào plasmid. Plasmid lại được gắn thêm đoạn gen điều hòa cho sự biểu hiện của gen. Tế bào chứa plasmid mang gen insulin tổng hợp ra proinsulin, sau đó được xử lý hóa học để biến thành insulin có hoạt tính cấu tạo từ hai mạch polypeptide A có 21 và B có 30 amino acid. Hai mạch được nối với nhau nhờ cầu nối disulfid.

3. Sinh tổng hợp gen từ mRNA của gen tương ứng

Phương pháp thu nhận gen bằng cách cắt toàn bộ DNA của một sinh vật có nhiều bất lợi. Thứ nhất, số đoạn DNA được tạo ra có thể rất lớn, như ở động vật có vú có thể đến hàng triệu đoạn và phải cần có hàng triệu dòng vi khuẩn mang các đoạn DNA này, trong số đó có những dòng chứa các đoạn DNA tương tự nhau **trùng lặp**. Thứ hai, phần lớn DNA của *Eukaryotae* bậc cao **dư thừa** tức không mã hóa cho việc tổng hợp protein, những đoạn này làm tốn công vô ích khi tạo dòng.

Trong thực tiễn của kỹ thuật di truyền người ta sử dụng rộng rãi phương pháp thứ ba, **tạo gen từ các mRNA** thông tin của chúng. Phương pháp này dựa vào quá trình phiên mã ngược nhờ sử dụng enzyme **phiên mã ngược reverse transcriptase**. Enzyme này có tên gọi đúng nghĩa là **DNA-polymerase phụ thuộc RNA** (RNA-dependent DNA-polymerase) lần đầu tiên được phát hiện khi nghiên cứu sao chép RNA của retrovirus gây ung thư. Nó có khả năng tổng hợp nên **DNA một mạch** được gọi là **c-DNA** (complementary DNA) từ khuôn mRNA hoặc từ một đoạn polyribonucleotide tổng hợp hóa học. Nhờ enzyme reverse transcriptase này có thể tổng hợp hầu như bất cứ gen riêng biệt nào miễn có mặt mRNA của gen đó. Các c-DNA mạch đơn có thể được biến thành mạch kép nhờ DNA polymerase và được gọi là **c-DNA kép** (c-DNA

duplex). Đoạn c-DNA kép được gắn vào plasmid và biến nạp vào vi khuẩn để tạo dòng c-DNA.



Hình 14.4. Sinh tổng hợp gen từ mRNA

Các dòng DNA của bộ gen là những đoạn ngẫu nhiên của tất cả trình tự nucleotide dọc theo DNA của sinh vật và hầu như không phụ thuộc vào loại tế bào nào dùng để lấy DNA. Ngược lại, các dòng c-DNA chỉ chứa những đoạn gen đã được phiên mã ra mRNA và vì tế bào của các mô đã được biệt hóa sẽ có các loại mRNA khác nhau nên ngân hàng c-DNA nhận được sẽ phụ thuộc vào kiểu tế bào được sử dụng.

Sử dụng **ngân hàng c-DNA** sẽ có nhiều ưu thế. Thứ nhất, các dòng c-DNA chứa **trình tự mã hóa liên tục** của một gen. Nhiều gen ở *Eukaryotae* là gián đoạn, có chứa nhiều intron không mã hóa. Sau quá trình cắt tiền mRNA và nối lại, các đoạn intron bị loại và mRNA trưởng thành có trình tự mã hóa liên tục được tạo thành. c-DNA được tạo ra từ khuôn mRNA trưởng thành nên các dòng c-DNA có thể tổng hợp protein cần thiết với số lượng lớn.

như mong muốn. Thứ hai, nhiều protein được tổng hợp với số lượng lớn do những tế bào chuyên hóa và như vậy trong các tế bào này **mRNA của protein giàu** đó sẽ có tỉ lệ cao và ngân hàng c-DNA được tạo ra từ các tế bào này sẽ có nhiều c-DNA mã hóa cho các protein tương ứng. Sự dồi dào c-DNA một vài loại nào đó làm giảm nhẹ đáng kể việc xác định đúng dòng mong muốn từ ngân hàng gen. Ví dụ, hemoglobine được tạo ra với số lượng lớn ở hồng cầu, các mRNA globine có tỉ lệ cao, nên các gen globine thuộc số những gen đầu tiên được tạo dòng.

Bằng con đường này, đã nhận được và tạo dòng các gen mã hóa cho globine của người, động vật và chim, cho protein thủy tinh thể mắt bò, cho ovalbumine (protein lòng trắng trứng), cho fibroin tơ tằm. Phương pháp này cũng được sử dụng để thu nhận, tạo dòng và biểu hiện các gen interferon của người trong các vi khuẩn. Có dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp 5 mg interferon trong một lít dung dịch vi khuẩn, nhiều hơn 5000 lần so với lượng có trong một lít máu người.

Hiện nay, số lượng ngân hàng gen của DNA nhiễm sắc thể và c-DNA không ngừng tăng, chúng là nguồn cho các nhà nghiên cứu, đồng thời một số đáng kể được thương mại hóa. Đáng lưu ý là năm 1992, các nhà khoa học Mỹ đã tạo được các dòng c-DNA của 2375 gen của bộ não người.

Phương pháp sinh tổng hợp gen từ mRNA ngày càng được phát triển, nó kết hợp với các phương pháp khác của sinh học phân tử dẫn đến những ứng dụng trong nhiều lĩnh vực.

III. CÁC VECTOR CHUYỂN GEN

1. Vì sao cần có vector chuyển gen ?

Để **chuyển gen** từ sinh vật này sang sinh vật khác, có thể thực hiện **biến nạp** bằng DNA hoặc bơm thẳng DNA vào tế bào. Muốn **chuyển gen có chủ định** không thể thực hiện biến nạp đơn giản bằng cách chỉ tách DNA rồi trộn với hỗn hợp tế bào vì nhiều hạn chế :

– Nếu DNA thâm nhập vào tế bào thì phần lớn bị **phân hủy**, chỉ số ít phân tử do **tái tổ hợp** gắn vào bộ gen tế bào chủ mới có thể cùng tồn tại ổn định. DNA không được tái tổ hợp và không tự sao chép ra nhiều bản sao sẽ **mất trong phân bào**.

– Thêm vào đó, các gen thường chỉ có **1 bản duy nhất** trong tế bào đơn bội, lại chiếm một đoạn rất nhỏ chìm lẫn trong phân tử DNA khổng lồ, nên khó chuyển gen có chủ định.

– Muốn chuyển gen có chủ định cần có chỉ đoạn *gen mong muốn với số lượng lớn*, mà nếu không sao chép gen ra nhiều bản (tạo dòng) thì khó thực hiện.

Ý tưởng về vector chuyển gen bắt nguồn từ các *plasmid của vi khuẩn*. Trong chương trước, chúng ta biết các plasmid là những đoạn DNA nhỏ vòng tròn, có khả năng *sao chép* để tồn tại độc lập trong tế bào. Chúng có khả năng *mang một số gen* của vi khuẩn và các gen này có thể biểu hiện ra protein. Do đó các vật chuyển gen (vector) được sử dụng đầu tiên và dạng đơn giản nhất là các plasmid của vi khuẩn.

Vector chuyển gen là phân tử DNA có khả năng tự tái sinh, tồn tại độc lập trong tế bào và mang được gen cần chuyển. Các vector chuyển gen phải thỏa mãn các yêu cầu tối thiểu :

- Có các trình tự *khởi sự sao chép (ori)* để có thể tự sao chép mà tồn tại độc lập.
- Có các *trình tự nhận biết* (palindrom), nơi mà các restriction endonuclease nhận biết để cắt bỏ làm chỗ ráp đoạn gen lạ vào. Các trình tự này thường nằm xa điểm xuất phát sao chép để tránh bị cắt nhầm.
- Các *trình tự điều hòa* (promoter) tạo thuận lợi cho sự phiên mã gen lạ.
- Đảm bảo sự di truyền *bền vững của DNA tái tổ hợp* ở dạng độc lập hay gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ.
- Có *các gen đánh dấu* để dễ dàng phát hiện ra chúng hoặc các gen lạ gắn vào.

Ngoài ra chúng còn phải có những đặc tính bổ sung khác để cho việc tạo dòng dễ thực hiện :

- Chứa các gen làm vô hiệu hóa đoạn DNA không mong muốn bị gắn vào.
- Có nhiều bản sao để tách được ra khỏi tế bào với số lượng lớn và đảm bảo sự khuếch đại của gen gắn vào.
- Có các trình tự nucleotide cần thiết cho sự biểu hiện của gen như *promoter, rbs* (ribosome binding site - trình tự gắn với ribosome để dịch mã).

Giá trị của các vector ở chỗ nó được cấu tạo như thế nào để thuận tiện cho mục đích sử dụng. Không có vector toàn năng cho chuyển gen, mà cần có sự chọn lựa tùy đối tượng, tùy kích thước đoạn gen được tạo dòng. Chúng được cấu tạo với nhiều tính chất chuyên biệt để mang được các trình tự nucleotide như mong muốn.

Các vector chuyển gen có 5 ứng dụng quan trọng chủ yếu :

- *Tạo dòng và khuếch đại* trình tự của DNA (nhiều bản sao giống nhau).

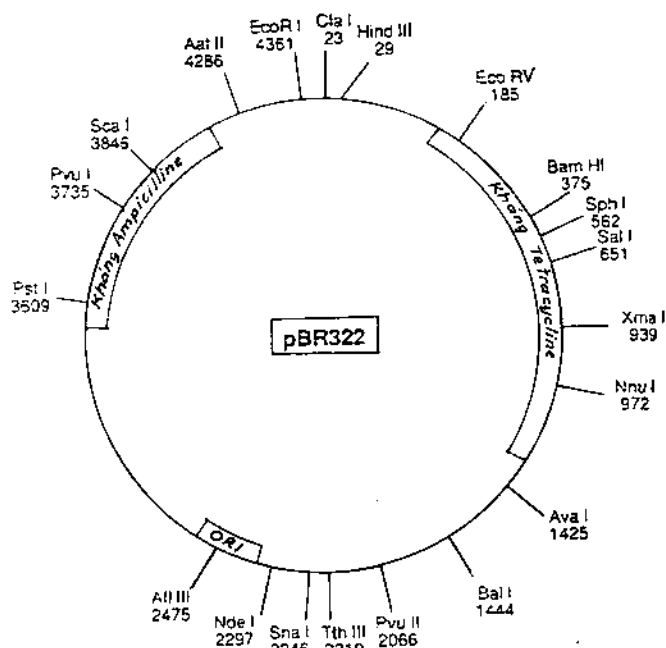
- Nghiên cứu sự **biểu hiện** của một đoạn trình tự của DNA.
- **Đưa gen** vào các tế bào vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men) hay các động thực vật (transfection- cho nhiễm gen).
- **Sản xuất RNA.**
- **Sản xuất protein** từ gen được tạo dòng.

Do có tầm quan trọng trong nhiều ứng dụng như vậy, nên các vector được hoàn thiện không ngừng, từ những vector plasmid tự nhiên ở vi khuẩn vào đầu những năm 70, tiến tới nhiều loại vector phức tạp, đến nhiễm sắc thể nhân tạo.

2. Các vector chuyển gen là plasmid

Ở các sinh vật *Prokaryotae*, các vector thường được sử dụng là các plasmid của vi khuẩn và các bacteriophage. Các plasmid được sử dụng đầu tiên làm vector chuyển gen. Chúng được cải biến để ngày càng thuận tiện hơn cho kĩ thuật tái tổ hợp DNA qua 3 thế hệ.

Thế hệ đầu tiên là các **plasmid tự nhiên**, đến nay hầu như không còn sử dụng nữa. **Thế hệ thứ hai** là các **plasmid được cấu tạo phức tạp** hơn. Một trong những plasmid được sử dụng rộng rãi nhất là **pBR 322** (hình 14.5), bắt nguồn từ một plasmid nhỏ *ColE1*. Nó được cấu tạo nên từ nhiều đoạn của các

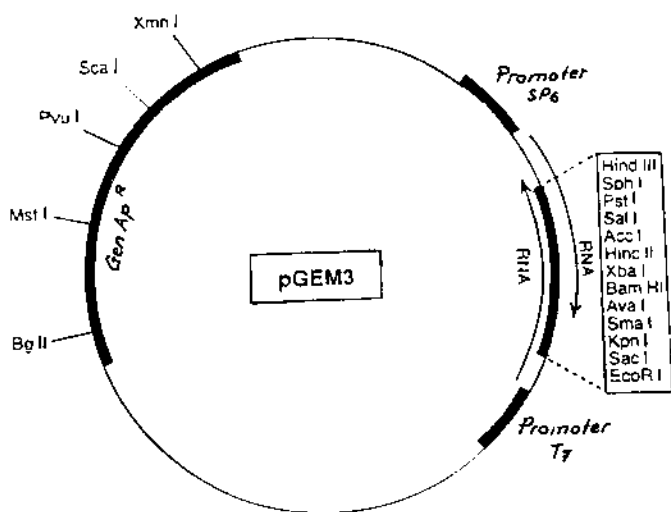


Hình 14.5. Plasmid pBR 322

plasmid khác nhau để vừa có được các gen kháng thuốc, vừa có các điểm nhận biết cho các enzyme hạn chế và có chiều dài khoảng 5000 cặp base. Như hình vẽ mô tả, plasmid này có gen kháng ampicilline (*amp^R*), gen kháng tetracycline (*tet^R*), trình tự xuất phát sao chép (*ori*) và nhiều trình tự nhận biết đặc hiệu cho các restriction endonuclease như *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *Sall*, ... Ở đoạn gen *amp^R* có 3 điểm nhận biết, ở gen *tet^R* có 6 điểm nhận biết, những điểm này giúp dễ phát hiện các plasmid có gen lạ gắn vào. Ví dụ, nếu cắt plasmid bằng enzyme *BamHI* rồi gắn gen lạ vào chỗ cắt thì gen *tet^R* bị phân đôi do đoạn DNA lạ nên tế bào mất khả năng kháng (tetracycline), nhưng vẫn kháng ampicilline.

Plasmid này có khả năng sao chép độc lập với tế bào *E.coli* và tồn tại với số lượng trung bình 20-30 bản sao cho mỗi tế bào. Trong những điều kiện nuôi cấy nhất định có thể khuếch đại có chọn lọc làm tăng số plasmid đến hơn 1000 bản sao cho một tế bào.

Thế hệ thứ ba là các **plasmid đa năng** (polycleaning plasmid) và **chuyên dụng**. Để tiện cho việc sử dụng nhiều loại restriction endonuclease khác nhau **cả chục trình tự nhận biết** của chúng được xếp nối tiếp nhau thành một đoạn dài gọi là **polylinkers** (đa nối). Có thể kể một số plasmid thông dụng như họ pUC, họ Gemini (hình 14.6).



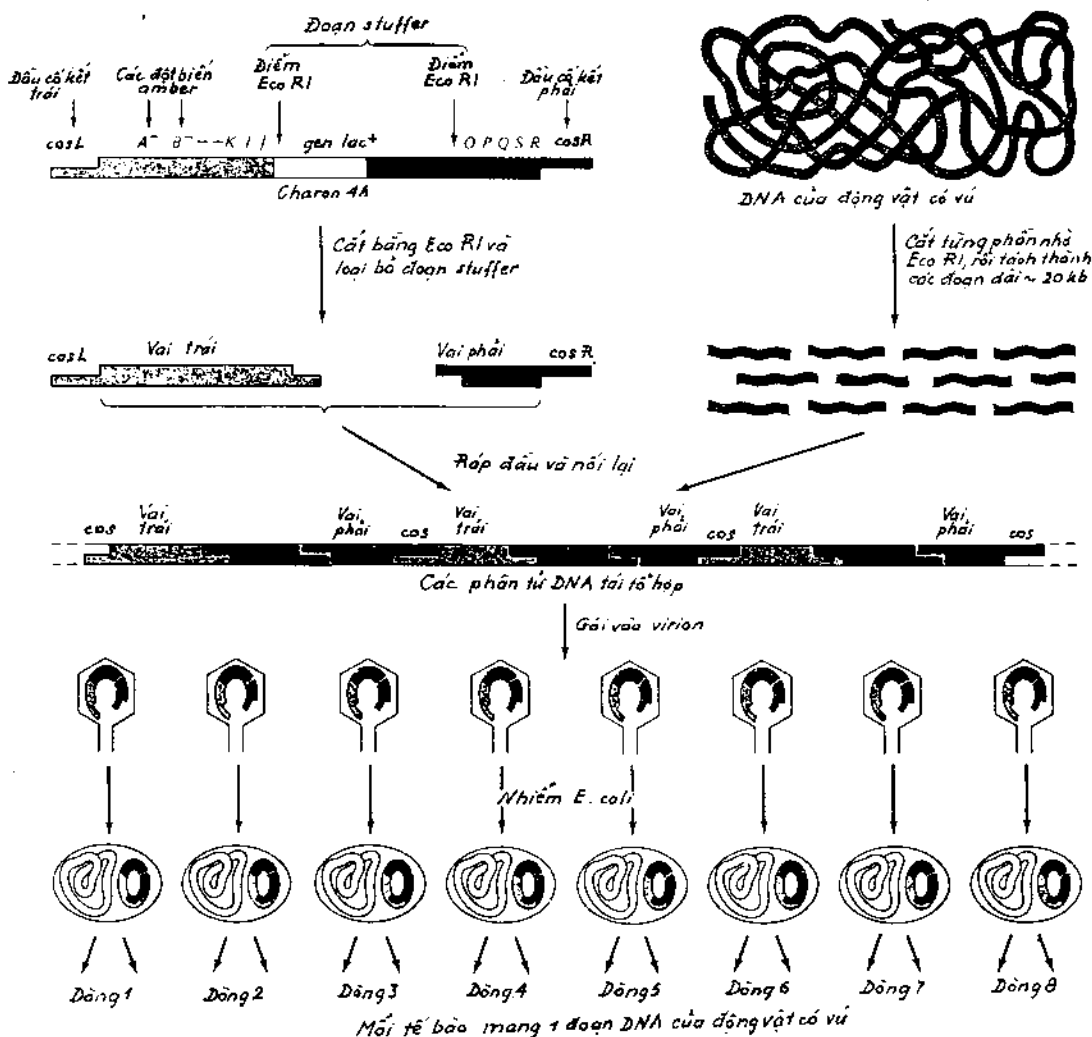
Hình 14.6. Họ các plasmid Gemini và polylinkers của nó

Ngoài ra rất nhiều plasmid được cấu tạo để thực hiện các kĩ thuật chuyên biệt, đang được bán rộng rãi trên thị trường.

Các plasmid vi khuẩn có thể chứa đoạn DNA lạ có chiều dài khoảng 3-10 kb.

3. Các vector chuyển gen là phage λ

Các phage, virus của vi khuẩn cũng được dùng làm vector chuyển gen vì nhiều phage có khả năng thực hiện *tải nạp* mang gen từ tế bào vi khuẩn cho (donor) sang tế bào nhận (recipient). **Vector phage λ** được sử dụng rộng rãi để **lập ngân hàng gen**, vì nó mang được đoạn DNA lớn hơn (15-23 kb), dễ bảo quản, dễ tách ra để phân tích (hình 14.7). Ưu điểm nổi bật của các phage là



Hình 14.7. Bản đồ gen của phage λ và sự tạo dòng DNA động vật có vú ở vector phage λ.

Đoạn gen từ J tới N có thể được thay thế bằng DNA lạ

Các gen "cos" tạo đầu cố kết là *cosL* (trái) và *cosR* (phải) để gắn lại tạo phân tử vòng tròn, các gen này còn có tác dụng làm DNA của phage để lắp vào vỏ protein của phage

chúng có **hệ thống tự động xâm nhập** và **sinh sản** trong tế bào vi khuẩn với hiệu quả cao hơn nhiều so với việc đưa plasmid vào tế bào vi khuẩn bằng biến nạp. Tuy nhiên các thao tác ban đầu có phức tạp hơn.

Ở phage λ , DNA có thể thay thế khoảng một phần ba vùng gọi là "**stuffer**" (trung tâm "nhồi rơm") nằm giữa các gen J và N (hình 14.7) mà vẫn sinh sản trong tế bào vi khuẩn chủ và có thể làm tan tế bào chủ. DNA của phage có thể ở dạng thẳng, khi bị cắt ở giữa rời ra thành 2 vai: **phải** và **trái**. Đoạn gen lạ được ráp vào giữa sao cho DNA tái tổ hợp không lớn hơn 105% hay nhỏ hơn 78% của bộ gen bình thường của phage λ . Khả năng có thể mang đoạn DNA lạ dài hơn của plasmid là một ưu thế của phage. Hơn thế nữa, sự gói gọn DNA vào đầu phage phụ thuộc ngoài các nhân tố khác còn có chiều dài của DNA, nếu lớn hơn 105% hay nhỏ hơn 78% bộ gen bình thường của phage λ thì khó lắp vào đầu (vỏ) của phage. Điều đó có nghĩa rằng khi lấy đoạn trung tâm ra (chỉ còn 60% chiều dài bình thường của phage) thì nó quá ngắn để lắp vào đầu, nó chỉ gắn được khi DNA lạ lắp thêm vào chỗ trống. Nhờ vậy, dễ xác định DNA lạ đã gắn vào phage chưa và đồng thời tính chất này cũng giúp loại bỏ các phage khi đoạn DNA lạ bị cắt rời ra.

Phage λ gt 11 (Huỳnh Thanh, 1986) là một vector cải tiến thuận tiện cho sự biểu hiện của gen tạo dòng trong tế bào vi khuẩn.

4. Các vector chuyển gen loại khác ở *Prokaryotae*

a) Cosmid

Cosmid là vector được cấu tạo nên từ **plasmid** có gắn thêm **gen cos** của phage λ . Gen cos giúp cho DNA của phage λ từ dạng thẳng nối đầu lại thành vòng tròn.

Cosmid có khả năng chứa đoạn gen lạ dài đến 45 kb hiện được dùng để lập thư viện gen ở ruồi giấm, chuột, người, ...

b) Phage M13

Vector phage **M13** là phage thể sợi có **DNA mạch đơn** (Single strand filamentous bacteriophage). Sử dụng **phage M13** làm vector nhằm:

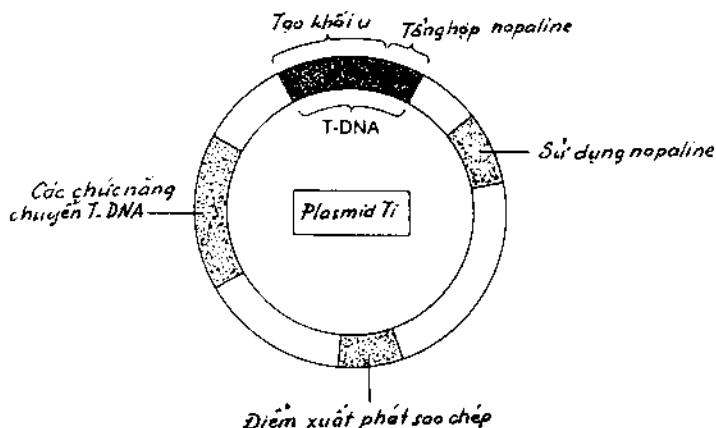
- Xác định **trình tự các nucleotide** của gen.
- Sản xuất các **mẫu thử (hay mẫu dò) DNA** (DNA probes)
- Thực hiện **đột biến định hướng** (site-directed mutagenesis).

c) Phagemid

Phagemid là vector được cấu tạo từ **plasmid** gắn thêm một **đoạn DNA của phage M13**.

5. Plasmid Ti

Plasmid được sử dụng rộng rãi trong chuyển gen ở thực vật bắt nguồn từ vi khuẩn trong đất là *Agrobacterium tumefaciens* có khả năng tạo khối u (tumor) ở thực vật. Nhân tố gây khối u là **plasmid Ti** (tumor-inducing) có DNA vòng tròn khoảng 200kb (hình 14.8). T-DNA là phần quan trọng của plasmid, nó được chuyển và gắn xen ngẫu nhiên vào bộ gen của tế bào thực vật chủ. Các chức năng thực hiện chuyển nằm ngoài T-DNA, nhưng trên plasmid Ti. Nay đã có nhiều cải biến được thực hiện để plasmid Ti trở thành vector thuận tiện trong chuyển gen vào thực vật.



Hình 14.8. Plasmid Ti ở dạng đơn giản hóa

6. Nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men YAC

Cho đến nay, ở *Eukaryotae* chỉ tìm được một loại plasmid duy nhất đó là **plasmid vòng tròn 2 micrometer** (2 μ circle plasmid) dài khoảng 6300 cặp base, có nhiều trong tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Sự cải tiến plasmid này qua nhiều bước tạo thành nhiễm sắc thể nhân tạo ở nấm men được gọi tắt là YAC (yeast artificial chromosome). Hình 14.9 mô tả nhiễm sắc thể nhân tạo đơn giản nhất **pYAC2** và quá trình tái tổ hợp gắn đoạn DNA gen lạ. Nó có chứa các trình tự nucleotide quan trọng :

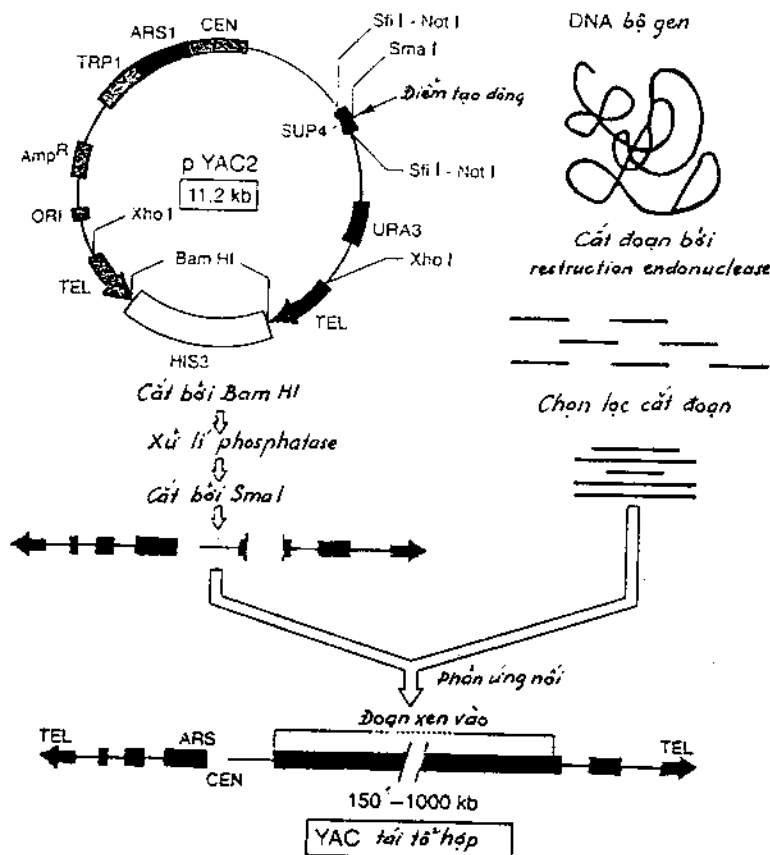
- ARS (autonomously replicating sequence) **trình tự sao chép** tương tự ori ở plasmid.

- CEN (centromere - **tâm động**), trình tự CEN đảm bảo sự chia đôi và di về 2 cực tế bào như tâm động.

- 2 TEL (telomere) là 2 trình tự duy trì **2 đầu mút thẳng** mà không bị cắt, vẫn sao chép và phân chia của nhiễm sắc thể.

– Các gen đánh dấu, *ori*, *Amp^R* từ plasmid pBR322 để sinh sản và chọn lọc trong tế bào *E. coli*. Các trình tự *URA3* (khuyết dưỡng Uracil) và *TRP1* (tryptophane) để chọn lọc các tế bào nấm men có chứa *YAC* và *SUP4* (*tRNA^{trp}* suppressor (*sup4* orche) - gen mã hóa cho chất ức chế *tRNA* vận chuyển của tyrosine), dấu hiệu về sự hiện diện *YAC tái tổ hợp* trong tế bào nấm men. *HIS3* (histidine) cho biết *YAC* được cắt để đuổi thẳng chứa.

– Các điểm nhận biết cho restriction endonuclease *Sma I*, *Bam HI*, *Xho I* và *Sfi I* - *Not I*.



Hình 14.9. Nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men pYAC2 và quá trình gắn gen lạ

Quá trình tái tổ hợp gắn đoạn DNA gen lạ vào như sau. Đầu tiên cắt bằng enzyme hạn chế *Bam HI* để loại bỏ đoạn có *HIS3* làm *YAC đuổi thẳng* với 2 đầu mút là TEL. Tiếp theo sử dụng enzyme *Sma I* cắt thành 2 phần : *vai phải và trái*; đồng thời các vai được xử lý enzyme *alkaline phosphatase* để chúng không tự gắn lại như cũ. Các đoạn DNA lạ (dài 150 - 1000 Kb) được thu nhận từ bộ gen (ví dụ, DNA của người) nhờ cắt bởi restriction endonuclease thích hợp, sao cho các đầu mút của chúng *ráp vào YAC* để

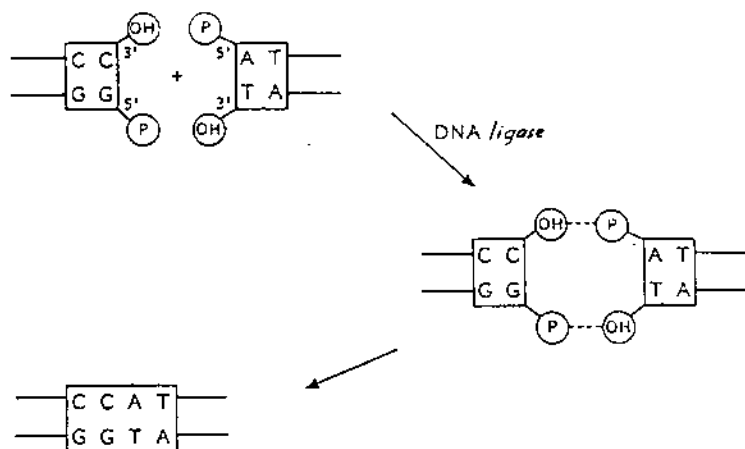
dòng. Ủ hỗn hợp với *enzyme ligase* để nối liền đoạn DNA lạ nằm giữa vai phải và trái. Sau đó có thể thực hiện biến nạp đưa *YAC tái tổ hợp* (đã mang gen lạ) vào tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* hay vi khuẩn *E. coli*.

MAC (Mammalian artificial chromosome) là các nhiễm sắc thể nhân tạo dùng cho tế bào động vật có vú.

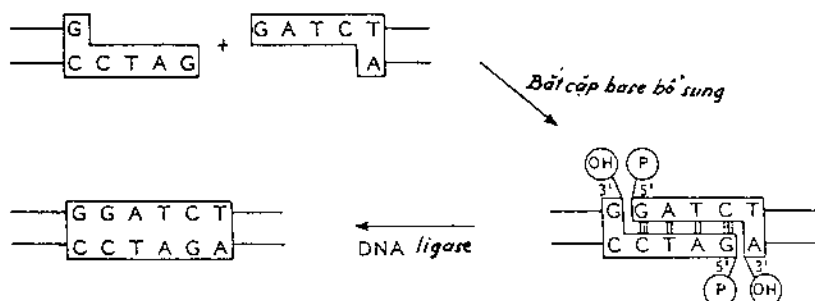
IV. TẠO PLASMID TÁI TỔ HỢP

Bước tiếp theo của kĩ thuật di truyền là gắn các đoạn DNA hay các c-DNA vào vector chuyển gen để tạo nên plasmid có mang DNA lạ được gọi là *plasmid tái tổ hợp* (recombinant plasmid) hay *khảm* (chimeric). Có nhiều phương pháp gắn các đoạn DNA vào vector chuyển gen. Phản ứng sau cùng được thực hiện nhờ enzyme DNA ligase.

a) Nối đầu tào



b) Nối đầu có kết



Hình 14.10. DNA ligase và các phản ứng nối.

a) Phản ứng nối các đầu tào ; b) Phản ứng nối các đầu có kết.

1. Các DNA ligase

Quá trình nối 2 phân tử DNA với nhau, tạo phân tử DNA tái tổ hợp mới, được xúc tác bởi một nhóm enzyme gọi là **ligase**. Các enzyme ligase hiện diện trong tất cả các loại tế bào và có vai trò trọng yếu trong sao chép và duy trì sự ổn định của nucleic acid. Chúng xúc tác **phản ứng nối** (ligation) bằng cách hình thành **cấu phosphodiester** nối các nucleotide kề cận hay chụm đầu với nhau. Điều kiện cần bản đối với tất cả các phản ứng nối là phải có ít nhất một gốc P ở đầu mút của các phân tử được nối. Có hai kiểu phản ứng nối phụ thuộc vào đầu mút của các đoạn DNA (hình 14.10).

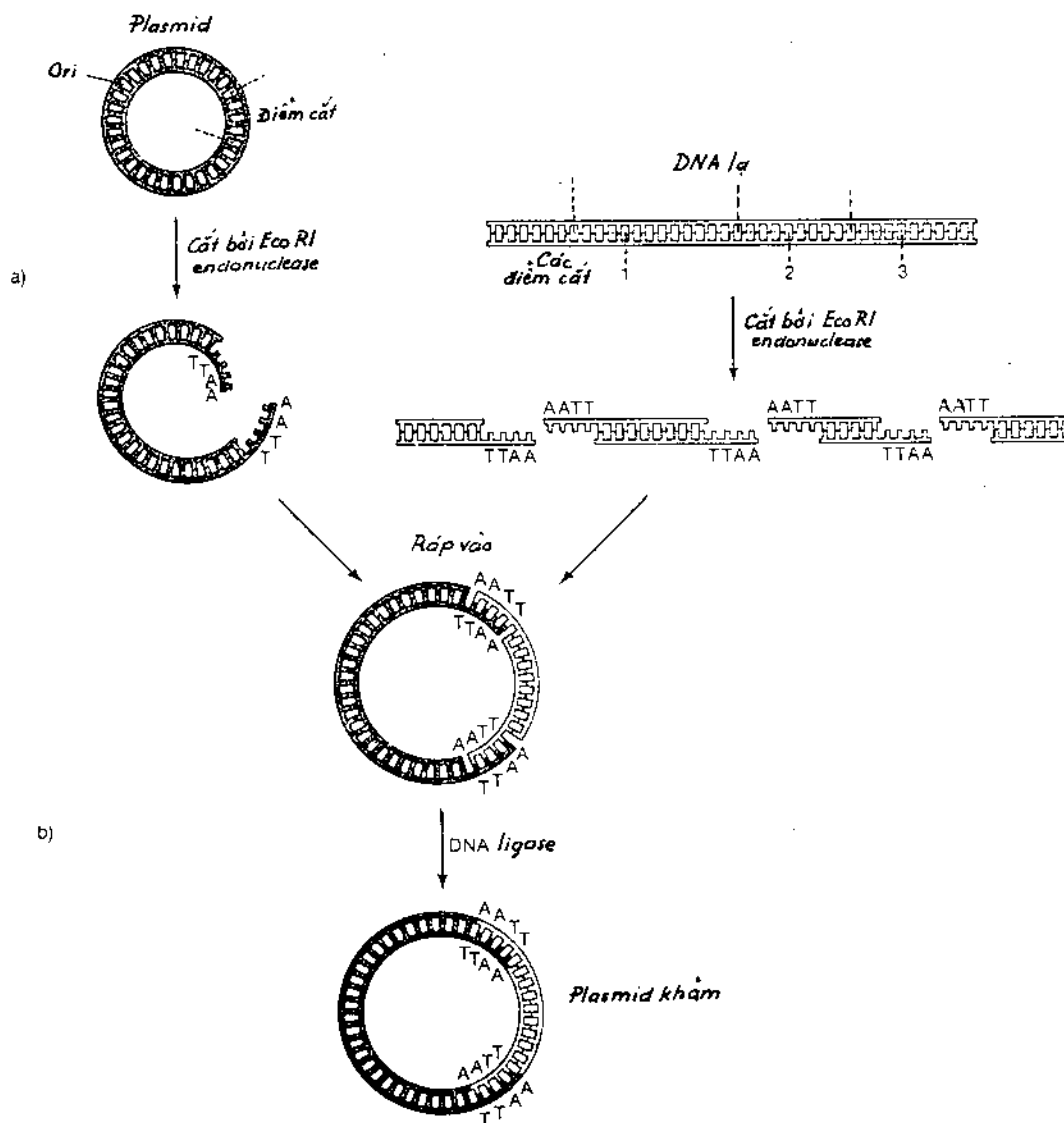
Phản ứng **nối các đầu cổ kết** hay “dính” (sticky or cohesive- end ligation) có hiệu quả cao hơn 50 -100 lần so với phản ứng **nối đầu tù** (blunt-end ligation). Nhưng các đầu cổ kết phải có trình tự bổ sung.

Hai enzyme ligase được sử dụng phổ biến là **DNA ligase** của *E.coli* và DNA ligase của *phage T4* (**T4 DNA ligase** nhận được từ tế bào *E.coli* nhiễm phage T4). Chúng được bán ở thị trường như các enzyme restriction endonuclease.

T4 RNA ligase cũng là enzyme thông dụng, nó xúc tác phản ứng nối giữa nhóm 5'P và 3'OH của các phân tử **DNA** và **RNA mạch đơn**.

2. Phương pháp đơn giản dùng các đầu cổ kết

Vector chuyển gen là DNA vòng tròn được cắt bởi một loại restriction endonuclease (ví dụ EcoRI) chuyển thành dạng thẳng có hai đầu cổ kết. Các phân tử DNA của bộ gen khác được cắt bởi cùng loại restriction endonuclease (EcoRI) sẽ tạo ra nhiều đoạn DNA thẳng có các đầu cổ kết. Trộn lẫn DNA thẳng của vật chuyển gen với các đoạn DNA lạ, các đầu cổ kết của hai loại DNA bổ sung sẽ bắt cặp với nhau. Enzyme ligase hàn dính các loại DNA lại với nhau tạo ra plasmid tái tổ hợp. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi để lập ngân hàng gen của một sinh vật.



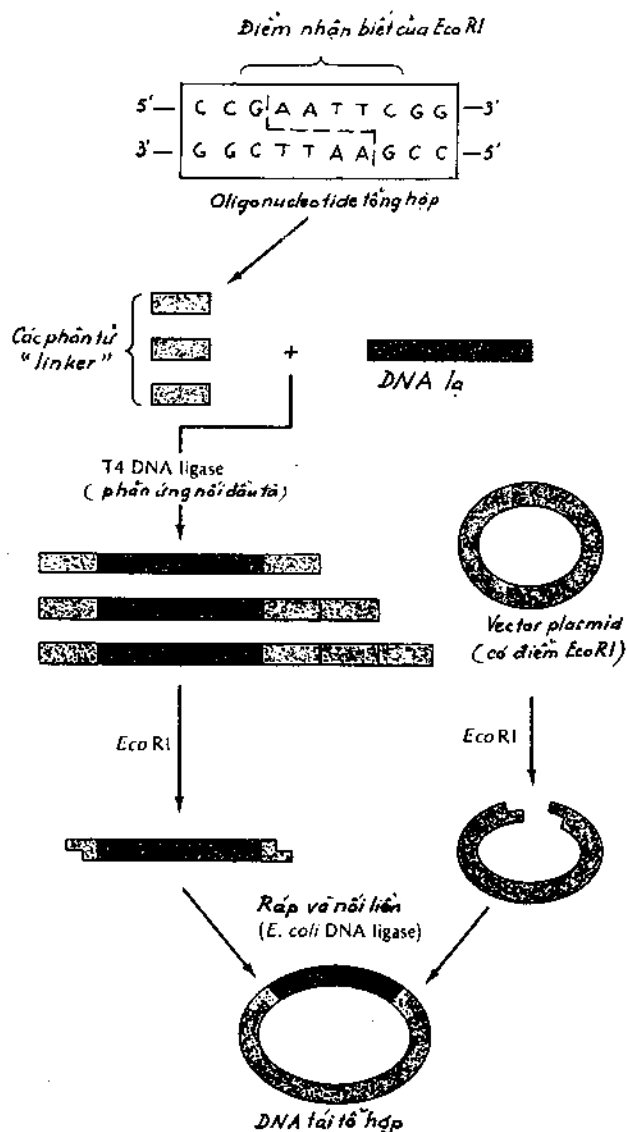
Hình 14.11. Sự gắn DNA lạ vào vector chuyển gen nhờ các đầu có kết.

- a) Cắt plasmid và DNA lạ bằng restriction endonuclease (*EcoRI*);
b) Các đoạn ráp vào và DNA ligase hàn liền lại. (S.N.Cohen, 1975).

3. Phương pháp dùng các đoạn nối (linkers)

Các đoạn *oligonucleotide* (đoạn DNA hay RNA ngắn có 10 đến 20 nucleotide) có thể được tổng hợp hóa học nhân tạo. Như trên hình 14.12 mô tả, các phân tử oligonucleotide ngắn được tổng hợp sao cho ở giữa có *trình tự palindrom đặc hiệu* đối với một restriction endonuclease (ví dụ, *EcoRI*) để

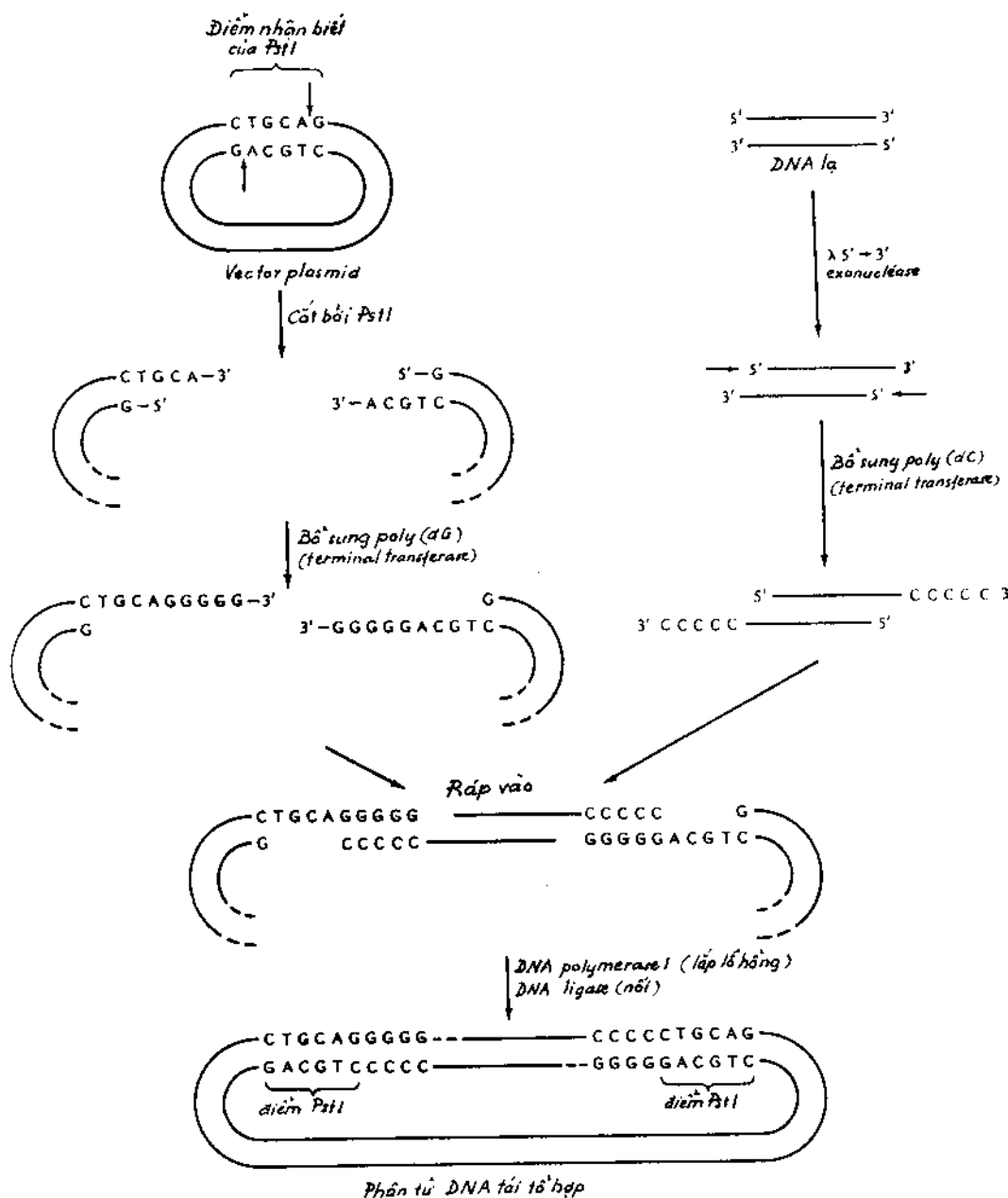
làm các đoạn nối (linkers). *Ligase DNA* của phage T4 có đặc tính nối các đoạn DNA đó lại với nhau. Nhờ vậy đoạn DNA lạ có thể gắn với các đoạn oligonucleotide tổng hợp với trình tự cần thiết. Các đoạn nối sẽ gắn vào hai đầu của đoạn DNA lạ và khi cắt bằng restriction endonuclease (ví dụ, *EcoRI*) nó sẽ có 2 đầu cố kết của *EcoRI*. Nó có thể được gắn vào vector chuyển gen cũng bị cắt bởi *EcoRI*, mặc dù bản thân nó trước đó không có các trình tự nhận biết đặc hiệu đối với restriction endonuclease. Phương pháp này thường được sử dụng để gắn các c-DNA và các đoạn DNA có đầu mút tào vào plasmid.



Hình 14.12. Dùng các đoạn nối linkers tạo DNA tái tổ hợp

4. Phương pháp dùng enzyme terminal transferase

Phương pháp thứ ba này dựa vào khả năng đặc biệt của enzyme *terminal nucleotidyl transferase* có thể gắn cùng một loại nucleotide thành chuỗi (*homopolymer*) vào đầu mút 3'OH của mạch DNA.



Hình 14.13. Dùng enzyme terminal transferase gắn DNA λ vào plasmid

Như hình 14.13 mô tả, một loại DNA có *đầu hydroxyl-3'OH* hở do bị cắt bởi exonuclease hay restriction endonuclease, được *ủ với enzyme terminal transferase* và được thêm vào *một loại nucleotide* (ví dụ, *dGTP*). Plasmid có điểm nhận biết đặc hiệu do restriction endonuclease *PstI* cắt, sau khi *ủ với terminal transferase* nó tạo hai đầu müt *3'-GGGGG*. Đồng thời DNA lạ cũng được cắt và xử lí với terminal transferase, chỉ khác là thêm vào loại nucleotide bất cặp bổ sung đó là *dCTP* để tạo các đuôi *3'CCCCC*. Khi trộn lẫn hai loại DNA với nhau, các đầu müt của 2 loại homopolymer có trình tự bổ sung với nhau sẽ bắt cặp ($---GGGGG\ 3'/3'\ CCCCC---$) nên đoạn DNA lạ có thể gắn vào plasmid. Enzyme DNA polymerase I sẽ gắn các nucleotide tương ứng vào các chỗ trống và ligase sẽ hàn dính lại. Trên plasmid khảm có hai điểm nhận biết của *PstI*, điều này tạo thuận lợi về sau khi muốn cắt đoạn DNA lạ rời ra.

Các phương pháp trên đây có thể sử dụng để gắn các đoạn DNA của bộ gen hay các c-DNA vào bất kì vector chuyển gen nào. Nếu ở giữa các đoạn DNA lạ hay các c-DNA có các điểm nhận biết của restriction endonuclease thì nó có thể bị cắt ở giữa. Để tránh các đoạn DNA lạ bị cắt ở giữa, có thể sử dụng *enzyme methylase* để *methyly hóa* đoạn đó.

V. BIẾN NẠP DNA TÁI TỔ HỢP VÀO TẾ BÀO

Sau khi tạo được *DNA tái tổ hợp*, việc tiếp theo là BIẾN NẠP đưa nó vào lại tế bào chưa mang plasmid. Nói chung, để đưa DNA tái tổ hợp vào các loại tế bào khác nhau thường sử dụng *biến nạp* với nhiều cách.

1. Hóa biến nạp

DNA tái tổ hợp (plasmid mang đoạn gen lạ) được *ủ với số lượng lớn tế bào vi khuẩn* chưa có plasmid. Đối với tế bào vi khuẩn có thể xử lí CaCl_2 lạnh, kèm sốc nhiệt (42°C trong 2 phút) thì DNA tái tổ hợp xâm nhập vào tế bào nhiều hơn. Hiệu quả tạo các *thể biến nạp* (transformants) cao (10^5 - 10^6 transformants/1 mg của DNA siêu xoắn). Những cải tiến tiếp theo đã làm tăng hiệu quả biến nạp lên gấp 100-1000 lần so với ban đầu. Từ năm 1970 trở đi, vấn đề đưa plasmid tái tổ hợp trở lại vào tế bào vi khuẩn đã dễ dàng, coi như không có khó khăn gì đáng kể.

Đối với *tế bào động vật* có vú, để thực hiện biến nạp có thể dùng phương pháp *hấp thụ DNA qua trung gian phosphate calcium* (calcium phosphate mediated DNA uptake). Phương pháp này cho hiệu quả thấp, tốt nhất chỉ 1-2% tế bào hấp thụ, đôi khi chỉ $1/10^6$ tế bào.

2. Điện biến nạp

Sử dụng *dòng điện cao thế cục bộ theo xung* (pulse) có thể làm tế bào hấp thụ DNA nên được gọi là *điện biến nạp* (electrotransformation hay electroporation). Lúc đầu phương pháp này được sử dụng ở tế bào động vật có vú, về sau cho cả tế bào thực vật. Hiệu quả biến nạp cao có thể đến 10^9 - 10^{10} transformants/1mg DNA (cao gấp 10 đến 20 lần so với xử lý hóa chất). Đoạn DNA biến nạp có kích thước lớn (25-135kb). Tuy nhiên tỉ lệ *tế bào chết đáng kể*, hiệu quả cao ở tỉ lệ chết 50-70%. Khó khăn khác là phải chế dụng cụ chuyên biệt tạo dòng điện có điện thế cao cho một khối lượng xử lý nhỏ (20 đến 40 microliter). Dụng cụ này đã có bán ở thị trường.

3. Vi tiêm (Micro-injection)

Đối với các tế bào động vật có vú (thường là các hợp tử) có thể *tiêm thẳng DNA* tái tổ hợp vào tế bào. Đây là phương pháp thông dụng có hiệu quả trong chuyển gen ở tế bào động vật có vú, tạo các *động vật nhiễm gen* (transgenic animals).

4. Bắn DNA vào tế bào

Đối với tế bào thực vật, muốn thực hiện biến nạp phải tạo *tế bào trần* mất vách tế bào thì DNA mới ngấm được vào trong. Việc tạo tế bào trần không đơn giản, tốn công sức và thường tế bào có sức sống kém, khó phân chia để tự tái sinh (regeneration). Để khỏi phải làm những công việc kể trên, phương pháp *bắn DNA tái tổ hợp trực tiếp* vào tế bào thực vật được sử dụng. Các *hạt kim loại tungsten* hay *vàng* (đường kính trung bình 4 micrometer) mang DNA hoặc RNA được bắn (theo đúng nghĩa) với tốc độ nhanh xuyên thủng vách tế bào đưa vào trong. Phương pháp này có nhiều ưu thế và được dùng nhiều trong tạo các *thực vật nhiễm gen* (transgenic plants).

Ngoài ra, còn nhiều phương pháp khác đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào như :

- Sử dụng *màng lipid* bao DNA để đưa vào tế bào. Ví dụ: sử dụng cấu trúc *tương tự liposome*.

- Dùng *tinh trùng* mang DNA tái tổ hợp xâm nhập tế bào trứng.

Như vậy, đến nay có nhiều phương pháp hóa, lí, cơ học và sinh học để đưa DNA tái tổ hợp biến nạp vào tế bào. Tùy các đối tượng và yêu cầu cụ thể, phương pháp này hay nọ có hiệu quả và được sử dụng nhiều hơn.

Các *vector virus* tự động thực hiện *tải nạp* (transduction) đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào với hiệu suất cao hơn nhiều, nên cũng được sử dụng rộng rãi ở cả tế bào người, động và thực vật.

VI. CHỌN LỌC, TẠO DÒNG VÀ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN

Công việc tiếp theo là kiểm tra sự hiện diện của gen mong muốn. Việc **chọn lọc** đúng dòng tế bào như ý không đơn giản và tốn nhiều công sức. Khi xác nhận DNA tái tổ hợp đã xâm nhập vào tế bào và mang đúng gen cần thiết thì chúng được sinh sản để **tạo dòng** và tạo điều kiện cho gen **biểu hiện**.

1. Xác định dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp

Trong thí nghiệm tạo plasmid tái tổ hợp, hỗn hợp plasmid và số lượng lớn phân tử DNA được cắt bởi cùng một restriction endonuclease trộn lẫn với nhau và cho enzyme ligase DNA nối lại. Hỗn hợp này có plasmid tái tổ hợp lẫn với các plasmid không có gen lạ xen vào và nó lại được trộn lẫn với các tế bào vi khuẩn để thực hiện biến nạp. Sau đó cho chúng lên môi trường dinh dưỡng để mọc thành các dòng tức các khuẩn lạc vi khuẩn. Do cách tiến hành thí nghiệm trong một hỗn hợp không đồng nhất như vậy nên các dòng vi khuẩn mọc lên có 3 loại như sau:

- Tế bào vi khuẩn không nhận được plasmid.
- Tế bào nhận được plasmid không có gen lạ vào.
- Tế bào vi khuẩn nhận được đúng plasmid tái tổ hợp.

Vì vậy việc xác định đúng các dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp phải mất nhiều công sức. Các số liệu sau đây cho thấy công việc phức tạp cỡ nào. Nếu muốn tạo dòng một gen bất kì nào từ **thư viện bộ gen** người thì phải lấy 1 đoạn từ 100.000 đoạn khác nhau. Hiệu quả biến nạp thường khoảng 1/10.000 plasmid vào được tế bào, mà chỉ số ít có mang gen. Tính ra xác suất mà một tế bào bất kì mang được đoạn gen mong muốn từ thư viện gen của người **thấp hơn 1 phần tỉ**.

Có 3 hướng chính trong thử nghiệm tách dòng từ thư viện DNA là : **lai nucleic acid, phát hiện kiểu hình và phản ứng miễn nhiễm**.

a) Lai nucleic acid

Việc lai nucleic acid có hiệu quả phụ thuộc vào trình tự mục tiêu hiện diện trong khuẩn lạc và thích hợp cho lai với mẫu có trình tự bổ sung (DNA hoặc RNA). Mẫu thử là trình tự nucleic acid được biến đổi hóa học để dễ phát hiện khi có lai với trình tự bổ sung. Phương pháp lai nucleic acid tốt hơn cả.

Vào năm 1975, Grunstein và Hogness đã mô tả phương pháp **làm tan tại chỗ** (*in situ* lysis) của các khuẩn lạc vi khuẩn trên giấy lọc nitrocellulose và DNA thoát ra gắn lên giấy lọc. DNA có thể được lai với các mẫu thử

nucleic acid mang dấu phóng xạ có độ dài cả trăm nucleotide. Hiện nay dễ dàng tuyển chọn hàng trăm hay hàng nghìn khuẩn lạc đồng thời và nhận biết các khuẩn lạc.

b) Phát hiện kiểu hình nhờ bổ sung α (α -Complementation)

Thử nghiệm chọn dòng căn cứ vào kiểu hình đòi hỏi dòng mục tiêu phải có biểu hiện ra ở dạng protein dễ phát hiện bằng các phép thử. Ví dụ, nếu muốn chọn dòng đối enzyme protease chẳng hạn, thì vết tan của mẫu thử protein sẽ giúp phát hiện nhanh. Khó khăn trên được khắc phục một phần đáng kể nhờ phương pháp bổ sung α và mất hoạt tính do xen đoạn.

Nhiều vector được sử dụng (như họ pUC) mang một đoạn ngắn của trình tự điều hòa mã hóa cho 146 amino acid đầu tiên của enzyme β -galactosidase (*lacZ*) xúc tác phản ứng dị hóa đường lactose. Mặc dù tất cả các đoạn của tế bào chủ cũng như của plasmid mỗi cái riêng lẻ không có hoạt tính bổ sung kiểu này. Tuy nhiên, nếu một hệ thống, có **đột biến mất đoạn đầu** của đoạn vận hành (operator segment) của *lacZ* trên plasmid, **được bù đắp** nhờ các thể đột biến âm của β -galactosidase có **operator nguyên vẹn** ở tế bào chủ, sẽ có kiểu hình Lac^+ và được gọi là **bổ sung α** . Các vi khuẩn có kiểu hình Lac^+ được nhận biết nhờ sự đổi màu của **X-gal** (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) làm khuẩn lạc có **màu xanh**.

Nếu đoạn **DNA lạ gắn vào chỗ điều hòa** của plasmid, làm gen bị sai hỏng không thực hiện phản ứng biến đổi X-gal thì khuẩn lạc **màu trắng**. Nhờ phản ứng màu này có thể nhanh chóng nhận biết bằng mắt thường các khuẩn lạc chứa plasmid có mang DNA lạ (màu trắng) lẫn trong đám khuẩn lạc màu xanh (không mang DNA tái tổ hợp).

c) Mất hoạt tính do xen đoạn

Phương pháp này chỉ có thể sử dụng đối với các vector (ví dụ : pBR 322) có mang hai hoặc nhiều hơn các **gen kháng thuốc** và trên các gen này có những điểm nhận biết của các enzyme restriction endonuclease. Các đoạn DNA cần gắn vào và plasmid được phân cắt với các restriction enzyme mà điểm nhận biết của chúng nằm chỉ trên một gen kháng thuốc (ví dụ, gen kháng tetracycline *tet^R*). Nếu đoạn DNA lạ xen vào giữa gen *tet^R* làm mất hoạt tính kháng tetracycline do đó phương pháp này được gọi là **mất hoạt tính do xen đoạn** (insertional inactivation). Hỗn hợp DNA đã thực hiện phản ứng nối được đem biến nạp trở lại vào tế bào vi khuẩn *E.coli* để tạo tế bào chứa plasmid mang gen lạ mong muốn. Sau khi thực hiện biến nạp xong, tế bào *E.coli* sẽ có thể có 3 loại với kiểu gen và kiểu hình như sau :

- Tế bào *E.coli* **không nhận plasmid** : Kiểu gen nhạy cảm với ampicillin (amp^S) và tetracycline (tet^S) không mọc được trên môi trường có chứa ampicilline, tetracycline.

- Tế bào *E.coli* nhận được plasmid, nhưng **gen lạ chưa gắn vào plasmid** : Kiểu gen amp^R và tet^R mọc được trên môi trường chứa ampicilline và tetracycline.

- Tế bào nhận được plasmid tái tổ hợp **mang gen lạ**. Gen tet^R bị mất hoạt tính do gen lạ xen vào các tế bào này có kiểu amp^R kháng ampicilline, nhưng nhạy cảm với tetracycline tet^S , mọc được trên môi trường có ampicilline, nhưng không mọc được trên môi trường có tetracycline. Đây chính là tế bào cần chọn để tạo dòng tế bào mang gen lạ.

Thử nghiệm miễn nhiễm đòi hỏi mục tiêu phải biểu hiện ra dạng protein gắn đặc hiệu với các kháng thể mẫu.

Sự chọn lựa phương pháp nhằm vào các mục tiêu mong muốn. Ngoài ra, cần tính đến chi phí và thời gian tiêu tốn cho thí nghiệm. Nói chung, phương pháp thí nghiệm kiểu hình ít tốn kém. Lai nucleic acid tốn nhiều do màng đặc biệt có giá cao và cần mẫu phóng xạ nên gặp nhiều khó khăn khi bảo quản và di chuyển. Thử nghiệm miễn nhiễm cũng có nhiều tốn kém và nếu không sẵn mẫu thì phải tốn thời gian gây tạo ở thử.

Sau khi đã chọn lọc xong, tế bào được sinh sản để tạo dòng và cho gen biểu hiện.

2. Sự biểu hiện của gen được tạo dòng

Về mặt lí thuyết kĩ thuật tái tổ hợp DNA cho phép đưa bất kì một gen nào từ sinh vật này vào một sinh vật khác. Vấn đề quan trọng tiếp theo là làm sao các gen lạ có sự biểu hiện. Sự biểu hiện của gen trải qua nhiều bước.

Muốn gen tạo dòng có biểu hiện tổng hợp protein cần cấu tạo vector có đủ **các yếu tố phiên mã và dịch mã**. Các vector này được gọi là **vector biểu hiện**.

Nếu gen không nằm giữa **promoter** và **dấu kết thúc**, nó không được phiên mã. Các gen được tổng hợp hóa học hay từ c-DNA không có promoter nên phải gắn chúng cạnh promoter thì mới có biểu hiện phiên mã. Ví dụ: Gen tạo insulin gắn vào vector có mang promoter của operon lactose ở vi khuẩn. Sự phiên mã được bắt đầu khi hiện diện lactose hay các chất tương tự lactose.

Để sự dịch mã được thực hiện, mRNA cần phải mang phía đầu gen trình tự **rbs** (ribosome binding site - điểm bám vào ribosome). Đoạn gen lạ

thiếu điểm bám của ribosome (rbs) muốn dịch mã thì phải được gắn vào vị trí nằm nối theo sau promoter và rbs.

Ở một số gen *Eukaryotae*, sự dịch mã đòi hỏi quá trình *splicing* tức cắt bỏ các đoạn intron rời khỏi tiền mRNA thông tin và nối các exon lại với nhau.

Mục đích của việc tạo dòng các gen của các động vật có vú, nhất là của người, là tạo ra các sản phẩm đúng như trong cơ thể với số lượng lớn và có giá trị thương mại. Sự biểu hiện của *các gen Eukaryotae* trong tế bào vi khuẩn nhiều khi gặp trở ngại, do đó cần phải tìm các nhân tố cho gen biểu hiện tối đa như :

- Số lượng hợp lí các bản sao của vector plasmid đối với một tế bào.
- Chọn *promoter mạnh* để phiên mã tốt.
- Có trình tự tạo điểm bám vào ribosome (*rbs*) và *DNA phụ* cho dịch mã tốt.
- Chọn lựa các *codon tốt* cho dịch mã trong gen được tạo dòng.
- DNA tái tổ hợp có sự *ổn định lâu dài*.
- Tránh sự *thủy giải protein* (proteolysis) do các enzyme của tế bào.

Số lượng lớn các plasmid tái tổ hợp trong tế bào làm tăng số lượng protein được tạo ra. Nhân tố giới hạn trong sự biểu hiện gen là yếu tố *khởi sự tổng hợp protein*. Các promoter mạnh, thường là các promoter của các phage làm cho mRNA được dịch mã nhiều hơn. Các trình tự điểm bám vào ribosome và codon khởi sự AUG cũng rất quan trọng cho sự dịch mã. Hoạt tính thủy giải protein có thể phá hủy các sản phẩm tạo ra nên cần hạn chế.

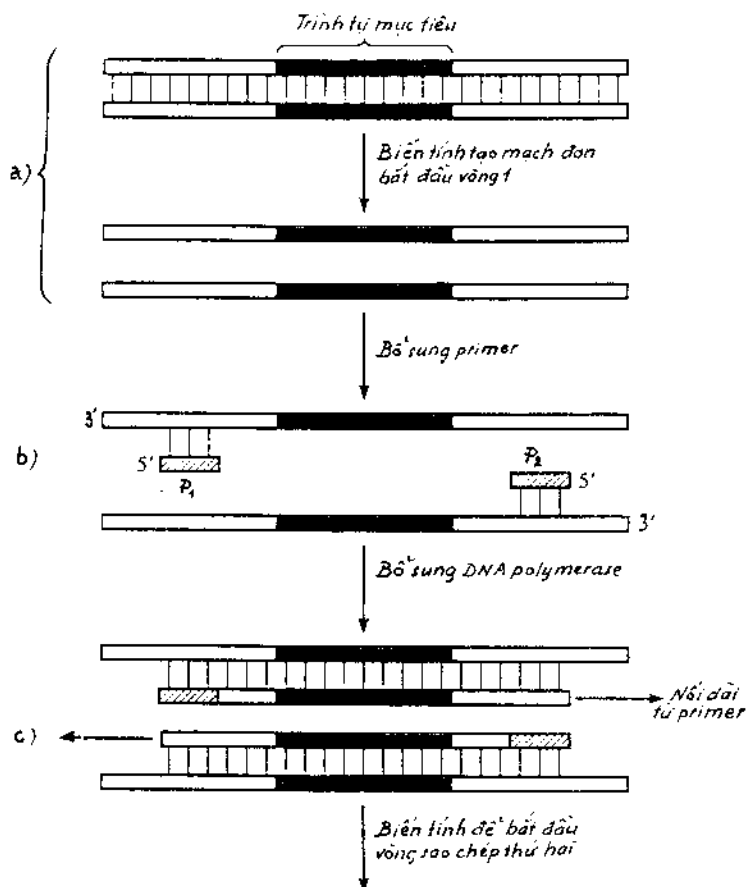
Kĩ thuật tái tổ hợp DNA được nêu trên phải qua nhiều bước phức tạp mới tạo được dòng tế bào như mong muốn và nó giúp giải quyết có hệ thống nhiều vấn đề từ gen đến sự biểu hiện của chúng thành các phân tử protein.

VII. PHƯƠNG PHÁP PCR

Vào năm 1985, K.Mullis đã phát minh ra phương pháp đơn giản khuếch đại nhanh nhiều bản sao (amplification) của các đoạn DNA mà không qua tạo dòng. Kĩ thuật này được gọi là *polymerase chain reaction*, viết tắt là *PCR*, được hiểu là *phản ứng polymerase dây chuyền*. Sự khuếch đại bằng PCR được thực hiện in vitro trong một ống nghiệm plastic nhỏ, khác hẳn với sự tạo dòng các đoạn DNA in viro được gắn vào plasmid của tế bào vi khuẩn hay nấm men. Kĩ thuật này được ứng dụng nhanh và có ý nghĩa cách mạng đối với sự phát triển của sinh học phân tử và kĩ thuật di truyền.

1. Nguyên tắc thực hiện

PCR là quá trình **khuếch đại** của một đoạn trình tự DNA đặc hiệu *in vitro* do sự xúc tác của enzyme **DNA polymerase**. Sự khuếch đại này nói chung được thực hiện nhờ các **chu trình nhiệt lặp lại** (có thể đến 35 lần) gồm đun nóng (95°C), làm nguội ($37 - 65^{\circ}\text{C}$) và ủ lâu ở 72°C . Trong dung dịch có các **primer** (đoạn mồi) P1 và P2, mỗi loại sẽ bắt cặp bổ sung với đầu mạch đơn tương ứng (hình 14. 14).



Hình 14.14. Sự khuếch đại một đoạn DNA.

- a) Đoạn DNA ban đầu ; b) Các primer P1 và P2 gắn vào đầu mạch đơn;
c) Polymerase nối dài mạch mới.

Nhờ vậy 1 mạch kép DNA, sau phản ứng do DNA polymerase thực hiện thành 2 mạch DNA kép và có thể thực hiện chu trình khuếch đại mới : 2 thành 4 và 4 thành 8 theo cấp số nhân.

Phản ứng được thực hiện trong ống nghiệm plastic nhỏ, có mẫu DNA, primer và DNA polymerase, được gắn vào hệ thống nung nóng có điều chỉnh thành chu kỳ nung nóng và làm nguội theo chương trình định sẵn gọi là *thermocycler*, đây chính là *máy PCR*.

2. Các cấu phần của phản ứng

Trong các ống nghiệm plastic nhỏ có các thành phần chủ yếu sau :

- *Khuôn mẫu* (Template) tức đoạn DNA cần khuếch đại.
- Các *oligonucleotide primer* (các môi) còn gọi là *amplifier* (nhân tố khuếch đại), *oligo* hay *primer*.
- *DNA polymerase chịu nhiệt* (thermostable).
- *dNTP* : các loại nucleotide triphosphate.
- *Dung dịch đệm* (buffer) thích hợp và *MgCl₂*.

a) Các polymerase chịu nhiệt

Lúc đầu, các polymerase bình thường được sử dụng, nhưng hiệu quả kém do phải chờ hạ nhiệt độ xuống thấp (35 – 50°C). Hiện nay, hầu như chỉ sử dụng polymerase chịu nhiệt là *Taq polymerase* bắt nguồn từ vi khuẩn *Thermophilus aquaticus* và một số khác có cải biến. PCR có thể thực hiện cả với RNA.

b) DNA khuôn mẫu (Template)

Độ nhạy cảm cao là một đặc tính hấp dẫn của PCR. Sự khuếch đại có thể thực hiện với một phân tử tự nhân lên. Yêu cầu tối thiểu này đối với đoạn DNA mẫu tương phản với kỹ thuật tạo dòng. Cũng do sự nhạy cảm cao này mà kết quả PCR dễ bị sai nếu *nhiễm DNA khác*. Dễ bị nhiễm tạp là nhược điểm lớn của PCR.

Ưu thế khác đối với mẫu là không cần *sự tinh sạch* cao. Nhờ vậy có thể dùng PCR cho các vết máu, mẫu khảo cổ, DNA cổ xưa hoặc vi khuẩn đã bị hấp khử trùng. Tuy vậy, trong nhiều trường hợp cần chuẩn bị mẫu tốt để kết quả chắc chắn hơn.

c) Các primer

Các primer là thành phần quan trọng trong PCR. Các primer được tổng hợp hóa học trên chất nền rắn được sử dụng trong máy tổng hợp oligonucleotide (oligonucleotide synthetizer). Các primer có vai trò quan trọng đối với thành công của PCR.

Trước hết, trình tự primer cần có *kích thước hợp lý*, khoảng 18 và 25 nucleotide.

Việc *chọn lựa trình tự primer* cũng có vai trò quan trọng. Cần chọn thế nào để tránh sự bắt cặp bổ sung bên trong hoặc bên ngoài phân tử không như ý và tránh có tỉ lệ GC cao.

3. Giá trị sử dụng

Phương pháp này có ý nghĩa lớn vì nhiều lí do :

- Thời gian thực hiện *cực nhanh* : Chỉ cần mất 3 giờ để khuếch đại một trình tự DNA được quan tâm, so với phương pháp tạo dòng của kĩ thuật tái tổ hợp DNA phải mất cả tuần hoặc lâu hơn.

- *Đơn giản và ít tốn kém* : Nó được thực hiện trong ống nghiệm plastic nhỏ gồm các thành phần tối thiểu được sử dụng đồng thời. Trong khi đó, phương pháp tạo dòng điển hình cần các vật liệu đắt tiền như màng, nucleotide triphosphate mang dấu phóng xạ và việc thực hiện cần các thao tác khéo léo đặc biệt.

- *Độ tinh sạch của mẫu không cần cao* : PCR có thể thực hiện với các mẫu nucleic acid thô. Ví dụ, mẫu máu hay các dấu vết trong phân tích pháp y. Điều này ngược với kĩ thuật tái tổ hợp DNA, đoạn gen hoặc vector đều cần tương đối tinh khiết.

Nhờ các ưu thế trên, PCR đã hấp dẫn các nhà nghiên cứu ngay từ lúc ra đời trong việc khuếch đại các trình tự nucleic acid đặc hiệu và chẩn đoán phân tử.

Giới hạn duy nhất đối với phương pháp này là phải biết trình tự nucleotide (hoặc ít nhất một phần) của đoạn cần khuếch đại. Nó không thay thế kĩ thuật tái tổ hợp DNA mà góp phần đáng kể bổ sung cho kĩ thuật này.

Tóm lại, từ khi ra đời đến nay, PCR có vai trò cách mạng hóa trong nghiên cứu cấu trúc và chức năng của gen. Nó được hoàn thiện không ngừng và có nhiều ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như xác định trình tự nucleotide của gen, gây đột biến điểm định hướng,... Có thể thực hiện PCR *in situ* (ngay trong tế bào) với cả DNA và RNA.

Nó được sử dụng trong pháp y để phân tích di truyền vết máu khô, chẩn đoán các bệnh di truyền và lây nhiễm, dự báo các sai hỏng di truyền. PCR có thể dùng để nghiên cứu DNA cổ xưa từ mẫu khảo cổ.

Sức mạnh của PCR kết hợp với các kĩ thuật khác của tạo dòng phân tử giúp sinh học xâm nhập vào nhiều lĩnh vực mà trước đây khó với tới.

VIII. CÔNG CỤ NGHIÊN CỨU SINH HỌC

Di truyền học là môn học cơ bản của sinh học. Sự hiểu biết trọn vẹn bất kì quá trình sinh học nào chỉ có thể đạt được khi phân tích được chi tiết cấu trúc và chức năng của gen. Trước đây, sự phân tích di truyền dựa vào các đột biến, nghiên cứu các đặc tính, lập bản đồ của chúng và nêu giả thuyết để tiếp tục thí nghiệm. Một trong những ví dụ điển hình của lối tiếp cận này là sự xây dựng khái niệm về operon từ các nghiên cứu sự điều hòa của trao đổi chất lactose. Kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã mang lại *vũ khí mới* mạnh mẽ hơn, tạo nên cuộc *cách mạng mới* trong di truyền học nói riêng và sinh học nói chung. Điều căn bản là kỹ thuật này đã đưa đến *phương pháp luận mới* cao hơn hẳn về chất trong nghiên cứu bản chất sự sống cũng như giải quyết nhiều vấn đề thực tiễn. Ví dụ, sự hiểu biết về gen ngày nay phải đạt đến *trình tự sắp xếp các nucleotide của gen* và ở các đột biến phải biết được do sự thay đổi nucleotide ở điểm nào trên gen một cách chính xác. Hơn thế nữa, nhiều *phương pháp dẫn xuất* được xây dựng nên đã nhân lên đáng kể quyền lực của kỹ thuật di truyền như *xác định trình tự nucleotide của gen, đột biến điểm định hướng, antisense RNA, tái tổ hợp tương đồng*. Các phương pháp này không những giúp hiểu sâu bản chất sự sống, mà còn là các phương tiện mới để cải tạo sinh giới.

Nói chung, kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã mang lại nhiều giải đáp mới cho các vấn đề sinh học thực nghiệm, tạo ra nhiều điều mới mẻ trong các ứng dụng thực tiễn. Tuy nhiên, trước tiên kỹ thuật di truyền trở thành *công cụ* để nghiên cứu sinh học.

1. Quá trình nghiên cứu DNA → RNA → Protein

Trước khi kỹ thuật di truyền ra đời, các nghiên cứu này tách riêng thành từng đoạn : các nhà di truyền học tập trung vào phần DNA, các nhà sinh hóa chú trọng vấn đề protein. Các kết quả từ 2 nguồn khác nhau đó được đối chiếu lại để tìm lời giải chung, nên chậm và đôi khi không hiệu quả.

Khi kỹ thuật di truyền ra đời, việc nghiên cứu thành một quá trình liên tục với hiệu quả rất cao. Nếu tạo dòng được 1 gen, có thể thu nhận được mRNA và protein của gen đó.

Ví dụ : Năm 1983, khi lai mRNA với DNA của gen ovalbumin các nhà nghiên cứu tìm ra *gen gián đoạn*. Phát minh này làm đảo lộn quan niệm về gen.

Sinh học ngày nay có thể đi sâu được vào những vấn đề nan giải trước đây như :

– Nhiều gen hoạt động chỉ trong thời kì phát triển phôi rồi dừng lại mà không hoạt động tiếp nữa. Nay có thể từ phân tích gen tìm ra lời giải.

– Nghiên cứu về hoạt động của hệ thần kinh rất khó khăn là do không tiến hành được thí nghiệm ở người. Bán cầu đại não người không có tương đương trong thế giới sinh vật, nên càng khó thí nghiệm trực tiếp được. Kỹ thuật di truyền đã giúp xác định hàng loạt gen có biểu hiện ở bộ não người và các protein tương ứng.

2. Di truyền ngược (*Inverse genetics*)

Sự thay đổi quan trọng trong **phương pháp luận** là hướng nghiên cứu mới : **di truyền ngược**. Khác với di truyền học cổ điển mà các nghiên cứu bắt đầu từ quan sát kiểu hình rồi cuối cùng mới đến DNA, di truyền ngược khởi sự **từ DNA** truy ra hiệu quả kiểu hình. Bước đầu, hướng này có tiến triển tốt trong việc truy tìm nhiều bệnh cho người. Từ năm 1986 đến nay đã xác định hơn 50 bệnh ở người theo phương pháp mới này.

Bằng phương pháp nghiên cứu di truyền ngược, có thể giải quyết được nhiều vấn đề cấp thiết của sinh học như :

– Có thể xác định được các **oncogen** (gen gây ung thư) trước khi phát hiện protein của nó.

– Nhiều protein có số lượng quá thấp (minor protein) khó chiết. Bằng kỹ thuật này có thể thông qua nhiều bản sao của gen để nghiên cứu nó.

Nhiều nhà nghiên cứu cho rằng phương pháp nghiên cứu di truyền ngược có thể đem đến nhiều bất ngờ.

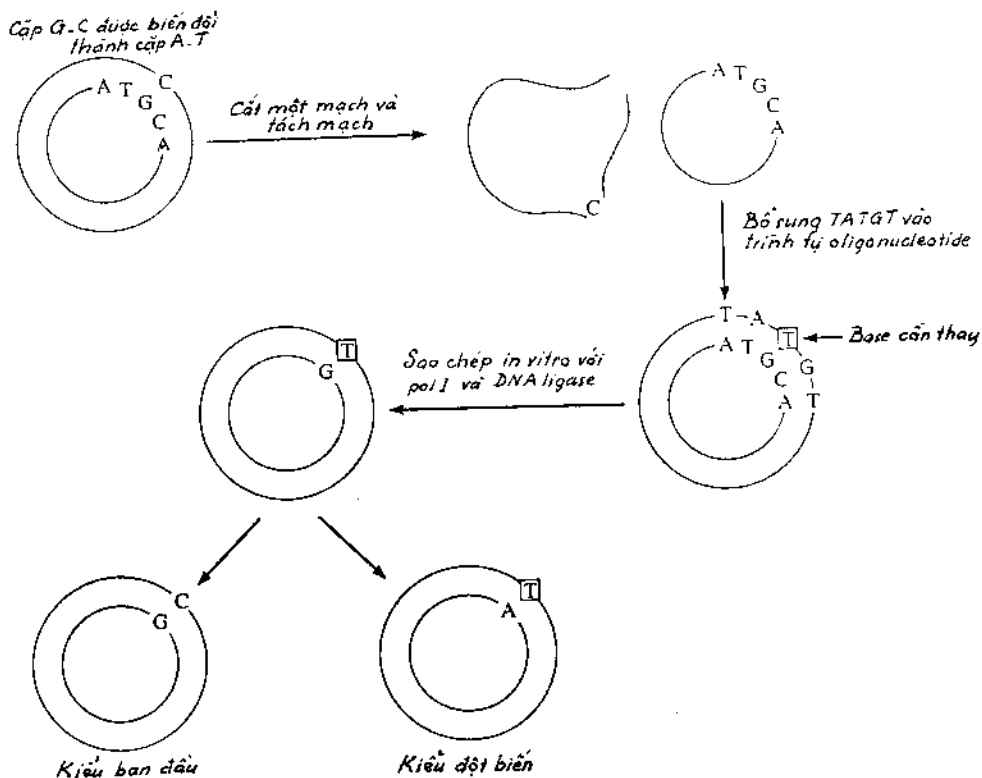
3. Đột biến điểm định hướng

Một trong những hệ quả quan trọng của kỹ thuật tái tổ hợp DNA là kỹ thuật tạo **đột biến điểm định hướng** (site-directed mutagenesis) hay **đột biến điểm chuyên biệt** (site-specific mutagenesis). Một gen, khi đã biết được chính xác trình tự nucleotide, có thể thay đổi các nucleotide ở bất cứ điểm nào tùy ý. Có thể chủ động biến đổi các gen ở một điểm nhất định bằng các cách như sau :

- Làm mất đoạn hoặc tăng đoạn.
- Nối các đoạn gen với nhau.
- Thay thế một nucleotide này bằng nucleotide khác.

Có nhiều cách thay thế nucleotide ở từng điểm. Hình 14.15 mô tả một kiểu gây đột biến điểm định hướng *in vitro* thay thế cặp G-C bằng A-T. Đoạn gen có điểm cần thay thế được gắn trên plasmid và cắt hở rồi tách mạch chứa lại một mạch đơn. Tổng hợp một đoạn **oligonucleotide** ngắn có base cần

thay nằm giữa, cụ thể ở trường hợp này là TATGT (T ở giữa thay cho C ở gen ban đầu). Khi trộn các oligonucleotide với plasmid mạch đơn, trong sự hiện diện của *DNA polymerase I* và *DNA ligase*, sẽ có sự bắt cặp bổ sung ở đoạn tương ứng trừ chỗ G đối diện T và plasmid mạch kép được tạo ra. Ở vòng sao chép tiếp theo của plasmid mạch kép này sẽ có 2 loại plasmid mà một mang đột biến điểm định hướng.



Hình 14.15. Phương pháp gây đột biến điểm định hướng thay thế 1 nucleotide

Hiện nay, đột biến điểm định hướng được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu chi tiết về các gen.

4. Antisense RNA

Năm 1981, ở Viện NIH (National Institute of Health) Hoa kỳ, Tomizawa phát hiện rằng tốc độ sao chép DNA không phụ thuộc vào nồng độ chung của primer, mà phụ thuộc vào tỉ lệ tương đối giữa các primer và các chất ức chế sao chép. Ông đã chứng minh được rằng những chất ức chế đó là những đối-RNA (antisense RNA), những mRNA được sao chép ra từ mạch bổ sung với mã của primer nên có trình tự nucleotide ngược chiều (do đó gọi là

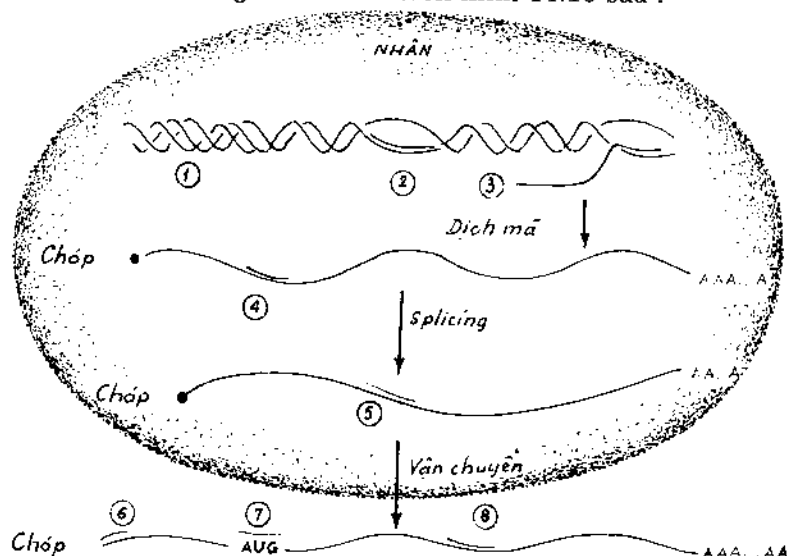
antisense). Antisense RNA có tác dụng ức chế do nó có thể bắt cặp với những đoạn DNA tương ứng để cản trở sao chép.

Các antisense RNA này có thể kìm hãm cả tổng hợp protein do bắt cặp bổ sung với mRNA. Để nghiên cứu tác động kìm hãm đối với một gen, các nhà nghiên cứu dùng ngay kĩ thuật tạo dòng để tạo ra antisense RNA cho 1 gen nào đó bằng cách *quay ngược gen* trên vector biểu hiện.

Việc thu nhận đột biến là rất khó và tốn nhiều thời gian ở sinh vật bậc cao, nhất là ở động vật có vú. Công việc càng khó hơn khi muốn có đột biến ở gen mục tiêu. Khi đưa antisense RNA của gen vào tế bào, gen tương ứng ngừng tổng hợp protein tức có biểu hiện đột biến. Điều này cũng tương tự như gây đột biến ở một cơ thể nguyên vẹn. Phương pháp làm ngừng hoạt động của bất kì gen nào để nghiên cứu này đã mở ra hướng mới mà có người gọi là *di truyền đảo ngược* (reverse genetics).

Ý tưởng này còn được phát triển xa hơn : Việc kìm hãm hoạt động gen không đòi hỏi nguyên phân tử antisense RNA mà chỉ cần *1 đoạn ngắn*. Việc tổng hợp ra các *oligonucleotide antisense* được phát triển mạnh để ức chế các gen mục tiêu. Nhiều thuốc oligonucleotide antisense đang được thử nghiệm.

Quá trình từ DNA $\rightarrow$ protein có thể kìm hãm ở 8 chỗ do oligonucleotide antisense gắn vào như trên hình 14.16 sau :



Hình 14.16 Những điểm mà oligonucleotide antisense có thể tác động trong các giai đoạn nối tiếp của biểu hiện gen.

1. Tạo mạch xoắn ba ; 2. Gắn vào chỗ mở ra cho RNA polymerase ;
3. Gắn vào chỗ làm mạch mRNA kết thúc sớm ; 4. Gắn lên mRNA ;
5. Gắn lên mRNA cản trở đi ra tế bào chất ; 6. Gắn vào nhân tổ khởi sự dịch mã ;
7. Cản trở ribosome gắn vào codon khởi sự ; 8. Cản trở dịch mã.

Ngoài các phương pháp nêu trên có thể thực hiện *tái tổ hợp tương đồng* thay gen hoặc allele đúng mục tiêu sẽ được nêu ở phần sau.

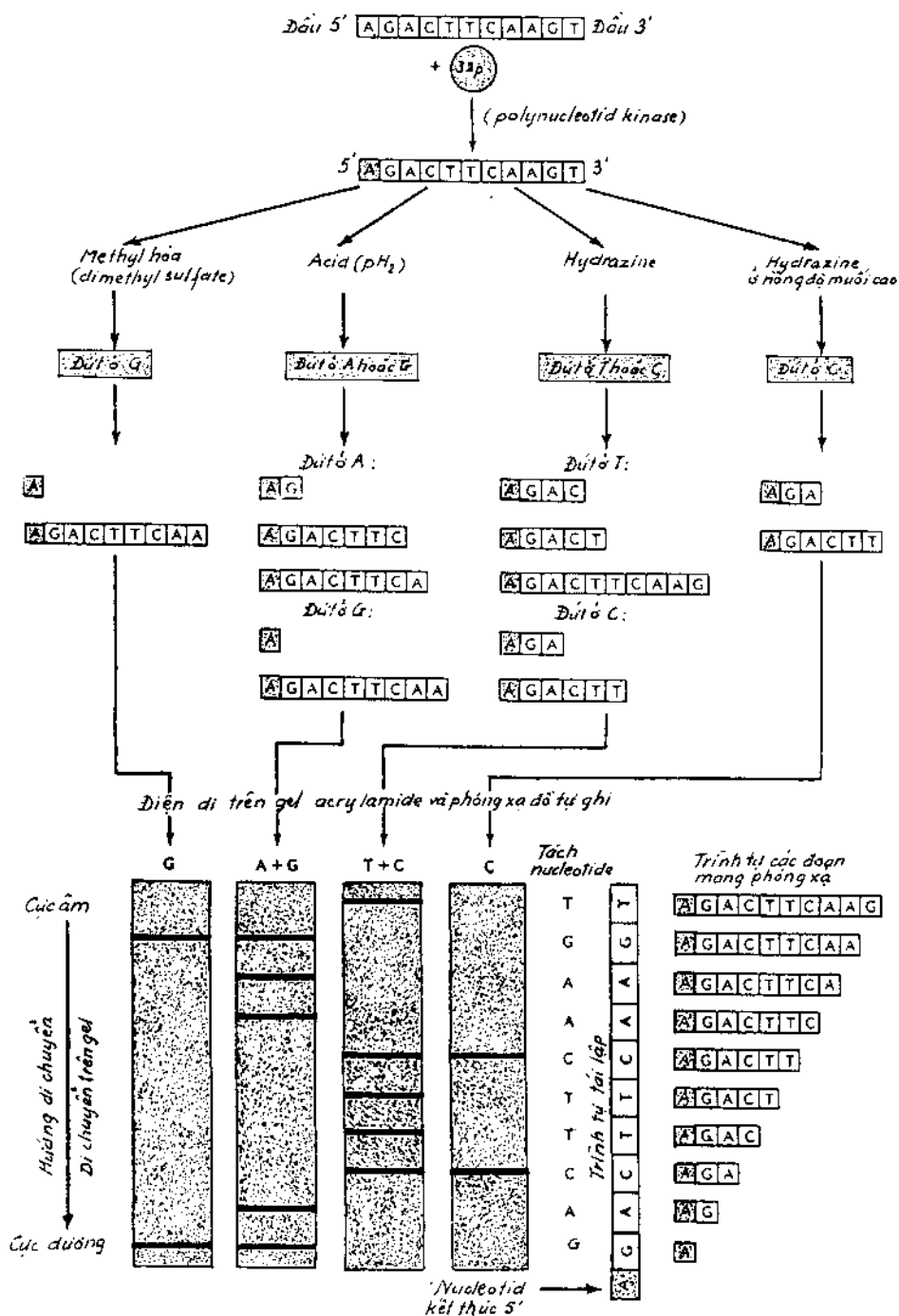
Tóm lại, cuộc cách mạng kĩ thuật di truyền cung cấp cho sinh học hàng loạt công cụ quan trọng để thu nhận nhiều thông tin về các cơ chế của sự sống, của nhiều bệnh như ung thư, về cơ chế sự phát triển và hoạt động của *hệ thần kinh, hệ miễn nhiễm*,... Nó giúp phát hiện các *sai hỏng chức năng* của tế bào, của hệ thần kinh và hệ miễn nhiễm. Trong trường hợp ung thư, hàng loạt các nhân tố điều hòa chu trình tế bào đã được xác định.

IX. XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ CÁC NUCLEOTIDE CỦA GEN

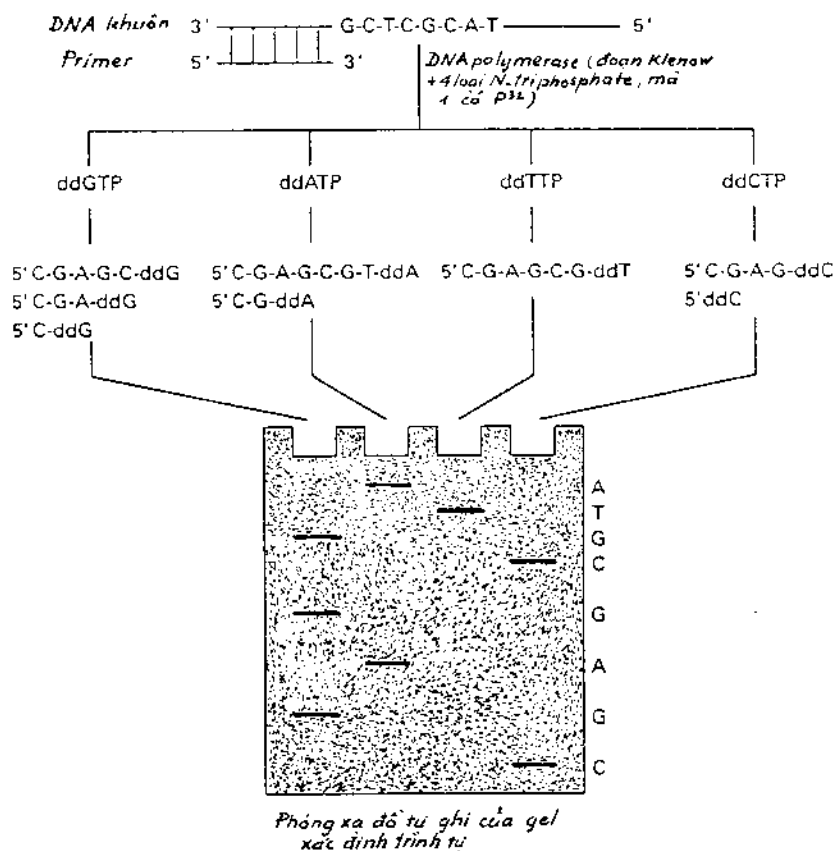
Bằng kĩ thuật tạo dòng con người có thể nhận được DNA của một gen hoặc một đoạn dài của nó với số lượng tùy ý. Nhờ đó phân tử DNA trở nên dễ nghiên cứu, và một trong những phương pháp có ý nghĩa quan trọng hàng đầu là xác định trình tự các nucleotide của DNA.

1. Phương pháp Maxam-Gilbert và phương pháp dideoxy của Sanger

Phương pháp *xác định trình tự các nucleotide* (sequencing) của Maxam và Gilbert (1977), còn gọi là phương pháp hóa học, được mô tả trên hình 14.17. Các đoạn nucleotide giống nhau (ví dụ, dài 11N) được đánh dấu đồng vị phóng xạ P^{32} ở đầu 5'. Các đoạn đã mang dấu phóng xạ này được chia thành 4 nhóm, mỗi nhóm chịu một xử lí hóa học làm biến đổi một hay hai base. Cụ thể là xử lí *methy hóa* (bằng dimethyl sulfate) làm mạch đứt ở G; *pH = 2* làm đứt ở A hoặc G, *hydrazine* làm đứt ở C và T, *hydrazine ở nồng độ muối cao* làm đứt ở C. Xử lí để trung bình mỗi đoạn nucleotide chỉ hỏng ở một base. Sau khi xử lí, mỗi nhóm chứa một số đoạn nucleotide có chiều dài khác nhau. Bốn nhóm được đưa lên 4 bản *gel acrylamide* riêng ở phía cực âm, các đoạn ngắn hơn sẽ di chuyển xa hơn về phía cực dương. Dựa vào kết quả điện di có thể xếp các đoạn DNA theo thứ tự từ ngắn đến dài có điểm mốc chuẩn là đầu 5' mang dấu phóng xạ P^{32} được phát hiện nhờ phương pháp *phóng xạ đồ tự ghi* (autoradiography) biểu hiện ở vết đen trên giấy in ảnh. Tổng hợp kết quả của cả 4 nhóm trên 4 bản điện di phản ánh đầy đủ trình tự của 11 nucleotide của đoạn DNA kể từ đầu 5'.



Sau đó vài phương pháp xác định trình tự các nucleotide ra đời như **phương pháp dideoxy** của F.Sanger (1977) và nay đã có máy tự động xác định trình tự các nucleotide của DNA. Hiện nay phương pháp dideoxy của Sanger sử dụng enzyme và dideoxy (mất 2 nguyên tử oxygen) nucleotide là thông dụng hơn cả (hình 14.18). Phương pháp này dựa trên nguyên tắc là khi mạch DNA đang được tổng hợp, nếu gặp dideoxy nucleotide thì bị dừng và các đoạn nucleotide có độ dài khác nhau được tạo ra. Phản ứng cũng được chia thành 4 lô trên 4 bản điện di như ở phương pháp hóa học.

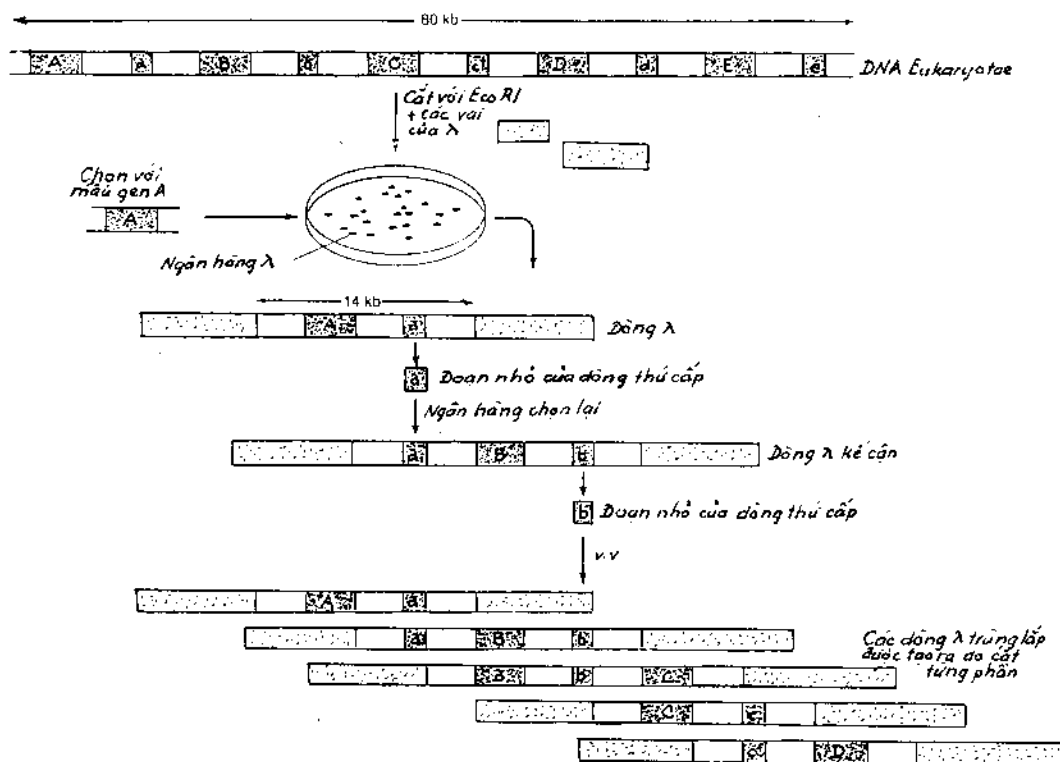


Hình 14.18. Phương pháp dideoxy của Sanger

2. Xác định trình tự nucleotide các bộ gen

Sự ra đời của các phương pháp xác định trình tự các nucleotide có ý nghĩa rất quan trọng. Nó là công cụ giúp con người hiểu bản chất của gen đến từng nucleotide. Việc xác định trình tự nucleotide của nhiều gen và cả bộ gen (genome) của nhiều sinh vật được tiến hành. Quá trình xác định trình tự

các nucleotide dọc theo DNA của nhiễm sắc thể được gọi là "**đi dọc theo nhiễm sắc thể**" (walking along chromosome). DNA của nhiều bộ gen của các sinh vật khác nhau được cắt thành nhiều đoạn, rồi các đoạn này được gắn vào các vector để tạo dòng. Các dòng chứa các đoạn DNA khác nhau đó tập hợp lại thành **ngân hàng DNA** (DNA bank) hay thường gọi là **thư viện DNA** (DNA libraries).



Hình 14.19. Đi dọc theo nhiễm sắc thể

Để xác định trình tự nucleotide bộ gen của một sinh vật, trước tiên tạo thư viện DNA gồm các dòng chứa tất cả các đoạn DNA của bộ gen. Kế đó xác định trình tự nucleotide của từng đoạn DNA được gắn vào mỗi dòng. Căn cứ vào các chỗ trùng lặp ở các đoạn DNA khác nhau, xếp nối chúng lại thành đoạn DNA dài liên tục tức "**đi dọc theo nhiễm sắc thể**" (hình 14.19).

Bộ gen của nhiều virus đã được xác định trình tự nucleotide như *ØX174* (vào năm 1977) dài 6 kb; *SV40* (1978) dài 5 kb; *virus hepatitis B* (gây viêm gan) (1979) dài 3 kb tức 3000 base; phage *λ* (1982) dài 49 kb, *HIV-1* (1988) dài 152 kb... Bộ gen của các sinh vật khác đang được xác định trình

tự nucleotide như *E.coli* đến nay đã biết được hơn 50%, nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đến năm 1992 đã xác định được trình tự nucleotide 1/5 bộ gen, ở các sinh vật bậc cao sự chú ý được hướng vào ruồi giấm *Drosophila melanogaster*, thực vật *Arabidopsis thaliana*, tuyến trùng (nematode) *Caenorhabditis elegans* và đặc biệt là ở người.

Việc biết được chính xác trình tự sắp xếp nối tiếp chính xác của các nucleotide sẽ cho biết trình tự các amino acid tương ứng trên phân tử protein. Điều này có ý nghĩa hàng đầu là sẽ hiểu được tập hợp **tổng thể các chức năng** cần thiết cho một cơ thể sống.

Mặt khác, nó cho phép nhận được **bộ sưu tập các gen** của quá trình trao đổi chất trung gian hứa hẹn **sản xuất các chất trao đổi trung gian** ở quy mô công nghiệp. Nó chỉ ra các **mối quan hệ giữa các gen** và đổi mới những câu hỏi liên quan đến **nguồn gốc sự sống**. Cuối cùng, sự thực hiện tương đối dễ dàng với giá thành không cao so với những kiểu tiếp cận thông thường, việc xác định trình tự toàn bộ nucleotide của các bộ gen cho phép giải quyết nhiều vấn đề di truyền học đang trông đợi lời giải. Đây là **công việc khai phá đồ sộ**, tương tự một phần như **xác lập bản đồ thiên văn**, sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu di truyền sắp tới.

Do tầm quan trọng như vậy, có thể nói rằng việc xác định trình tự hoàn toàn các bộ gen đã được bắt đầu một cách nghiêm túc và đã thành **vấn đề khoa học quốc tế**. Nhật Bản đã đầu tư 2 tỉ yên để xác định trình tự toàn bộ nucleotide bộ gen của **nấm men** và các vi khuẩn *E. coli*, *Bacillus subtilis*. Châu Âu thực hiện chương trình giải mã bộ gen của một thực vật là *Arabidopsis thaliana* với khoảng 70 triệu USD để hiểu rõ các quy luật tăng trưởng và phát triển ở thực vật, tiến tới chủ động điều khiển các cây trồng.

Năm 1995, bộ gen của 2 vi khuẩn *Haemophilus influenzae* và *Mycobacterium genitalium* được xác định toàn bộ trình tự nucleotide. DNA của bộ gen *Haemophilus influenzae* chỉ có 1.830.121 cặp nucleotide với khoảng 1800 gen. *Mycobacterium genitalium* chỉ có khoảng một nửa số gen của *Haemophilus*. Tháng 2/1997, chương trình xác định trình tự toàn bộ nucleotide bộ gen của vi khuẩn *E. coli* được thông báo đã đạt mục đích cuối cùng do 2 nhóm độc lập nhau : Takashi Horiuchi ở Nhật Bản và Fred Blattner ở Mỹ.

Chương trình xác định trình tự nucleotide bộ gen người sẽ được trình bày chi tiết ở chương di truyền người.

X. CÔNG NGHỆ PROTEIN (PROTEIN ENGINEERING)

Từ lâu các nhà khoa học mong muốn sản xuất các protein với số lượng lớn. Năm 1955, Sanger lần đầu tiên xác định được trình tự các amino acid

của một protein nhỏ là insulin gồm 51 amino acid tạo nên hai mạch A và B nối nhau nhờ cầu disulfite. Mãi đến khoảng giữa năm 1963 và 1965 việc tổng hợp hóa học 2 mạch A và B mới được thực hiện do 3 nhóm nghiên cứu ở 3 nước khác nhau: Mĩ, Trung Quốc và Cộng Hòa Liên Bang Đức.

Quá trình tổng hợp hóa học một phân tử protein loại nhỏ như insulin phức tạp đến nỗi gồm 170 phản ứng và giá thành cao không thể sản xuất công nghiệp được. Kỹ thuật tạo dòng các gen cho phép sản xuất nhiều loại protein khác nhau không những với **số lượng lớn**, mà còn có thể **biến đổi chất lượng protein**. Công nghệ protein thật sự đang phát triển với nhiều thành tựu rất ngoạn mục.

1. Sản xuất protein người nhờ các sinh vật

Những thành quả đầu tiên của kỹ thuật di truyền là tổng hợp được nhiều loại protein khác nhau dùng cho trị bệnh (bao gồm cả các kháng thể) ở người.

a) Các vi sinh vật sản xuất protein người

Nhiều protein (cả các peptide) được nhanh chóng sản xuất nhờ các vi sinh vật như *E.coli* hay nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Đến nay có hàng trăm loại protein được sản xuất nhờ kỹ thuật tạo dòng, trong đó hàng chục loại được bán ra thị trường.

Nhiều protein cần cho việc chữa trị một số bệnh ở người, nhưng nếu chiết tách từ cơ thể thì số lượng rất ít như interferon (giúp cơ thể kháng virus), somatotropine (hormone tăng trưởng). Ở Mĩ để chữa trị 1.500 trẻ em bị bệnh lùn bẩm sinh do thiếu somatotropine cần chiết xuất chất này từ 60.000 tuyến yên của các tử thi. Nay người ta đã gắn được gen tạo hormone tăng trưởng somatotropine vào vi khuẩn *E.coli* nên đã sản xuất được với số lượng lớn và ở Mĩ giá thành hạ đáng kể.

Do tốc độ sinh sản nhanh, nên các vi sinh vật sản sinh ra các protein với số lượng lớn trong thời gian ngắn. Sản phẩm được tinh sạch không sợ mang virus như trường hợp chiết tách từ cơ thể người.

Trong phần lớn trường hợp, các protein của công nghệ di truyền thay thế cho các protein bị sai hỏng, bất hoạt hay mất hẳn ở người bệnh. Nhiều trường hợp đã được thực hiện trong chữa trị các bệnh cụ thể như dùng : insulin trị tiểu đường (diabet), adenosine desaminase trị hội chứng thiếu năng miễn nhiễm, hormone tăng trưởng xử lý bệnh lùn bẩm sinh.

Trong những trường hợp khác các protein trị liệu có tác động kích thích một phần hay toàn phần hệ thống miễn nhiễm (immune system) để tạo ra các phản ứng có lợi như :

– Sử dụng các nhân tố kích thích để hoạt hóa sự sản sinh ra máu (blood platelet) và bạch cầu trung tính (neutrophil).

– Sản xuất các interferon và interleukine để kích thích các phản ứng chống ung thư.

b) “Nuôi trồng gen” (“Gene farming”)

Trồng trọt và chăn nuôi gen có thể đưa đến sự sản xuất ở quy mô công nghiệp các *protein phức tạp* không biểu hiện được ở vi khuẩn và nấm men như collagen của người có ứng dụng quan trọng trong làm lành da, ghép mô và trị bệnh da. Xu hướng hiện nay là chú trọng chuyển gen người vào thực vật do những mặt lợi như sau :

– Có thể trồng với quy mô lớn nhờ năng lượng mặt trời, ít tốn kém hơn.

– Virus thực vật không đáng sợ cho người.

– Cho gen biểu hiện ở *mô tạo dấu* thực vật nên rất dễ tách và thu nhận protein.

Con người đã có những bước tiến khá dài trong sử dụng các sinh vật để sản xuất protein người như cho gen biểu hiện ở tuyến sữa của các gia súc để có thể thu nhận nhiều lần một cách dễ dàng hay ở mô tạo dấu ở thực vật. Một vài thành quả ban đầu như :

– Lactoferrin và protein C được tạo ra ở bò và được dùng trong công thức ăn cho trẻ con và làm tan máu đông (Công ti Gen-Pharm).

– Alpha-1 antitrypsin được sản xuất ở cừu (chiết ra từ sữa) để trị bệnh emphysema.

– CFTR protein (Cystic fibrosis transmembrane receptor) được tạo ra ở sữa dê để trị bệnh hóa xơ nang .

– Enkephalin ở cây cải dầu làm chất giảm đau (pain killer).

– Serum albumin ở khoai tây để tăng máu.

– Các gen của globine máu được đưa vào cây thuốc lá (1996).

2. Công nghệ chế tạo protein (*Protein engineering*)

Một trong những thành quả đặc biệt của kĩ thuật tái tổ hợp DNA là cho phép chế tạo, phát triển và tách các protein được cải thiện hoạt tính hay protein hoàn toàn mới. Nhờ kĩ thuật tạo dòng con người không những sản xuất một loại protein với số lượng lớn, mà còn có thể sản xuất nhiều loại protein mới được biến đổi về chất lượng. Trường hợp đơn giản nhất của chế

tạo protein là sử dụng **đột biến điểm định hướng** thay thế các amino acid then chốt để nâng cao chất lượng protein. Trong những trường hợp này, cũng như khi xác định trình tự nucleotide của bộ gen, sự can thiệp của điện toán là không thể thiếu được dẫn đến **thí nghiệm in silico** (thí nghiệm trên máy điện toán).

a) Tăng hoạt tính sinh học của protein

Đến nay, hàng trăm loại protein của người được sản xuất hoặc đang thử nghiệm để chữa trị bệnh. Đây là thế hệ protein đầu tiên được sản xuất bằng công nghệ di truyền, cấu trúc phân tử của chúng vẫn giữ nguyên trạng như thiên nhiên đã tạo ra trong cơ thể con người.

Đến nay, công nghệ chế tạo protein đang tạo ra **thế hệ protein thứ hai**, đó là các protein được biến đổi nhằm cải tiến cấu trúc, sự ổn định và các đặc tính sinh học có lợi cho việc sử dụng chúng tốt hơn vào nhiều mục đích khác nhau như các chế phẩm y dược, vật liệu mới.

Sử dụng kỹ thuật di truyền và đột biến điểm định hướng có thể làm thay đổi chất lượng protein như tăng tính bền vững, tăng hiệu quả tác động và nhiều đặc tính khác.

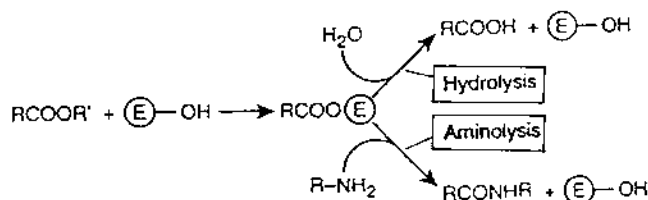
Ví dụ 1 : Tăng tính chịu nhiệt của lysozyme. Enzyme lysozyme của phage T4 có 2 cysteine (vị trí 54 và 97) nhưng không tạo thành cầu disulfide (-S-S). Sau khi nghiên cứu cấu trúc bậc ba của lysozyme T4, isoleucine ở vị trí 3 được thay bằng cysteine để có thể tạo cầu S-S với cysteine ở vị trí 97. Đột biến điểm định hướng biến codon ATA của isoleucine thành TGT của cysteine. Lysozyme đã được biến đổi có thực hiện phản ứng tốt hơn, có độ bền vững lâu hơn.

Ví dụ 2 : Insulin phần lớn ráp lại ở dạng lục phân (hexamer) liên kết với kẽm (Zn) trong dung dịch trung hòa chữa trị bệnh. Sự tự ráp đó hạn chế sự hấp thụ. Năm 1988, bằng thay thế một amino acid, insulin mới được tạo ra có cấu trúc căn bản đơn phân (monomeric) ở dung dịch trị liệu. Insulin mới không những giữ nguyên hoạt tính sinh học, mà được hấp thụ nhanh hơn hai đến ba lần.

Ví dụ 3 : Công trình về **biến đổi subtilin** là một bằng chứng về sức mạnh của kỹ thuật gây đột biến điểm định hướng.

Hầu như **tất cả các tính chất** của serine protease này đã được biến đổi như: tốc độ xúc tác, tính đặc hiệu với cơ chất, biên độ pH và sự bền vững đối với nhiều tác động làm mất hoạt tính của oxy hóa, nhiệt và alkaline. Nhiều biến đổi đã được thực hiện nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng của subtilin trong công nghiệp. Ví dụ, làm tăng hoạt tính thủy giải protein của subtilin dùng trong chất tẩy rửa (detergent).

Subtilin là serine protease vừa có hoạt tính thủy giải, vừa có hoạt tính tổng hợp các peptide. Công nghệ chế tạo subtilin gần đây (1991) đã tiến thêm một bước đáng kể. Các biến đổi được thực hiện làm **tăng hoạt tính tổng hợp** (aminolysis) vượt trội hơn thủy giải (hydrolysis). Điều này đạt được nhờ **thay gốc serine** trong trung tâm hoạt động của enzyme **bằng cysteine**. Sự thay thế này chủ yếu làm **tăng ái lực** (affinity) và **tính phản ứng** (reactivity) của chất trung gian **acyl** cho nhân kị nước amin (hình 14.20).



Hình 14.20. Các phản ứng aminolysis (tổng hợp peptide) và thủy giải (hydrolysis) qua trung gian protease được acyl hóa (acylated protease)

Enzyme được chế tạo mới này lại được sử dụng để tổng hợp các glycopeptide mới (1992).

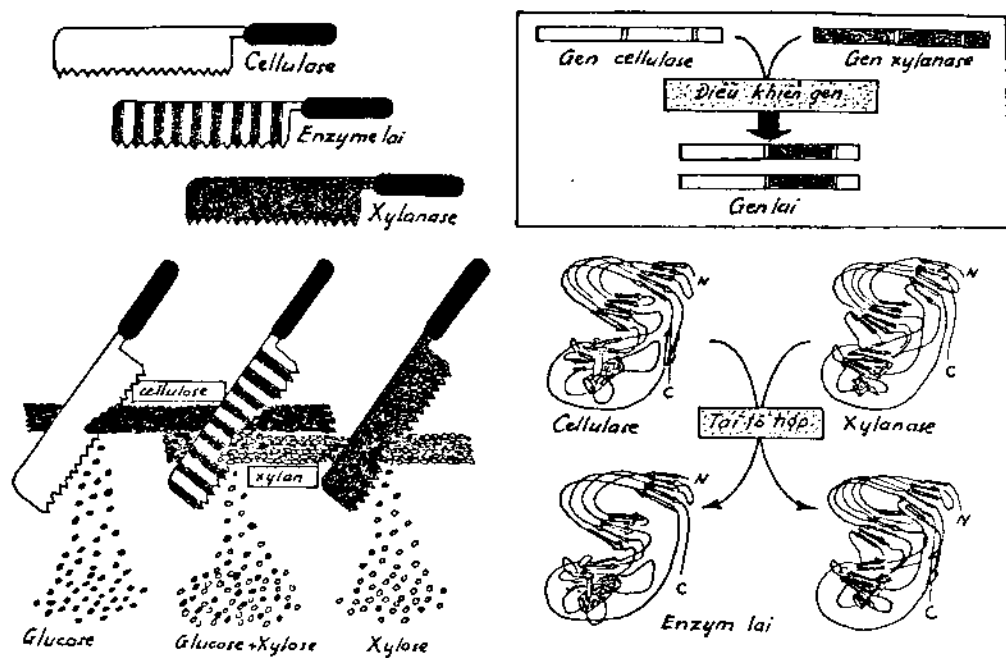
Gen tạo protein tư nhện đã được tạo dòng và biến đổi chất lượng để thích ứng với nhu cầu sử dụng của con người.

b) Các biến đổi lớn của phân tử protein

Kỹ thuật đột biến điểm định hướng có thể gây các biến đổi lớn đối với phân tử protein như cắt bớt một hay thêm vào 1 đoạn polypeptide.

Một hướng phát triển hiện nay là chế tạo các enzyme lai (hybrid enzyme). Ví dụ, mục tiêu của phòng thí nghiệm công nghệ sinh hóa của GS Kinoshita, Đại học Hokkaido (Nhật Bản) nhằm tạo enzyme lai cellulase với xylanase (hình 14. 21). Phế liệu nông nghiệp rất giàu cellulose và xylan. Enzyme cellulase chỉ phân hủy cellulose ra glucose và xylanase chỉ phân hủy xylan thành xylose. Enzyme lai phân hủy đồng thời cellulose và xylan nên chuyển hóa tốt hơn các phế liệu nông nghiệp (thông báo cá nhân và sơ đồ của GS Kinoshita cho tác giả).

Sự kết hợp các protein khác loại có thể toàn phần hoặc từng phần tạo ra hàng loạt các protein mới khác nhau. Ví dụ, có thể tạo ra nhiều kiểu dạng khác nhau của các kháng thể.



Hình 14.21. Sơ đồ tạo enzyme lai và hiện quả sử dụng

XI. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN MỚI

Trên thế giới, công nghiệp sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ cho **chẩn đoán bệnh** ước tính có doanh số nhiều tỉ USD hàng năm. Trước đây, các chế phẩm sinh hóa chủ yếu nhằm vào chẩn đoán các protein như **kỹ thuật huỳnh quang miễn nhiễm** (immunofluorescence) **thử nghiệm miễn nhiễm phóng xạ** (radioimmunoassay - RIA) hay ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Sự ra đời của phương pháp chẩn đoán mới dựa vào lai nucleic acid và PCR đã tạo nên bước chuyển biến mới, và có thể đây là phương pháp thông dụng trong thế kỉ 21.

1. Sự phát hiện các trình tự ở mức lớn

Tất cả các ứng dụng của **kỹ thuật lai phân tử** đều nhằm xác định sự hiện diện của trình tự nucleotide đặc hiệu của một đoạn gen hay DNA. Trước hết, phương pháp này được dùng để phát hiện các vi sinh gây bệnh trong y học và trong **thực phẩm**.

Sự chẩn đoán phân tử đối với các bệnh nhiễm trùng (infectious disease) có nhiều ưu thế. Thứ nhất, nếu tác nhân gây bệnh hiện diện với số lượng đủ cho phân tích thì **không cần nuôi cấy** chúng. Điều này giảm bớt thời gian và có hiệu quả cao. Kỹ thuật PCR có giá trị lớn trong trường hợp này. Ví dụ, Ou và các cộng tác viên (1988) đã phát hiện DNA của virus HIV-1 ở các tế bào máu ngoại vi chỉ trong một ngày thay vì 3-4 tuần theo phương pháp bình thường. Thứ hai, kỹ thuật lai phân tử có thể ứng dụng được cả khi sinh vật gây bệnh **không nuôi được**. Điều này thường xảy ra đối với các bệnh nhiễm virus. Thứ ba, một mẫu có thể xác định đại diện cho tất cả các serotype.

Cuối cùng, con người có thể tạo dòng ngay chính gen gây bệnh để sản xuất ra mẫu thử tương ứng.

Sự chẩn đoán bằng lai phân tử không chỉ hạn chế trong y học mà nó còn được dùng rộng rãi trong lĩnh vực thực vật. Sự chẩn đoán các virus gây bệnh thực vật có ý nghĩa quan trọng để bảo vệ cây trồng. Ví dụ : **phát hiện các viroid** ở thực vật. Vì chúng không có vỏ protein nên không thể phát hiện bằng các thủ thuật miễn nhiễm như dùng ELISA. Lai phân tử cũng được dùng để nghiên cứu sinh thái vi sinh vật .

2. Chẩn đoán các bệnh di truyền

Cho đến nay, đã biết được hàng trăm bệnh di truyền do gen lặn. Các bệnh này hầu như chưa có cách chữa trị, hiện chỉ hi vọng **liệu pháp gen** (genotherapy).

Chiến lược hiện nay ở nhiều nước là **dự phòng**. Trước kia, việc phát hiện gen lặn ở cả cha lẫn mẹ đều dị hợp tử rất khó thực hiện và chỉ biết được khi đứa trẻ ra đời. Hướng giải quyết trong các trường hợp này là chẩn đoán sớm bệnh ở thai nhi trong bụng mẹ để cho sảy thai sớm.

Phương pháp PCR đã làm tăng đáng kể hiệu quả chẩn đoán phân tử. Nhờ sự khuếch đại nucleic acid không cần tạo dòng, nên chẩn đoán phân tử có thể thực hiện thậm chí với 1 tế bào thôi .

Corner và cộng sự (1983) đã xây dựng phương pháp phân tích có hiệu quả và trực tiếp để xác định đột biến ở các gen hemoglobine α và β . Hai đoạn oligonucleotide (gần 19 N mỗi cái) đã được tổng hợp, một có trình tự bổ sung với đoạn gen đầu cuối NH_2 của β -globin (βA) bình thường và đoạn kia bổ sung cho β -globin (βS) bệnh hồng cầu hình lưỡi liềm. Các oligonucleotide được đánh dấu phóng xạ và dùng để thử Southern blot. Trong các điều kiện thích hợp các mẫu có thể phân biệt giữa allele bình thường và bệnh. DNA của cá thể đồng hợp tử bình thường chỉ lai với mẫu βA và dị hợp tử lai với cả hai mẫu, người bệnh hồng cầu hình liềm đồng hợp tử lai với mẫu βS . Các kết quả

này cho thấy các mẫu lai oligonucleotide có thể phân biệt 1 bất cặp sai của đoạn lai. Các kết quả này có thể áp dụng cho nhiều chẩn đoán khác nhau.

Hiện nay, trong y học lâm sàng nhiều bệnh di truyền và sai hỏng bẩm sinh được chẩn đoán ở các bà mẹ mang thai hoặc trẻ sơ sinh. Tuy nhiên tiến bộ kĩ thuật làm nảy sinh nhiều vấn đề xã hội, đạo lí (bioethics). Ví dụ, giả sử khi phát hiện có locus tình dục đồng tính (homosexuality) thì có nên cho sảy thai hay không ?

3. In dấu DNA (*DNA fingerprinting*)

Phần lớn bộ gen của người không thể có sự khác nhau nhiều giữa các cá thể, vì chúng mã hóa cho nhiều chức năng căn bản của sự sống. Ở vùng không mã hóa thì sự giống nhau không cần thiết và trình tự DNA có thể thay đổi giữa các cá thể. Một kiểu thay đổi là sự **lặp lại nối tiếp** (tandem repetition) của các trình tự DNA. DNA mini-satellite (xem chương VI) có các locus với trình tự lặp lại hàng nghìn lần nối tiếp nhau, lại có nhiều biến đổi được gọi là **siêu biến đổi** (super variable) do sự mất đi hay tăng thêm đoạn lặp lại. Các trình tự lặp lại nối tiếp này khác nhau rất lớn giữa những người không có họ hàng. Các locus này được gọi là các **lặp đoạn nối tiếp với số lượng dao động** (variable number tandem repeats - VNTR).

Nhiều trình tự lặp đoạn có **trình tự lõi** từ tổ tiên chung. Jeffreys và các cộng sự (1985) đã sử dụng các trình tự lõi và dẫn xuất làm mẫu thử lai nucleic acid để xác định các cá thể.

Các trình tự lặp lại trong intron của gen myoglobin được sử dụng để phân tích.

Trình tự lõi : GGAGGTGGGCAGGAGG

Mẫu 33.6 [AGGGCTGGAGG]₁₈

Mẫu 33.15 (AGAGGTGGGCAGGTGG)₂₉

Mẫu 33.5 (GGGACTGGGCAGGAGG)₁₄

*Hình 14.22. Các mẫu dùng trong in dấu DNA
(Số nhỏ ngoài ngoặc bên phải chỉ số lần lặp lại).*

Sự phân tích mẫu DNA được thực hiện bằng cắt DNA toàn phân tử với restriction endonuclease, sao cho enzyme này cắt 2 bên nhưng không ở giữa trình tự lặp lại. Như vậy, các đoạn RFLP được tạo ra phụ thuộc số lần lặp lại bên trong gen. Các đoạn DNA được tách bằng điện di và sau khi thực hiện lại theo kĩ thuật Southern (Southern blot - chương V), được thử với những

mẫu mô tả trên. Bảng điện di DNA trên thể hiện rõ tính đặc hiệu từng cá thể được gọi là in dấu DNA (DNA fingerprinting hay DNA profile) vì nó đặc hiệu như vân ngón tay của từng người.

In dấu DNA được sử dụng trong phân tích phả hệ ở chó, mèo và trong lai tạo giống. Ở người nó được dùng xác định nguồn gốc và sự di cư của các quần thể người cổ. Tuy nhiên, nó được dùng nhiều đặc biệt trong *pháp y* (forensis science). Phương pháp in dấu DNA sử dụng trong xác định tội phạm có nhiều ưu thế:

- Vết máu, lông hay tinh trùng trên áo trước đó nhiều năm có thể dùng xác định phạm nhân.

- Mẫu dơ bẩn vẫn sử dụng được.

- Tính đặc hiệu cao.

Lần đầu tiên phương pháp này được sử dụng ở tòa án Anh năm 1987 và đến nay đã bắt đầu lập *thư viện in dấu DNA* của nhiều người. Sau đó Mỹ và nhiều nước phương Tây khác sử dụng rộng rãi. Đến nay có nhiều ví dụ rất rõ về uy lực của phương pháp này:

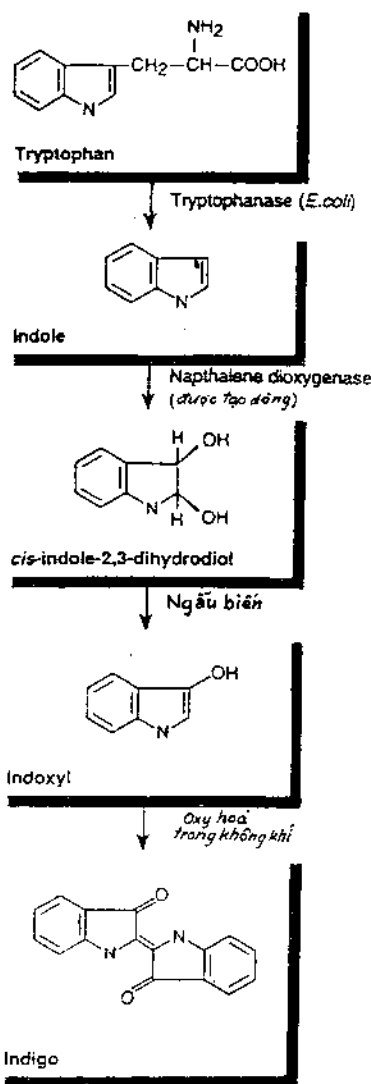
- Vào năm 1984 một đứa bé người Ghana bị từ chối nhập cư vào Anh vì nghi nó không phải là con, mà là cháu một người đàn bà được phép nhập cư. Việc phân tích protein huyết tương, các kháng nguyên và enzyme của máu không xác định được là con hay cháu. Phương pháp in dấu di truyền được thực hiện. Kết quả phân tích bảng điện di cho thấy trong 61 đoạn DNA hiện dấu, đứa bé có 25 đoạn đặc hiệu giống với những đoạn của người đàn bà. Phân tích in dấu DNA chứng minh chắc chắn đứa bé là con với xác suất trùng hợp các đoạn DNA rất cao.

XII. QUYỀN LỰC CẢI TẠO SINH GIỚI CỦA KỸ THUẬT DI TRUYỀN

Kỹ thuật di truyền cho phép con người vượt giới hạn tiến hóa trong cải biến sinh giới. F.Jacob có nói rằng "ở mức phân tử, giữa con vi khuẩn và con voi không có sự khác nhau." Những thành tựu trong 25 năm qua cho thấy sự biến đổi sinh giới bằng kỹ thuật di truyền cho đến nay chưa có giới hạn.

1. Những phương pháp mới điều khiển trao đổi chất để sản xuất các phân tử nhỏ

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã can thiệp có hiệu quả và mở ra nhiều hướng mới trong sản xuất các chất phân tử nhỏ. Trong trường hợp này, 2 ví dụ rất rõ là sinh tổng hợp màu xanh indigo và sắc tố đen melanin do vi sinh

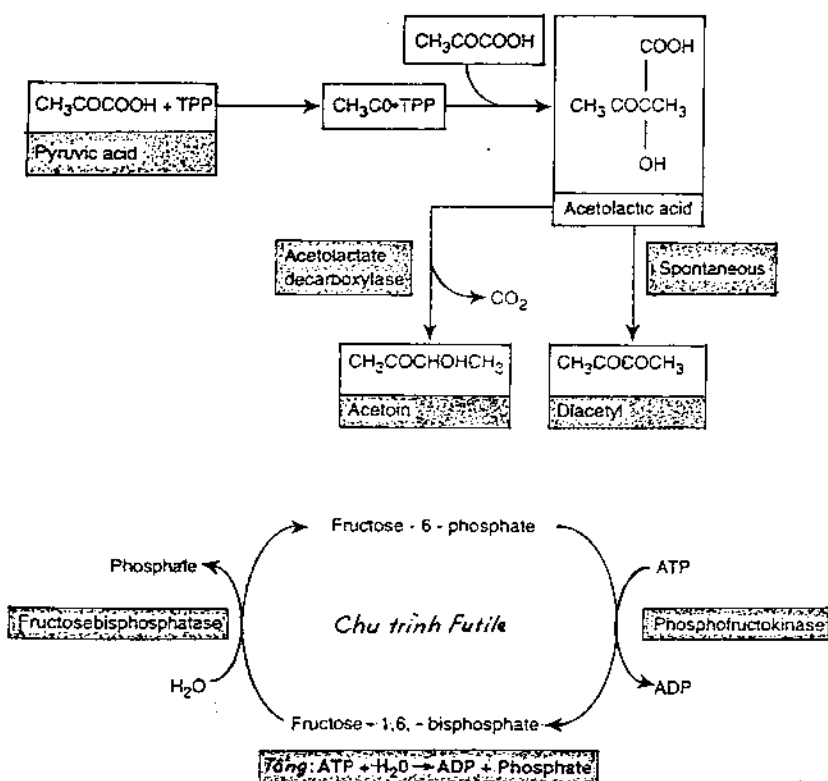


Hình 14.23. Sự tổng hợp indigo xanh trong môi trường có tryptophan

vật. Sự tạo dòng một gen từ *Pseudomonas putida*, gen này mã hóa cho naphthalene dioxygenase, vào *E.coli* làm nó có khả năng tổng hợp **indigo xanh** trong môi trường có tryptophan (hình 14.23).

Tương tự như vậy, sự tạo dòng **gen tạo tyrosinase** cho *E.coli* làm nó biến được tyrosine thành **dopaquinone** và chất này ngẫu biến thành **melanin** khi có không khí.

Nấm men được sử dụng trong sản xuất rượu và bia đã từ nhiều nghìn năm. Kỹ thuật di truyền có thể can thiệp làm tăng chất lượng bia. Ví dụ, trong lên men, các α -acetohydroxyacid thoát vào môi trường và ngẫu biến thành **diacetyl** là chất gây **mùi xấu**. Chất này mất dần trong quá trình trữ lâu khi ủ để chín bia. Bằng tạo dòng nấm men mang gen của *Klebsiella* mã hóa cho α -acetolactate decarboxylase, **acetoin** được tạo ra thay cho diacetyl và làm tạo **mùi thơm** (hình 14.24). Nhờ sử dụng dòng nấm men tái tổ hợp do kỹ thuật di truyền, thời gian ủ chín bia tối thiểu 5 tuần rút xuống còn 2 tuần.



Hình 14.24. Sơ đồ phản ứng tạo acetoin thay cho diacetyl

2. Các tác phẩm mới ở thực vật

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã tạo nên sự bùng nổ của công nghệ sinh học. Sự phát triển của công nghệ sinh học trong buổi đầu hướng chủ yếu vào y học, nên tạo ấn tượng là công nghệ sinh học đồng nghĩa với kỹ thuật di truyền. Nhưng sự can thiệp của kỹ thuật di truyền vào nhiều đối tượng khác nhau đã tạo nên *nhiều sản phẩm mới lạ* đến mức trước đây con người chưa nghĩ tới. *Sự nhiễm các gen lạ* (gene transfection) vào thực vật là một trong những lĩnh vực phát triển nhanh nhất của kỹ thuật di truyền.

a) Cải thiện giống cây trồng

Bước phát triển đầu tiên trên các thực vật nhiễm gen (transgenic plants) là đưa vào chúng các đơn gen cải biến giống cây trồng như *kháng thuốc diệt cỏ* (herbicide) và *kháng bệnh*. Gần đây các nỗ lực hướng vào sự *chuyển đa gen*.

Các phương pháp khác nhau được ứng dụng để vô hiệu hóa sự nhiễm các virus vào cây trồng. Gehrlach và các cộng sự (1987) đã tạo các thực vật có biểu hiện RNA vệ tinh của virus đốm tròn ở thuốc lá (tabaco ringspot virus) và các thực vật này có kiểu hình **kháng virus** tương ứng.

Tiến bộ cũng đạt được trong tạo giống cây trồng **kháng bệnh nấm** nhờ kĩ thuật di truyền như ở thuốc lá và cải dầu (*Brassica napus*) kháng nấm *Rhizoctonia solani*.

Việc đưa gen của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* vào cà chua, thuốc lá, bông vải đã giúp **kháng được sâu hại**.

Tạo sắc tố ở các thực vật nhiễm gen. Nhiều thực vật được dùng làm cây cảnh nên việc biến đổi màu sắc của chúng do các sắc tố rất được quan tâm. Sắc tố của hoa chủ yếu do 3 nhóm chất: flavonoid, carotenoid và betalain. Nhiều **gen tạo flavonoid** đã được tạo dòng và đang tìm nhiều cách khác nhau cho biểu hiện ở thực vật.

Các **antisense RNA** được sử dụng để **thay đổi màu hoa** như biến hoa màu thành trắng hay có đốm.

Năm 1988, hai nhóm các nhà khoa học đã sử dụng antisense RNA làm cho **cà chua chín chậm** và **khó bị dập** hơn.

b) Biến đổi chất lượng thực phẩm của cây trồng

Đây là **bước phát triển lớn thứ hai** của ứng dụng kĩ thuật di truyền vào thực vật. Tinh bột là nguồn dự trữ carbohydrate chủ yếu ở thực vật bậc cao. Nó gồm 2 thành phần chủ yếu :

- Amylose mạch thẳng khó tiêu trong dạ dày của người.
- Amylopectin mạch nhánh dễ hồ hóa và dễ tiêu.

Visser và các cộng sự (1991) đã biến đổi thành phần bột của khoai tây bằng kĩ thuật di truyền. Cây khoai tây này có **rất ít hoặc không có amylose** so với dạng ban đầu (có thể đến 20%).

Ngày nay, nhờ sự can thiệp của kĩ thuật di truyền có thể tạo các thực vật mới có thành phần carbohydrate tốt hơn cho con người. Stark và cộng sự (1992) đã tạo được khoai tây nhiễm gen mà lượng tinh bột chỉ còn 2-5% so với dạng tự nhiên, nhưng cây tạo rất nhiều củ. Các củ này có **glucose** và **sucrose** cao hơn từ **6 đến 8 lần**.

Thực vật bậc cao tạo ra hơn 200 loại acid béo và một số được dùng làm thực phẩm. Tuy nhiên, một số dầu thực vật có giá trị công nghiệp cao hơn dầu ăn. Việc sử dụng kĩ thuật di truyền để **biến đổi thành phần các acid béo**

hứa hẹn nhiều ứng dụng lí thú. Aroadel và cộng sự (1992) đã thành công trong chuyển hóa linoleic acid thành α -linoleic acid.

Ngoài ra, kĩ thuật di truyền còn có thể cải thiện *thành phần protein* của thực vật hay loại bỏ các độc tố của thực phẩm.

c) Thực vật sản xuất các loại hóa chất đặc biệt

Đây là *bước tiến thứ ba* của công nghệ gen ở thực vật. Các thực vật được trồng dễ dàng, khác với vi sinh vật phải cần chuyên gia giỏi để nuôi trong bồn lên men (fermenter) với hóa chất. Nếu sản phẩm tích lũy với số lượng lớn ở thực vật thì giá thành rất rẻ. Ví dụ, giá thành 1kg bắp ở Mỹ chỉ có 1 cent/kg. Do đó, nếu biến được thực vật thành các “*nhà máy hóa chất*” thì công việc sẽ tốt đẹp biết bao.

Ví dụ, Poirier và cộng sự (1992) đã tạo được một loại cây trồng thuộc giống *Arabidopsis* mang gen vi khuẩn *sản xuất chất dẻo polyhydroxybutyrate* (PHB) là chất dự trữ ở vi khuẩn và có tính chất tương tự celophan (giấy bóng). Năm 1996, đã có thông báo nhận được 1kg chất dẻo *PHB từ cây thuốc lá*.

Các protein người dùng trong trị bệnh đã được nêu ở phần trên. Trong tương lai chất thuốc sẽ được sản xuất và chiết tách từ thực vật như hiện nay chiết tách aspirin.

Các gen immunoglobulin được biểu hiện ở thực vật có thể cho phép đạt 1% protein hòa tan ở tế bào lá. Các thực vật có thể sẽ cung cấp nhiều protein quan trọng cho việc chữa trị các bệnh ở người kể cả máu.

3. Các tác phẩm mới ở động vật

Kĩ thuật di truyền cũng đạt nhiều thành tựu đáng kể trong biến đổi các động vật.

Trong phần trên đã đề cập đến “chăn nuôi gen” (gene farming) để sản xuất các protein trị liệu. Ở Mỹ đã có nông trại nuôi trên 500 con dê mang gen người để sản xuất protein trị liệu cho người.

Một thành tựu đáng kể khác là từ vài năm nay, một nông trại ở Anh nuôi cả nghìn con heo mang gen tạo *protein DAF* của người chống phản ứng miễn nhiễm khi ghép cơ quan của heo cho người. Các nhà khoa học đang chờ sự cho phép của nhà nước để thực hiện việc thay tim heo cho người bệnh. Vấn đề chỉ còn lo khi ghép tim có thể bị nhiễm virus của heo gây hại cho người hay không.

Một hướng cải biến quan trọng đối với động vật là tạo các động vật thí nghiệm mang các bệnh tương ứng ở người để nghiên cứu (bảng 15.3).

Vấn đề sử dụng kĩ thuật di truyền để chữa trị các bệnh di truyền ở người được gọi là liệu pháp gen sẽ trình bày ở phần di truyền người.

BẢNG 15.3. Các bệnh tương đương ở người được tạo ra ở chuột

Biến đổi di truyền	Tương đương ở người
Đưa gen collagen đột biến vào chuột	Osteogenesis
Bất hoạt gen của chuột mã hóa cho HPRT	HPRT deficiency
Đột biến ở locus tương ứng trên X	X-linked muscular dystrophy
Đưa các oncogene <i>ras</i> và <i>c-myc</i>	Cầm ứng ung thư (Induction of malignacy)
Đưa allele Z của gen alpha-1-antitrypsin	Neonatal hepatitis
Đưa gen <i>tat</i> của HIV	Kaposi's sarcoma
Siêu sản xuất atrial natriuretic factor	Chronic hypotension
Đưa gen rat angiotensinogen	Huyết áp cao (Hypertension)
Tyrosine kinase có hoạt tính cơ cấu.	Cardiac hypertrophy
Siêu biểu hiện của protein tiền chất của amyloid	Bệnh Alzheimer
Tam nhiễm 16	Bệnh Alzheimer
Biểu hiện của Simian cholesteryl ester protein	Atherosclerosis

Tóm lại, kĩ thuật di truyền đã thể hiện quyền lực to lớn trong cải biến sinh giới về nhiều mặt, không những thay đổi các tính trạng khác nhau, mà can thiệp cả đến chi tiết các thành phần và quá trình trao đổi chất. Nhiều phát minh nối tiếp ra đời đã tạo nên *quyền lực ghê gớm* của kĩ thuật di truyền không những trong chọn giống mà có thể tác động trực tiếp đến cơ thể con người.

Đến nay, sau gần 25 năm phát triển, đóng góp to lớn của kĩ thuật di truyền cho sinh học đi sâu vào bản chất sự sống được coi có tầm quan trọng tương tự *phát minh ra kính hiển vi* vào thế kỉ 17 và về mặt ứng dụng thực tiễn có thể sánh với *chế tạo thành công bom nguyên tử*. Cho đến nay, có thể nói nó chỉ bị giới hạn bởi *đạo lí sinh học*.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA được xây dựng nhờ các công cụ của sinh học phân tử giúp tách, cắt, nối, ghép gen. Các *restriction endonuclease* là công cụ để cắt gen và các *ligase* nối các đoạn DNA. Các gen có thể được thu nhận từ : DNA bộ gen, tổng hợp hóa học hoặc sinh tổng hợp từ mRNA. Để các gen được tạo dòng cần nhiều loại **vector chuyển gen** như plasmid, phage λ , cosmid, phage M13, phagemid, plasmid Ti và nhiễm sắc thể nhân tạo. Các gen lại được gắn vào plasmid nhờ 3 phương pháp khác nhau : đầu cổ kết, linkers và terminal transferase. Phương pháp **biến nạp** với nhiều biến dạng khác nhau hay tải nạp do virus là những biện pháp chủ yếu đưa các plasmid tái tổ hợp vào tế bào. Việc **chọn dòng đúng** tế bào mong muốn tốn nhiều công phu.

Sự **biểu hiện của gen** tạo dòng là ra sản phẩm RNA hay protein phải được hỗ trợ bởi các điều kiện thiết yếu như promotor, rbs... Kỹ thuật di truyền có nhiều ứng dụng quan trọng trong *ngiên cứu sinh học* và *thực tiễn sản xuất* của xã hội loài người.

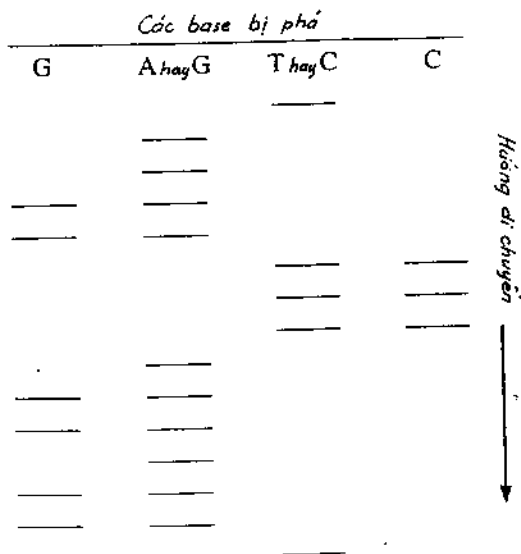
CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Sau khi tìm hiểu chương này, hãy phân biệt giữa kỹ thuật tái tổ hợp với kỹ thuật di truyền. Nêu ví dụ minh họa.
2. Nêu các ứng dụng của restriction endonuclease.
3. So sánh bản đồ restriction với các bản đồ di truyền.
4. Nêu ưu điểm và nhược điểm của từng phương pháp thu nhận gen.
5. Nêu các yêu cầu tối thiểu đối với một vector chuyển gen.
6. Kể các loại vector của *Prokaryotae* và phân tích giá trị sử dụng của từng loại.
7. Loại vector nào mang được đoạn DNA dài nhất ? Nó được cấu tạo như thế nào ?
8. Plasmid nào thực hiện được chuyển gen từ *Prokaryotae* sang *Eukaryotae* trong tự nhiên ?
9. Các ligase nối DNA và RNA như thế nào ?
10. Các đoạn gen có DNA đầu tằm được gắn vào vector nhờ phương pháp nào ?
11. Làm thế nào để đưa plasmid tái tổ hợp vào tế bào ?
12. Để gen tạo dòng có biểu hiện cần những điều kiện gì ?
13. Vì sao PCR được ứng dụng nhanh ?

14. Việc sử dụng *Taq* polymerase có ý nghĩa quan trọng như thế nào ?
15. Vì sao nói kĩ thuật di truyền là công cụ nghiên cứu sinh học ?
16. Di truyền ngược có ý nghĩa như thế nào ?
17. Ứng dụng của antisense-RNA ?
18. So sánh phương pháp Maxam-Gilbert và Sanger.
19. Chương trình xác định trình tự nucleotide của bộ gen người có thuận lợi và khó khăn gì ?
20. Vì sao gọi là công nghệ protein ?
21. Nêu ví dụ về biến đổi chất lượng protein do kĩ thuật di truyền.
22. Nêu các ưu điểm của phương pháp chẩn đoán mới.
23. In dấu di truyền dựa trên cơ sở nào và có ứng dụng chủ yếu vào lĩnh vực nào ?
24. Nêu ví dụ về thay đổi trao đổi chất để sản xuất các chất phân tử nhỏ.
25. Nêu các bước tiến chủ yếu của chuyển gen ở thực vật.
26. Nêu các ví dụ về chuyển gen ở động vật và ứng dụng.

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

1. Một đoạn DNA được cắt bởi restriction endonuclease rồi xử lí tiếp bằng phương pháp của Maxam và Gilbert. Căn cứ theo phóng xạ đồ tự ghi sau đây (hình 14.25), xác định tần số của phần DNA mạch kép, đồng thời chỉ rõ hướng của hai mạch đơn.



Hình 14.25

Bài giải

Vì các đoạn càng nhỏ càng di chuyển xa trên gen, đoạn cuối cùng là nhỏ nhất chứa dấu phóng xạ ở đầu 5'. Nếu một vạch (band) chỉ xuất hiện trong cột T+C, điều đó chứng tỏ rằng đoạn nhỏ tương ứng đã nhận được do cắt ở T. Tất cả các đoạn của cột C đã được cắt ở 1 base (C). Tương tự, một đoạn chỉ xuất hiện trong cột A+G đã được cắt ở A, và tất cả các đoạn của cột G đã được cắt ở G. Như vậy các nucleotide của mạch DNA có thể được đọc theo thứ tự như sau, bắt đầu từ đầu 5' ở dưới cùng:

5' TGGAGGACCCGGAAT 3'

Mạch bổ sung có chiều đối lại theo nguyên tắc bắt cặp A với T, G với C.

5' TGGAGGACCCGGAAT 3'.

3' ACCTCCTGGGCCTTA 5'.

2. Vị trí tương đối của các điểm nhận biết đối với các restriction endonuclease khác nhau được xác nhận do kĩ thuật được gọi là lập bản đồ cắt hạn chế (restriction carse) các đầu mút 3' của một phân tử DNA được đánh dấu P³² (phóng xạ). DNA được hoàn toàn cắt nhỏ bởi xử lí riêng biệt với hai restriction endonuclease (X và Y).

Các đoạn nhỏ nhận được tách ra do điện di trên gen polyacrylamide (EGPA) và các đoạn được đánh dấu đầu mút bởi phóng xạ do tự ghi. Sự di động trên điện di của một đoạn nucleic acid tỉ lệ nghịch logarithm với độ dài của nó. Xử lí với enzyme X tạo ra các đoạn A', B và C' (các dấu sao chỉ dấu phóng xạ), xử lí bằng Y cho các đoạn D', E và F'. Các đoạn A và C, tiếp theo được xử lí bằng Y tạo ra các đoạn từ 1 tới 5, sự phân cắt các đoạn D và F bởi X cho các đoạn nhỏ chống với Y. Người ta có thể nhận biết các đoạn tương đồng tạo nên do cả hai enzyme bởi vì chúng chiếm những vị trí tương tự sau khi điện di trên gen (EGPA). Các đoạn A và F chứa mỗi một đoạn nhỏ duy nhất, tương ứng 1 và 5. Các đoạn B,C,D và E đều được phân hủy thành hai đoạn nhỏ tương ứng 2 và 3, 4 và 5, 1 và 2, 3 và 4. Xếp lại thứ tự của các đoạn nhỏ trong phân tử DNA ban đầu và xác định vị trí của các điểm nhận biết đối với các enzyme X và Y (hình 14.26).

Bài giải

Vì 3 đoạn được tạo ra bởi mỗi enzyme, nên có 2 điểm (site) nhận biết đối với mỗi enzyme (hai chỗ cắt tạo 3 đoạn). Đoạn B không mang dấu phóng xạ, như vậy nó phải nằm giữa các đoạn A và C, tương tự như vậy E phải nằm giữa D và F. Đoạn B chứa một điểm đối với enzyme Y vì xử lí Y tạo các đoạn nhỏ 2 và 3. Suy luận tương tự, C cũng chứa một điểm đối với Y. Nhưng A không chứa điểm cắt đối với Y vì enzyme này không phân hủy A (chỉ một đoạn nhỏ). Giống vậy D và E mỗi đoạn chỉ có một điểm đối xứng với X nhưng F không có. Vì đoạn nhỏ 4 là sản phẩm của sự phân hủy của C và cả của E, hai đoạn nhỏ này có đoạn trùng nhau. B và F cũng tương tự như vậy

(đoạn nhỏ 3 chung), cả B và D (đoạn 2 chung) và A với D (đoạn 1 chung). Toàn bộ các quan sát cho phép xếp thứ tự của phân tử DNA ban đầu.

Các điểm đối với các enzyme restriction endonuclease.

		Các điểm cắt của restriction enzyme			
		X	Y	X	Y
Các đoạn	A	1			
	D	1	2		
	B		2	3	
	E			3	4
	C				4
	F				5
		Các đoạn thứ cấp			
		X	Y	X	Y
*		1	2	3	4
					5
		*			

Hình 14.26

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Một số protein của vi khuẩn được tiết ra bình thường từ tế bào. Nếu insulin được gắn với các protein đó nhờ kĩ thuật di truyền thì sẽ cùng được tiết ra từ tế bào. Giả sử bạn nhận được hộp môi trường agar có một số khuẩn lạc vi khuẩn tái tổ hợp có mang gen tạo insulin của thỏ. Hãy đề xuất phương pháp xác định các dòng tiết ra insulin của thỏ bằng kĩ thuật phóng xạ đồng vị ghi.

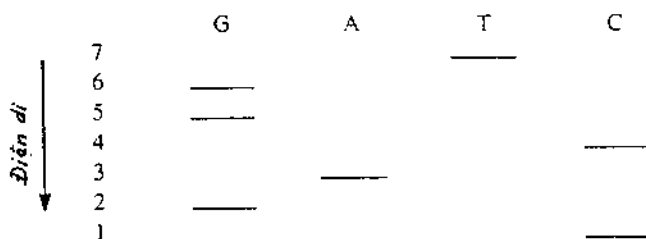
Gợi ý : Các kháng thể có thể gắn vào một số loại plastic để đầu gắn kết với kháng nguyên được tự do thực hiện phản ứng.

2. EcoRI cắt lệch ở palindrom DNA 6 nucleotide; Hae III cắt 1 điểm ở giữa palindrom 4N. Nếu 2 dung dịch DNA tinh sạch được xử lí với 2 enzyme nói trên, thì dung dịch nào có nhiều đoạn DNA hơn ? Giải thích.

3. Vi khuẩn tiềm tan chỉ tạo ra khoảng 200 phân tử repressor của phage λ khi phage λ xen vào bình thường ở điểm gắn đặc hiệu giữa 2 gen của E. coli là gal và bio. Một số gen của vi khuẩn như lac có thể bị cảm ứng tạo ra 20.000 phân tử enzyme trong 1 tế bào. Nếu bạn có thể cắt và nối các gen cấu trúc và điều hòa theo mong muốn, bạn làm cách nào để chế tạo ra vi khuẩn có khả năng tổng hợp tối đa các protein repressor của phage λ ?

4. Giả sử chúng ta tìm cách tạo dòng một gen đặc hiệu của người. Sau khi các đoạn DNA được gắn vào vector plasmid (phương pháp shotgun) và plasmid được đưa vào tế bào nhận. Có bao nhiêu loại tế bào xuất hiện ? Kể ra các đặc tính của chúng.

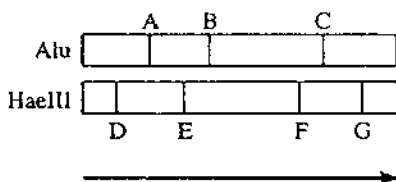
5. a) Theo các vệt ghi trên bản điện di, đại diện cho các đoạn được xác định trình tự bằng phương pháp dideoxy sau đây, xác định trình tự nucleotide vaccin định hướng của đoạn DNA (hình 14.27).



Hình 14.27

b) Vẽ sơ đồ tất cả các đoạn có thể có được của mỗi một trong 4 hệ thống.

6. Một đoạn DNA đã được tinh sạch có đánh dấu phóng xạ P^{32} ở đầu 5', sau đó được phân cắt bởi restriction endonuclease *Alu* (tách từ *Arthrobacter luteus*). Nồng độ thêm vào thế nào để khoảng 1 trên 50 điểm được enzyme nhận biết và cắt. Do vậy, mỗi phân tử DNA, nếu bị cắt chỉ bị cắt một lần. Năm đoạn với kích thước khác nhau được tạo ra. Chúng được khảo sát điện di, phóng xạ đồ tự ghi và đoạn dài nhất (vệt di chuyển chậm nhất) được chọn lọc để phân cắt từng phần: đoạn này được phân cắt bởi 2 thí nghiệm khác nhau, bởi *Alu* và một restriction endonuclease khác *HaeIII* (từ *Haemophilus aegypticus*). Các đoạn mới (đoạn nhỏ hơn) được tách bằng điện di và phóng xạ đồ tự ghi. Các band có cấu trúc như sau (hình 14.28) :



Hình 14.28

a) Xác định trình tự các điểm bị restriction endonuclease cắt trên DNA.

b) Làm sao xác định khoảng cách tương đối giữa các điểm bị cắt ?

SỰ DI TRUYỀN TẾ BÀO CHẤT

Hoạt động sống của tế bào không thể tách rời với tế bào chất. Tế bào chất có những tác động nhất định đối với tính di truyền. Đặc biệt, các bào quan *ti thể* và *lục lạp* có DNA và bộ máy tổng hợp protein riêng. Các gen ở tế bào chất có sự phân li không theo các quy luật di truyền của Mendel và quy luật di truyền nhiễm sắc thể.

Sinh học phân tử giúp hiểu rõ các gen của ti thể và lục lạp cùng sự biểu hiện của chúng trong mối quan hệ phức tạp của ba bộ máy di truyền cùng song song tồn tại trong tế bào là nhân, ti thể và lục lạp.

Không phải tất cả các gen đều nằm trên nhiễm sắc thể của nhân tế bào. Năm 1908 K. Correns, một trong 3 người phát minh lại các quy luật Mendel, là người đầu tiên đã nhận thấy *các gen ngoài nhân* ở thực vật.

Phần lớn các gen ngoài nhân được tìm thấy ở những bào quan của tế bào chất có chứa DNA như ti thể, lục lạp.

Sự di truyền của tế bào chất có các đặc điểm sau :

- Không có *tỉ lệ phân li* rõ ràng như các tỉ lệ Mendel. Điều này dễ hiểu, vì tế bào chất không có cơ chế phân đều về các tế bào con như nhiễm sắc thể.

- Ảnh hưởng của *đòng mẹ* trong truyền thụ các tính trạng. Giao tử cái thường có nhiều tế bào chất hơn giao tử đực nên có ảnh hưởng rõ hơn đối với các tính trạng có sự di truyền tế bào chất. Đặc điểm này không tuyệt đối.

- Một số tính trạng có biểu hiện *đốm* do sự phân li xảy ra ở tế bào soma.

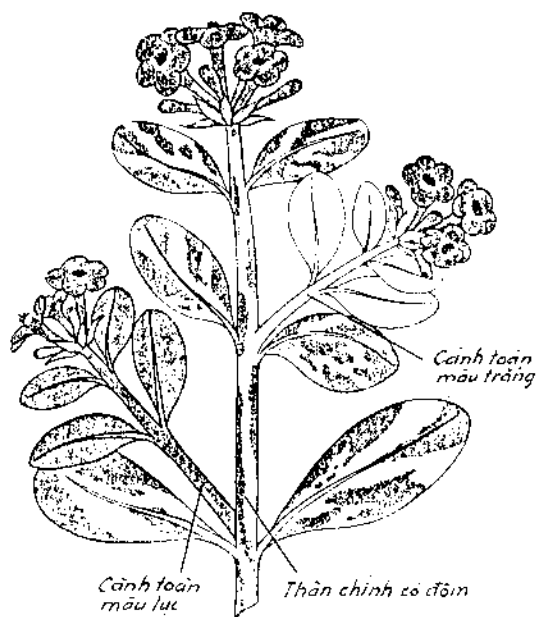
I. SỰ DI TRUYỀN CỦA LỤC LẠP

Bộ gen của lục lạp được kí hiệu *cpDNA* (chloroplast DNA). Bộ gen này ở dạng DNA vòng tròn, dài hơn mtDNA của ti thể 8-9 lần. Đến nay đã biết rõ về nhiều gen mã hóa cho hệ thống sinh tổng hợp protein và các thành phần của lục lạp.

1. Sự di truyền của tính trạng lá đốm

Hiện tượng di truyền lá đốm được phát hiện rất sớm ở *Mirabilis jalapa* (Correns, 1908), ở *Pelargonium zonale* (E. Bauner, 1909). Các cây lá đốm có thể có nguyên cảnh với lá trắng không có chlorophylle (hình 15.1).

Nếu lấy hoa mẹ từ cành với lá trắng và thụ với phần của cây xanh lục thường thì ở F_1 xuất hiện dạng cây lá trắng không có chlorophylle. Các cây này chết vì không có khả năng quang hợp. Khi lấy cây xanh lục bình thường làm mẹ và thụ với phần từ hoa cây lá trắng thì tất cả F_1 có lá xanh lục bình thường.



Hình 15.1. Cây lá đốm ở *Mirabilis jalapa*

(Các hoa có thể hình thành trên các loại cành khác nhau và có thể sử dụng để lai)

Khi thụ phần các hoa của cành đốm bởi phần hoa cây xanh lục thì ở F_1 sẽ có các cá thể lá trắng, lá đốm và lá xanh lục. Nếu lai hoán đổi cha mẹ thì F_1 gồm toàn cá thể lá xanh lục. Đây là ví dụ của kiểu **di truyền theo dòng mẹ**.

Ở thực vật *Pelargonium zonale* có trường hợp **di truyền theo dòng cha**. Nếu hoa của cây lá đốm được thụ với phần của cây lá xanh lục thì 30% cây lai có lá đốm, 70% lá xanh lục. Khi lai hoán đổi cha mẹ thì 70% cây lai lá đốm và 30% xanh lục.

Như vậy, sự di truyền lá đốm không theo các tỉ lệ Mendel và được giải thích do sự phân bố không đều của lục lạp.

2. Các lục lạp

Lục lạp là các bào quan có khả năng *tự tái sinh* ở tế bào thực vật. Sự *phân chia* chúng về các tế bào con trong phân bào *không đều* như sự phân chia của nhiễm sắc thể trong nguyên phân và giảm phân. Chúng có số lượng lớn và phân chia ngẫu nhiên về các tế bào con khi tế bào chất phân chia, nên mỗi tế bào có thể chứa *nhiều hay ít lục lạp*.

Ở những cây lá dỏm, tế bào chất có lục lạp bình thường chứa chlorophylle và lục lạp mất chlorophylle. Trong nguyên phân, một số tế bào nhận các lục lạp bình thường, số khác chỉ nhận lục lạp mất chlorophylle, và đa số nhận cả hai loại. Điều này giải thích hiện tượng cây lá dỏm và hiện tượng phân li theo dòng mẹ khi lai. DNA hiện diện trong lục lạp của thực vật và tảo (bảng 15.1). Ở *Euglena gracilis* (Protozoa quang hợp) người ta đã tách được DNA vòng tròn của lục lạp có kích thước 126.000 bp. Tỷ trọng của DNA này bằng 1,685 g/cm³, khác với DNA của nhân và dễ dàng phân biệt theo đỉnh riêng khi li tâm trên thang nồng độ.

BẢNG 15.1. DNA lục lạp của các tảo và thực vật (Theo Sager, 1975)

Tên	Tỷ trọng DNA (g/cm ³)	
	Nhân tế bào	Lục lạp
<i>Chlamydomonas</i>	1,72	1,695
<i>Chlorella</i>	1,716 - 1,724	1,692-1,695
<i>Euglena</i>	1,707	1,685
<i>Nicotiana tabacum</i>	1,690 - 1,698	1,697-1,698
<i>Spinacia oleracea</i>	1,694 - 1,695	1,696
<i>Brassica rapa</i>	1,692	1,695
<i>Allium cepa</i>	1,689-1,691	1,696
<i>Triticum aestivum</i>	1,702	1,698
<i>Lathyrus odoratus</i>	1,695	1,697
<i>Lactuca sativa</i>	1,694	1,697

Trong lục lạp còn tìm thấy *bộ máy sinh tổng hợp protein* khác rất nhiều với hệ thống trong tế bào chất của *Eukaryotae*, nhưng giống với bộ máy tổng hợp protein của *Prokaryotae*.

3. Các gen của lục lạp ở *Chlamydomonas reinhardtii*

Sự di truyền của lục lạp được nghiên cứu chi tiết hơn cả ở vi tảo *Chlamydomonas reinhardtii* (chu trình sống được mô tả ở chương IV). Tế bào của vi tảo này có một lục lạp lớn với đường kính trung bình 5 micrometer chứa 50 đến 80 bản sao của phân tử DNA vòng tròn dài 196 kb. Vi tảo này có thể đem lai và phân tích bộ bốn nên thuận tiện cho nghiên cứu di truyền (chương XIII).

a) Các đột biến

Theo Sager (1975), ở *Chlamydomonas reinhardtii* có các đột biến trong nhóm liên kết gen của lục lạp như sau :

Các gen	Kiểu hình đột biến
<i>ac₁ - ac₄</i>	Mất khả năng quang hợp, cần bổ sung acetate.
<i>tm₁</i> và <i>tm₃ - tm₉</i>	Không mọc được ở 35°C.
<i>tm₂</i>	Mọc ở 35°C khi có streptomycin.
<i>til₁ - til₅</i>	Hình thành khuẩn lạc nhỏ ở tất cả các loại môi trường.
<i>ery₁</i>	Kháng erythromycin ở nồng độ 50 µg/ml.
<i>kan₁</i>	Kháng kanamycin ở 50µ g/ml.
<i>spc₁</i>	Kháng spectinomycin ở 50µ g/ml .
<i>spi₁ - spi₅</i>	Kháng spiramycin ở 50µ g/ml.
<i>ole₁ - ole₃</i>	Kháng oleandomycin ở 50µ g/ml.
<i>car-1</i>	Kháng carbamycin ở 50µ g/ml.
<i>ele₁</i>	Kháng eleosin ở 50µ g/ml.
<i>ery₃</i> và <i>ery₁</i>	Kháng erythromycin, carbamycin, oleandomycin spiramycin ở nồng độ tùy các chất nêu trên.
<i>sm₂</i> và <i>sm₅</i>	Kháng streptomycin ở nồng độ 500µ g/ml.
<i>sm₃</i>	Kháng streptomycin ở nồng độ 50µ g/ml.
<i>sm₄</i>	Phụ thuộc streptomycin. (phải có streptomycin mới mọc được).

Các đột biến có biểu hiện kiểu hình như sau :

- **Mất khả năng quang hợp**; để mọc được ngoài ánh sáng và trong tối cần bổ sung đường khử là acetate.
- **Nhạy cảm với nhiệt độ** cao hoặc thấp.

– **Tính đề kháng** với thuốc kháng sinh hoặc có nhu cầu được cung cấp thuốc kháng sinh.

Tất cả các đột biến trên có **sự di truyền theo một cha mẹ** (uniparental inheritance), có kiểu bất cặp mt^+ (có thể coi là dòng mẹ). Điều này liên quan đến sự hình thành lục lạp trong hợp tử, bằng cách nào đó chỉ nhận DNA từ lục lạp mt^+ .

Năm 1954, R.Sager đã nghiên cứu các đột biến kháng streptomycin ở *Chlamydomonas reinhardtii* từ dạng hoang dại nhạy cảm *sm-s*. Một số đột biến *sm-r* có sự di truyền nhiễm sắc thể với sự phân li 1:1. Tuy nhiên, một số đột biến có sự di truyền khác thường như sau:

$sm-r\ mt^+ \times sm-s\ mt^- \rightarrow$ tất cả thế hệ con đều *sm-r* với tỉ lệ $1mt^+ : 1mt^-$

$sm-s\ mt^+ \times sm-r\ mt^- \rightarrow$ tất cả thế hệ con đều *sm-s* với tỉ lệ $1mt^+ : 1mt^-$

Như vậy, ở đây khi có sự hoán đổi cha mẹ trong lai, thế hệ con đều có kiểu hình streptomycin của mt^+ . Sự truyền thụ tính trạng này được gọi là **sự di truyền theo một cha mẹ** (uniparental inheritance). Sager coi mt^+ như dòng mẹ và trường hợp trên giống như di truyền theo dòng mẹ. Các gen kiểu bất cặp mt có tỉ lệ phân li của gen trong nhân là 1 : 1.

Ở *C.reinhardtii*, streptomycin có tác động gây đột biến. Các đột biến nhận được do tác động bởi streptomycin đều có sự di truyền theo một cha mẹ (bảng 15.1).

Đặc biệt đột biến *smt4* còn gọi là *smd* (streptomycin – dependent) chỉ mọc khi trong môi trường nuôi có streptomycin.

Sager đã tiến hành thí nghiệm chứng minh sự di truyền của các gen nêu trên liên quan đến **cpDNA của lục lạp**. Các kĩ thuật dùng đồng vị phóng xạ đánh dấu N^{15} và li tâm trên thang nồng độ CsCl được sử dụng. CpDNA của hai cha mẹ đem lai được đánh dấu khác nhau: một dạng mang N^{14} nhẹ, dạng kia mang N^{15} nặng. Tỉ trọng của cpDNA từ các tế bào cha mẹ như vậy tương ứng với 1,69 và 1,70. Nhờ li tâm trên thang nồng độ CsCl có độ nhạy cao nên có thể ghi nhận sự khác nhau giữa các dòng cha mẹ và dòng lai (bảng 15.2).

BẢNG 15.2. Tỉ trọng của cpDNA ở thế hệ con từ các tổ hợp lai *Chlamydomonas*

Tổ hợp lai	Tỉ trọng của cpDNA của hợp tử (g/cm ³)
$N^{14}\ mt^+ \times N^{14}\ mt^-$	1,69
$N^{15}\ mt^+ \times N^{15}\ mt^-$	1,70
$N^{15}\ mt^+ \times N^{14}\ mt^-$	1,70
$N^{14}\ mt^+ \times N^{15}\ mt^-$	1,69

Trên thực tế, các kết quả này cho thấy cpDNA của cha mẹ mt^- bị mất hoặc bị phân hủy như thế nào đó. Sự mất đó kèm theo mất các đột biến (ví dụ: sm) trên cha mẹ mt^- .

Các thí nghiệm khác theo nguyên tắc tương tự được tiến hành với việc sử dụng các đoạn RFLP. Mỗi dòng cha mẹ có cpDNA với RFLP khác nhau. Kết quả cũng cho thấy cpDNA ở thế hệ con nhận được từ dòng mt^+ .

Như vậy, có thể kết luận rằng cpDNA của *Chlamydomonas* được truyền thụ từ một dòng cha mẹ (uniparental) và các gen của nó cũng có sự truyền thụ tương tự.

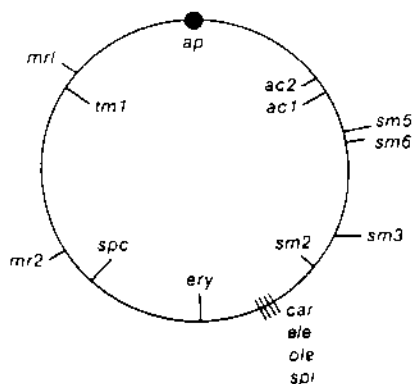
b) Lập bản đồ các gen của *Chlamydomonas*

Trong tổ hợp lai $mt^+sm-r \times mt^-sm-s$ có khoảng 0,1% thế hệ hợp tử con mang cả $sm-r$ và $sm-s$. Các hợp tử như vậy là **hợp tử hai cha mẹ** (biparental zygote) và được gọi là **cytohet** (cytoplasmically heterozygote).

Tần số các **cytohet** có thể tăng lên 40–100% ở thế hệ hợp tử con nếu mt^+ được chiếu tia tử ngoại trước khi lai.

Ở *Chlamydomonas*, các **cytohet** hay hợp tử hai cha mẹ được dùng làm điểm xuất phát cho tất cả các nghiên cứu về sự phân li và tái tổ hợp của các gen lục lạp.

Trên cơ sở nhiều tổ hợp lai, R.Sager đã nêu ra bản đồ vòng tròn của cpDNA với các gen tương ứng (hình 15.2).



Hình 15.2. Bản đồ vòng tròn của cpDNA ở *Chlamydomonas*

4. Tổng quan về bộ gen của lục lạp

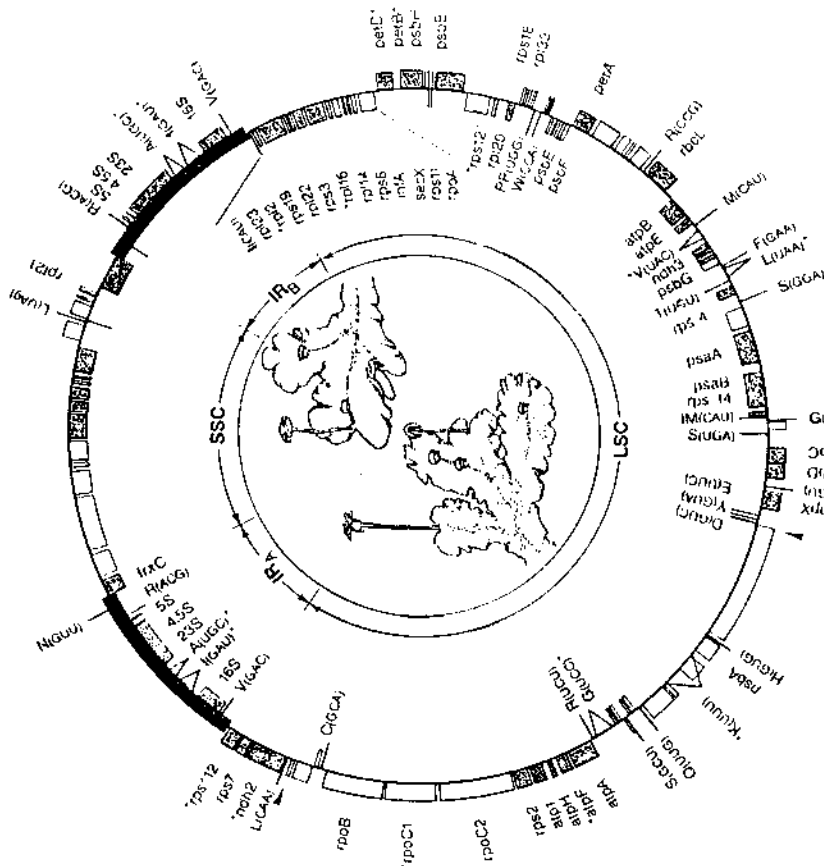
Mặc dù sự di truyền của lục lạp được phát hiện rất sớm, nhưng trong một thời gian dài sự hiểu biết chi tiết về các gen của lục lạp không có bước tiến đáng kể. Các nghiên cứu phân tử đã có góp phần chủ yếu cho sự phân tích chi tiết các gen ở các bào quan. Ngoài các nghiên cứu ở *Mirabilis jalapa* và *Chlamydomonas* mà cpDNA đã được xác định hoàn toàn trình tự nucleotide, bản đồ chi tiết cpDNA của thực vật *Marchantia polymorpha* đã được xây dựng (hình 15.3).

Dịch mã	
•	rps Các protein của ribosome 30S
•	tol Các protein của ribosome 50S
	tm Các tRNA
	4.5S, 5S, Các rRNA
•	16S, 23S
•	infA Nhân tố khởi sự
•	secX Protein của ribosome 50S

Quang hợp và chuỗi chuyển điện tử	
rbc	Ribulose biphosphate carboxylase
psa	Hệ thống quang 1
psb	Hệ thống quang 2
pet	Phức hợp cytochrome b6
atp	Tổng hợp ATP
trx	Các protein Fe-S
ndh	NAD(P)H oxidoreductase

Phiên mã	
•	rpo RNA polymerase

Các gen khác	
•	mbpX Permease



Hình 15.3 Bộ gen của lục lạp ở *Marchantia polymorpha*

IR_A và IR_B (inverted repeats) chỉ các trình tự lặp lại đảo ngược. LSC (large single-copy) chỉ các bản sao đơn độc lớn và SSC (small single-copy) chỉ các bản sao đơn độc nhỏ, ở vòng tròn trong. Các gen nằm phía bên trong vòng tròn lớn phiên mã theo chiều kim đồng hồ, các gen nằm bên ngoài phiên mã ngược chiều kim đồng hồ. Đoạn có mũi tên 2 đầu là cpDNA đảo ngược ở cây thuốc lá. Các gen tạo rRNA ở vùng IR biểu hiện cho 16S, 23S, 4.5S và 5S tương ứng. Các gen tạo tRNA vận chuyển được kí hiệu leu⁺ và mã di truyền trong ngoặc của amino acid tương ứng. Các gen tạo protein được chỉ bằng kí hiệu gen. Các gen có intron có thêm ngôi sao nhỏ. Hình ở trung tâm mô tả cây *Marchantia* đực (phía trên) và cái (dưới). Các khung vuông bên cạnh tóm tắt chức năng của các gen. Các gen tương đồng với các gen vi khuẩn đánh dấu ● và với ti thể ▲ (Theo Suzuki và các đồng tác giả).

Cp DNA điển hình dài khoảng 120 đến 200 kb tùy loài thực vật. Ở *Marchantia*, kích thước phân tử là 121 kb.

Có tất cả 136 gen trên cp DNA của *Marchantia* gồm 4 loại mã hóa tổng hợp rRNA, 31 loại mã hóa tổng hợp tRNA và khoảng 90 gen mã hóa tổng hợp protein. Trong số 90 gen mã hóa tổng hợp protein, có 20 gen mã hóa tổng hợp enzyme cho quang hợp và chuỗi chuyển điện tử. Các gen mã hóa cho các chức năng dịch mã chiếm khoảng một nửa bộ gen của lục lạp và bao gồm các protein và kiểu RNA cần thiết cho sự dịch mã bên trong lục lạp.

Thực tế, DNA của ti thể, lục lạp và của nhân tế bào có sự phối hợp chặt chẽ trong việc tạo ra các tiểu phần của những protein được sử dụng bên trong lục lạp. *Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygenase* (Rubisco hay RuBPCase) là enzyme dồi dào nhất của lục lạp. Nó xúc tác hai phản ứng cạnh tranh nhau, cố định CO₂ và bước đầu tiên của quang hô hấp (photorespiration) với sự tạo ra glycolate. Enzyme gồm 8 tiểu phần lớn LS giống nhau và 8 tiểu phần nhỏ giống nhau được mã hóa tương ứng bởi các gen của lục lạp và nhân tế bào. Tiểu phần lớn LS (large subunit) mang trung tâm xúc tác, còn vai trò của các tiểu phần nhỏ chưa rõ. Gen LS nằm trên cp DNA của một số thực vật như bắp, *Chl.reinhardtii*, thuốc lá, *Euglena*,... Trong tất cả các trường hợp, gen LS hiện diện 1 bản sao cho 1 DNA của lục lạp. Ngược lại, các gen của tiểu phần nhỏ được tìm thấy ở các trình tự DNA của nhân tế bào với số bản sao ít.

II. SỰ DI TRUYỀN CỦA TI THỂ

Bào quan *ti thể* có ở tất cả các tế bào *Eukaryotae* nên được nghiên cứu chi tiết hơn cả. Bộ gen của ti thể được kí hiệu *mtDNA* (mitochondrial DNA). mtDNA mã hóa tổng hợp cho nhiều thành phần của ti thể: hệ thống 2 loại rRNA, 22-25 loại tRNA và nhiều loại protein có trong thành phần của màng bên trong ti thể. Trong khi đó, phần lớn protein của ribosome ti thể do các gen trong nhân xác định.

1. Các gen của ti thể ở *Saccharomyces cerevisiae*

Các gen này nghiên cứu bằng phân tích di truyền kết hợp với sinh học phân tử là những ví dụ điển hình của gen ngoài nhân.

a) Các đột biến gen của ti thể

Ở ti thể của *Saccharomyces cerevisiae* có 3 kiểu đột biến chủ yếu là: *petite*, *antR* và *mit⁻*.

Một ví dụ về gen ti thể là **đột biến thiếu nang hô hấp** ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Vào những năm 1940, Boris Ephrussi và các cộng sự đã mô tả lần đầu tiên các đột biến đặc biệt ở nấm men. Các đột biến này được gọi là **petite** (tiếng Pháp là “nhỏ”) vì có **khuẩn lạc nhỏ** hơn nhiều so với các khuẩn lạc hoang dại. Các đột biến **petite** gồm 3 loại khác nhau theo phương thức di truyền và được gọi như sau:

– **Petite phân li** (Segregation petites) : Khi lai với dạng hoang dại khuẩn lạc to bình thường thì tỉ lệ phân li trong các nang bào tử (ascospore) là 1 khuẩn lạc to : 1 petite. Các petite này liên quan đến các đột biến trong nhân tế bào.

– **Petite trung tính** (Neutral petites): Khi lai với dạng khuẩn lạc to thì sự phân li trong nang bào tử chỉ có dạng khuẩn lạc to, thể hiện sự **di truyền theo một cha mẹ** (uniparental).

– **Petite ức chế** (Suppressive petites) : Khi lai tạo các nang bào tử (ascospore) mà một số mọc thành khuẩn lạc to, số khác tạo khuẩn lạc **petite** (nhỏ). Thì tỉ lệ giữa to và nhỏ dao động nhưng có tính đặc hiệu của chủng: một số **petite** ức chế chỉ tạo thế hệ con **petite** trong các tổ hợp lai như vậy. Các **petite** ức chế cho thấy có sự **di truyền ngoài nhân** tế bào và một số có sự **di truyền theo một cha mẹ**.

Khi lai nấm men, hai tế bào cha mẹ kết hợp với nhau và góp tế bào chất như nhau vào tế bào con lưỡng bội (xem chu trình sống nấm men ở chương XIII). Đây là điểm khác giữa nấm men với *Chlamydomonas*. Sự di truyền của các **petite** trung tính và ức chế độc lập với kiểu bất cặp (a và α), thể hiện rõ sự di truyền ngoài nhân nên được gọi là **petite tế bào chất**. Qua nghiên cứu, chúng có những đặc điểm kiểu hình như sau:

– **Chuỗi chuyển điện tử** của ti thể bị **sai hỏng** ở các **petite** tế bào chất. Do sai hỏng này chúng lên men để tạo ATP kém nên mọc chậm.

– **Không có sinh tổng hợp protein** ở các **petite** tế bào chất. Các ti thể có hệ thống sinh tổng hợp protein riêng (như ở lục lạp) gồm tRNA vận chuyển, các ribosome khác với ở tế bào chất.

– **DNA ti thể** (mtDNA) ở các đột biến **petite** có **biến đổi lớn**. Ti thể của tất cả *Eukaryotae* có mtDNA riêng tuy số lượng nhỏ, nhưng khác với DNA của nhân tế bào. Ở các **petite trung tính** mtDNA bị mất hoàn toàn, còn ở các **petite ức chế** thì có sự thay đổi đáng kể tỉ lệ base so với mtDNA của dạng khuẩn lạc to.

Nhóm các đột biến thứ hai của nấm men là **ant^R** (ant^R mutants), được ghi nhận bởi kiểu hình đề kháng với các kháng sinh khác nhau. Ví dụ : **cap^R**

(chloramphenicol resistance) kháng chloramphenicol, ery^R - kháng erythromycine, spi^R - kháng spiromycin, par^R - kháng paranomycine và oli^R - kháng oligomycin. Các đột biến này khi lai (ví dụ $ery^R \times ery^S$) cho tỉ lệ phân li không theo quy luật Mendel, giống như các petite ức chế, nhưng sự di truyền có khác. Khi các tế bào cha mẹ kết hợp, sản phẩm lưỡng bội là *cytohet*. Các diploid này có thể sinh sản vô tính bằng mọc chồi. Trong nguyên phân, quá trình *phân li tế bào chất và tái tổ hợp* (cytoplasmic segregation and recombination) xảy ra và các tế bào con trở thành ery^R hay ery^S .

Nhóm đột biến quan trọng thứ ba là mit^- (mit^- mutants), được phát hiện sau cùng nhờ kĩ thuật chọn lọc đặc biệt. Các đột biến này tương tự các đột biến *petite* ở chỗ có *khuẩn lạc nhỏ* và các chức năng bất thường của chuỗi chuyển điện tử, nhưng điểm khác căn bản là *sinh tổng hợp protein bình thường* và có khả năng *hồi biến*. Như vậy, các đột biến mit^- là *đột biến điểm*. Sự di truyền của các đột biến mit^- giống với kiểu ant^R , có sự *phân li tế bào chất và di truyền theo một cha mẹ* trong giảm phân.

b) Lập bản đồ bộ gen ti thể của nấm men

Có vài phương pháp khác nhau xây dựng bản đồ bộ gen ti thể.

- *Lập bản đồ tái tổ hợp* (Recombination mapping) : Ở nấm men, sự phân li tế bào chất và tái tổ hợp xảy ra trong quá trình mọc chồi ở *cytohet lưỡng bội*. Sự phân li và tái tổ hợp có thể phát hiện trực tiếp ở các lưỡng bội mọc chồi hay quan sát sản phẩm giảm phân khi chồi được kích thích tạo bào tử.

Ví dụ, khi lai $ery^R spi^R \times ery^S spi^S$ có thể nhận được các kiểu bộ bốn với số lượng như sau :

$ery^R spi^R$	63 bộ bốn
$ery^S spi^S$	48 - " -
$ery^S spi^R$	7 - " -
$ery^R spi^S$	1 - " -

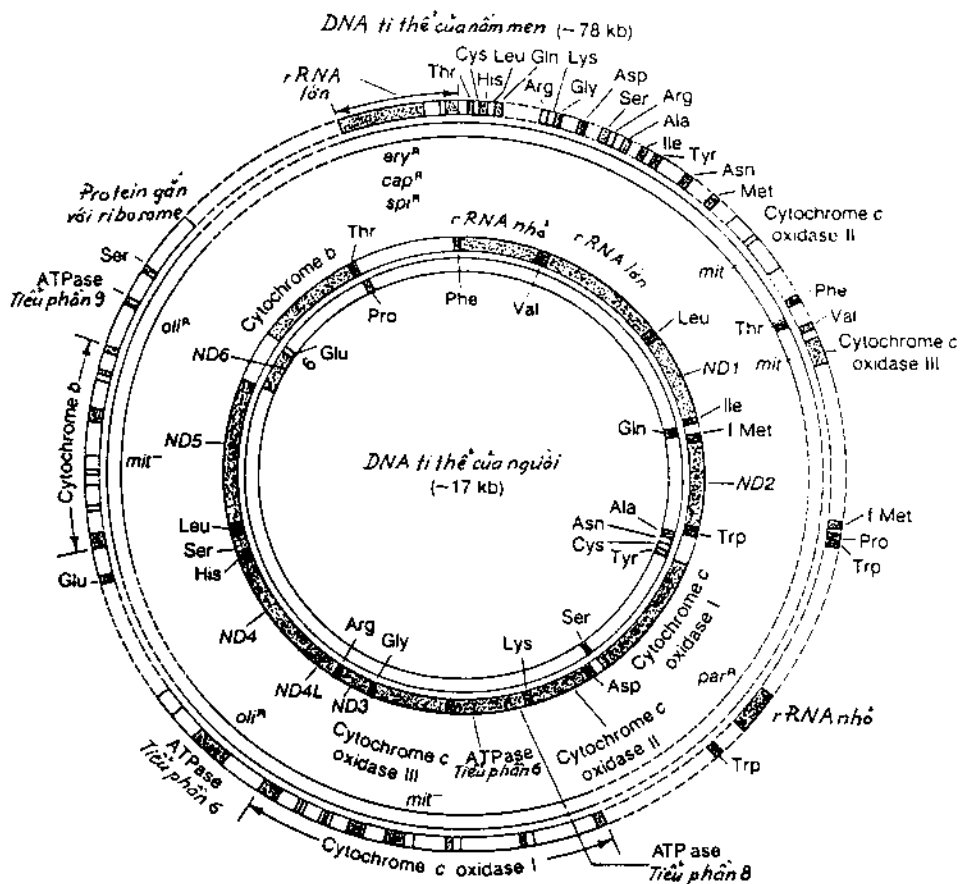
Các kiểu gen $ery^S spi^R$ và $ery^R spi^S$ là các dạng tái tổ hợp.

- *Lập bản đồ bằng phân tích petite* : Một số kĩ thuật lập bản đồ có hiệu quả dựa trên sự *phối hợp* cả 3 loại đột biến *petite*, ant^R và mit^- . Phần lớn các tiếp cận này dựa vào sự *mất đoạn* của mtDNA của các đột biến *petite*. Sự kết hợp các kiểu phân tích di truyền đặc biệt với *kĩ thuật tái tổ hợp DNA* đã dẫn đến xây dựng bản đồ di truyền hoàn chỉnh của mtDNA.

– **Lập bản đồ bằng phân tích restriction enzyme** : Các restriction enzyme là công cụ hữu hiệu mới để phân tích di truyền. Nó được sử dụng không những để phân tích mtDNA của nấm men, mà cả mtDNA của bất kì sinh vật nào miễn chiết tách và tinh sạch được DNA di truyền.

2. Tổng quan về bộ gen của ti thể

a) Bản đồ mtDNA của nấm men và của người



Hình 15.4. Bản đồ mtDNA của nấm men (vòng ngoài) và người (vòng trong).

Theo Suzuki và các đồng tác giả (1989).

Mỗi bản đồ được thể hiện ở 2 vòng tròn đồng tâm tương ứng với 2 mạch DNA. Bản đồ mtDNA của người được xây dựng bằng phương pháp vật lí. Bản đồ của nấm men được lập nên bằng sự kết hợp giữa phân tích di truyền và vật lí. Các đột biến của nấm men được ghi phía trong.

Màu xám: các exon và các gen không gián đoạn.

Màu đen: các gen tRNA, được kí hiệu bằng chữ viết tắt của các amino acid tương ứng.

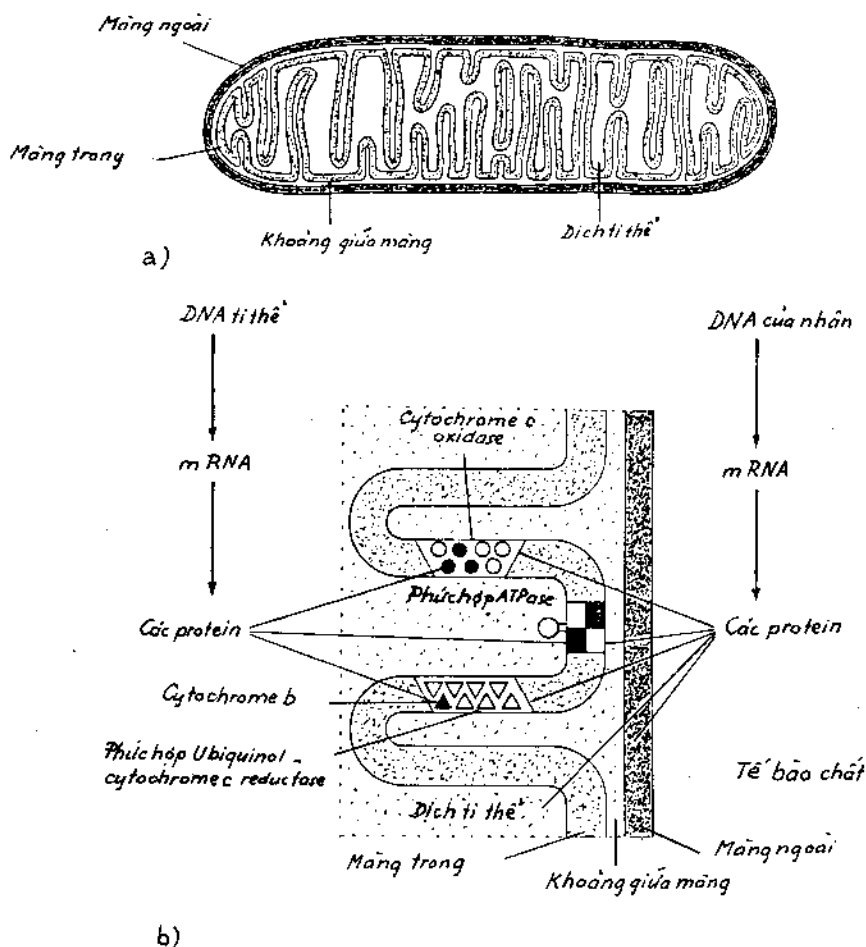
ND: các gen mã hóa cho các tiểu phần của NADH deshydrogenase (tỉ lệ của 2 loại bản đồ không như nhau).

Việc xây dựng bản đồ mtDNA hoàn chỉnh của nấm men và người là thành tựu đáng kể của nghiên cứu di truyền tế bào chất (hình 15.4).

– Một số trình tự có codon khởi sự và codon kết thúc ở cuối nhưng chưa biết chức năng.

– mtDNA của người rất *cô đọng* (ít dư thừa).

b) Hệ thống sinh tổng hợp protein của ti thể



Hình 15.5. Sự hợp tác giữa mtDNA và DNA của nhân nấm men trong mã hóa cho các protein cấu phần của màng trong ti thể.

a) Khái quát cấu trúc của ti thể ; b) Các chi tiết của cấu tạo màng. Ba đơn vị chức năng được thực hiện trong sự hợp tác. mtDNA cung cấp 6 protein, 3 tiểu phần (3 vòng tròn đen) của cytochrome c oxidase, 2 tiểu phần (subunits) của ATPase (2 hình vuông đen) và cytochrome b (tam giác đen).

Bộ gen của ti thể có hai chức năng chủ yếu:

– Mã hóa cho một số protein tham gia chuỗi chuyển điện tử.

– Mã hóa cho hệ thống sinh tổng hợp protein gồm một số protein, tất cả các tRNA và cả 2 loại rRNA.

Tuy nhiên, trong cả hai trường hợp, những cấu phần còn lại của hệ thống được mã hóa do các *gen của nhân* và được *dịch mã ở bào tương* (cytosol) rồi chuyển vào ti thể (hình 15.5). Đến nay chưa rõ vì sao có sự phân công như vậy.

Như vậy, việc nghiên cứu các gen của ti thể cho thấy tế bào *Eukaryotae* không lục lạp có ít nhất **hai hệ thống** sinh tổng hợp protein độc lập tương đối nhưng luôn hợp tác chặt chẽ với nhau. Ở các *Eukaryotae* có lục lạp thì **ba hệ thống** sinh tổng hợp protein độc lập tương đối nhưng hợp tác với nhau. Cần lưu ý rằng cả hai bào quan ti thể và lục lạp tham gia trực tiếp vào **chuyển hóa năng lượng** của tế bào. Các thành tựu của sự di truyền các bào quan góp phần đáng kể vào sự hiểu biết về hoạt động tổng thể của tế bào.

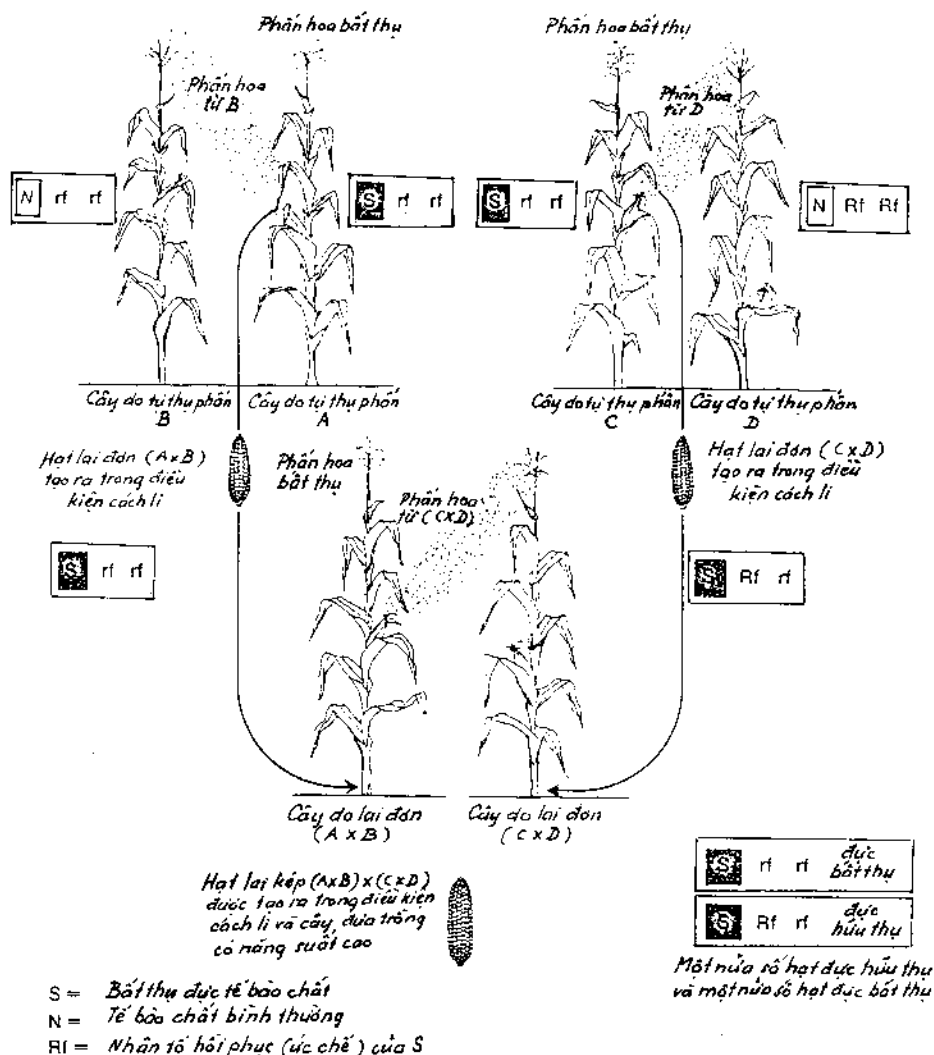
Trong chương VI, bộ mã 64 codon là chung cho cả sinh giới với một ít ngoại lệ, mà một số thuộc hệ thống dịch mã của ti thể. Trên bản đồ, mtDNA nấm men có 25 tRNA và người có 22 tRNA đảm nhận dịch mã ở ti thể. Số này thấp hơn nhiều so với tối thiểu là 32 tRNA cần cho sự dịch mã của mRNA bắt nguồn từ nhân tế bào. Sự tiết kiệm này có được nhờ “đu di (wobble) nhiều hơn”. Ở mtDNA của người, 22 kiểu tRNA và một số codon khác nghĩa so với dịch mã trong bào tương.

BẢNG 15.2. Nghĩa của một số codon khi dịch mã ở ti thể và ở bào tương của tế bào người

Codon	Ti thể	Bào tương
AAA	Kết thúc	Kết thúc
UAG	Kết thúc	Kết thúc
UGA	Tryptophan	Kết thúc
AUA	Methionine	Isoleucine
AUG	Methionine	Isoleucine
AGA	Kết thúc	Arginine
AGG	Kết thúc	Arginine

III. CÁC KIỂU DI TRUYỀN TẾ BÀO CHẤT KHÁC

Ngoài sự di truyền các bào quan, còn có nhiều dạng đột biến tế bào chất khác. *Neurospora* đột biến ngoài nhân được phát hiện có tên *Poky* (xem bài tập). Ngoài ra, đáng lưu ý là sự bất thụ đực ở thực vật, sự truyền thụ các virus và các phần tử ngoài nhân theo dòng mẹ.



Hình 15.6. Sử dụng bất thụ đực tế bào chất tạo hạt bắp lai.

Trên sơ đồ, bắp lai được tạo từ bốn dòng thuần chủng A,B,C,D. Các cá thể lai như vậy được gọi là dạng lai kép (double- crosse hybrid). Ở mỗi bước, sự tự thụ phấn được ngăn chặn bởi sự kết hợp của các gen bất thụ đực tế bào chất với các gen hồi phục hữu thụ của nhân để đảm bảo chắc chắn cây mẹ bất thụ đực.

1. Bất thụ đực ở thực vật

Ở nhiều thực vật hoang dại và cây trồng thường gặp các dạng không tạo phấn hoa, hay tạo phấn hoa không có khả năng thụ tinh. Hiện tượng này được gọi là **bất thụ đực** (male sterility). Nó có thể do một gen được truyền **theo dòng mẹ**, được gọi là **bất thụ đực tế bào chất** (cytoplasmic male sterility).

Bất thụ đực tế bào thực vật được nghiên cứu kĩ nhất ở cây bắp. Khi cây bất thụ đực làm cây cái được thụ tinh bởi phấn hoa cây hữu thụ bình thường thì thế hệ con tất cả đều bất thụ đực. Sự di truyền thể hiện rõ theo dòng mẹ. Bất thụ đực tế bào chất ở bắp liên quan đến 2 plasmid dạng thẳng **S1** và **S2**. Chúng ở trong ti thể cùng với mtDNA. Một trong những tính chất khó hiểu của plasmid này là chúng có thể thực hiện tái tổ hợp với mtDNA.

Hiện tượng bất thụ đực được sử dụng trong chọn giống cây trồng để tạo hạt lai, mà khỏi tốn công hủy bỏ phấn hoa cây mẹ. Các dòng bất thụ đực sẽ nhận phấn hoa từ cây bình thường khác. Hình 15.6 mô tả sơ đồ phức tạp tạo hạt lai ở cây bắp.

2. Sự di truyền do virus và các phần tử ngoài nhân

Sự xâm nhập của virus hay một số phần tử khác vào tế bào có thể gây hiệu quả di truyền tế bào chất.

Ví dụ : một số dòng *Drosophila* nhạy cảm cao với CO_2 . Chúng sẽ chết trong vòng 15 phút trong môi trường toàn CO_2 nguyên chất, trong khi đó các dòng bình thường khác chịu đựng được dễ dàng. Khi lai các ruồi cái nhạy cảm với ruồi đực bình thường, thậm chí trong vài thế hệ, tất cả ruồi con đều nhạy cảm. Khi lai hoán đổi cha mẹ sự nhạy cảm CO_2 được truyền thụ ít hơn. Như vậy, sự di truyền này có bản chất **ngoài nhân**.

Có thể gây nhiễm tính trạng nhạy cảm với CO_2 cho các dòng ruồi bình thường bằng cách cấy cơ quan từ các ruồi nhạy cảm. Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy sự nhạy cảm với CO_2 liên quan đến virus σ có các đặc tính gần với virus *vesicular stomatitis* chứa RNA. Sự gây nhiễm loại virus này cho ruồi giấm làm nó trở nên nhạy cảm với CO_2 .

Phần tử tế bào chất khác là δ được Minamori phát hiện cũng ở ruồi giấm, tương tự như retrovirus. Phần tử δ truyền thụ qua tế bào chất và theo dòng mẹ, có thể gây chết phôi.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các *bộ gen ngoài nhân* góp phần bổ sung cho hoạt động của các gen trong nhân. Sự phân li của các gen tế bào chất không theo tỉ lệ Mendel và thường *truyền theo một cha mẹ* (uniparental). Sự kết hợp phân tích di truyền với sinh học phân tử chứng minh rõ ràng bộ gen của các bào quan là DNA (*cp DNA* hay *mtDNA*).

cpDNA của lục lạp lớn và phức tạp hơn mtDNA của ti thể. Các đột biến của cpDNA dẫn đến các sai hỏng quang hợp hoặc đề kháng thuốc.

mtDNA của ti thể được nghiên cứu kĩ hơn cả, nó mã hóa cho các thành phần dịch mã trong ti thể, các cấu phần của chuỗi chuyển điện tử và một số enzyme hô hấp trên các màng ti thể. Các đột biến ở gen ti thể dẫn đến thiếu năng lượng hô hấp hoặc kháng thuốc.

Tế bào có *các hệ thống sinh tổng hợp protein* khác ngoài nhân tế bào, nhưng có sự phối hợp chặt chẽ giữa chúng lẫn nhau.

Ngoài sự di truyền của các bào quan, sự bất thụ thực thể bào chất, sự di truyền do virus hoặc một số nhân tố khác đều có những cơ chế riêng.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vì sao sự di truyền tế bào chất được phát hiện sớm mà trong một thời gian dài chậm phát triển?
2. Hãy kể và mô tả 2 thí nghiệm chứng minh có sự di truyền tế bào chất.
3. Di truyền lục lạp được nghiên cứu tốt nhất ở đối tượng nào? Vì sao?
4. Ti thể có các kiểu đột biến nào, kể ra và nói về cơ chế sai hỏng?
5. So sánh sự giống nhau và khác nhau giữa cpDNA và mtDNA.
6. So sánh hệ thống dịch mã ở lục lạp và ti thể.
7. Các bộ gen của nhân và của các bào quan hợp tác như thế nào ở mức protein? Minh họa bằng 1 ví dụ ở lục lạp và 1 ví dụ ở ti thể.
8. Nếu có hạt bắp từ dòng bất thụ thực, làm sao xác định sự bất thụ do gen trong nhân hay ngoài nhân?
9. Nêu ví dụ cho thấy sự di truyền tế bào chất có thể do virus.

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

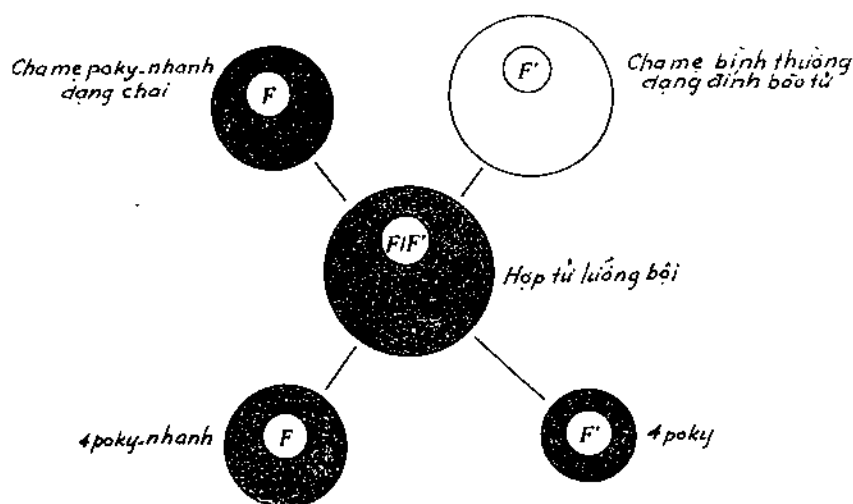
Ở *Neurospora*, đột biến "*poky*" (tiếng Anh - nhỏ) mọc chậm do hệ thống enzyme hô hấp bất thường giống như đột biến *petite* ở nấm men. Tính trạng *poky* được truyền

theo dòng mẹ. Gen F của nhiễm sắc thể tương tác với tế bào chất *poky* làm nấm mọc nhanh hơn gọi là *poky-nhanh* (fast-poky), dù hệ thống enzyme vẫn bất thường. Tế bào chất *poky* không thường xuyên biến đổi khi tiếp xúc với kiểu gen F trong hợp tử. Tế bào chất sẽ trở lại trạng thái *poky* khi kiểu gen có allele tương ứng F'. Gen F không có biểu hiện kiểu hình ở tế bào chất bình thường. Nếu dạng mẹ là *poky-nhanh* và dạng cha (conidia) bình thường, hãy dự kiến các kiểu gen và kiểu hình của các nang bào tử (ascospore).

Lời giải

Tế bào chất hơi biến đổi khi có ti thể *poky*. Các gen của nhiễm sắc thể phân li với tỉ lệ 1 : 1, nhưng tế bào chất *poky* di truyền theo dòng mẹ. Sự phát hiện thể hệ con *poky* chứng tỏ tế bào chất *poky* không bị biến đổi khi chịu tác động của gen F ở trạng thái lưỡng bội của hợp tử.

Sơ đồ lai với kiểu gen và kiểu hình các nang bào tử dự kiến như sau :



Hình 15.8

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Nếu người đàn bà nhiễm bệnh sởi trong 3 tháng đầu khi có thai, đứa trẻ có thể sẽ bị bệnh nặng dù mẹ không bệnh thường xuyên. Các triệu chứng bất thường như bệnh tim, gan, đái tháo và mù thường biểu hiện ở trẻ sơ sinh.

Các kiểu hình biểu hiện ra có thể coi là các sai hỏng di truyền hay không ?

2. Phần lớn các dòng *Chlamydomonas* nhạy cảm với streptomycin, nhưng có đột biến cần streptomycin mới mọc được. Làm thế nào để phân biệt sự phụ thuộc streptomycin do gen trong nhân và do gen ở tế bào chất ?

3. Gen F của nhân khi có tế bào chất *poky* sẽ tạo kiểu hình *poky-nhanh*. Nếu có tế bào chất bình thường F không có biểu hiện kiểu hình. Làm thế nào để xác định dòng *Neurospora* có sự phát triển bình thường do nhân tố F hay do gen F' ?

4. Các cây bắp bất thụ đực có thể được tạo ra nhờ gen của nhiễm sắc thể hay nhân tố tế bào chất.

a) Có ít nhất 20 gen bất thụ đực *ms* (male sterility) khác nhau ở bắp. Tất cả đều lặn. Vì sao ?

b) Dự kiến kết quả F_1 và F_2 do thụ phấn bởi gen bình thường cho các cây bất thụ đực.

c) Thụ phấn cây bất thụ đực tế bào chất bởi phấn hoa bình thường.

GỢI Ý :

1. *Đáp* : Cần phân biệt các sai hỏng di truyền bẩm sinh với tập nhiễm từ môi trường lúc mang thai. Trường hợp này do tác nhân nhiễm như virus sợi không gắn vào bộ gen đứa trẻ, và có lẽ tác nhân nhiễm từ ngoài.

2. *Đáp* : Lai $ss\ mt^-$ (đực) với $sd\ mt^+$ (cái); nếu là gen của nhân tỉ lệ sẽ là: 25% $ss\ mt^-$: 25% $ss\ mt^+$: 25% $sd\ mt^-$: 25% $sd\ mt^+$, nếu di truyền tế bào chất phần lớn theo dòng mẹ.

3. *Đáp* : Từ tổ hợp lai khuẩn lạc nhỏ với khuẩn lạc bình thường, gen của nhân sẽ tạo sự phân li các bào tử với tỉ lệ 1 : 1. Nếu do gen ngoài nhân sẽ không có sự phân li và tất cả các bào tử sẽ mọc bình thường.

4. *Đáp* :

a) Cây bất thụ đực có gen của nhân xuất hiện do đột biến sẽ không có khả năng tự thụ phấn và sẽ mất do thụ phấn chéo từ cây hữu thụ. Gen sẽ bị loại nhanh từ các dị hợp tử trong thế hệ lai do lai ngược với phần các cây cha mẹ bình thường.

b) F_1 : + / *ms*, hữu thụ; F_2 : 1/4 + / +, 1/2 + / *ms*, 1/4 *ms* / *ms*; 3/4 hữu thụ, 1/4 bất thụ đực.

c) Tế bào chất bất thụ đực truyền cho tất cả F_1 ; F_2 do tự thụ phấn không được tạo ra vì phấn bất thụ.

PHẦN V

DI TRUYỀN HỌC PHÁT TRIỂN CÁ THỂ VÀ DI TRUYỀN HỌC TIẾN HÓA

Trong phần này, chúng ta sẽ nghiên cứu sự biểu hiện của thông tin di truyền theo thời gian và trong không gian :

– *Quá trình phát triển cá thể* của các *Eukaryotae* đa bào từ trứng thụ tinh đến cơ thể trưởng thành rất phức tạp. Trước đây, nhiều vấn đề *sinh học phát triển* tưởng chừng khó với tới được, kĩ thuật tái tổ hợp DNA đã tạo nên cuộc cách mạng trong sinh học, đồng thời đưa di truyền học phát triển vào thời kì mới với nhiều thành tựu to lớn.

– *Sự biến động của bộ gen* : Di truyền học phân tử hiểu rõ hơn về các cơ chế phân tử của tái tổ hợp và các kiểu tái tổ hợp, về các phần tử di động, về sự di truyền miễn nhiễm.

– *Sự tiến hóa ở mức vĩ mô với đơn vị quần thể* : Các nghiên cứu di truyền học quần thể đã góp phần đáng kể vào sự phát triển tiếp tục học thuyết tiến hóa.

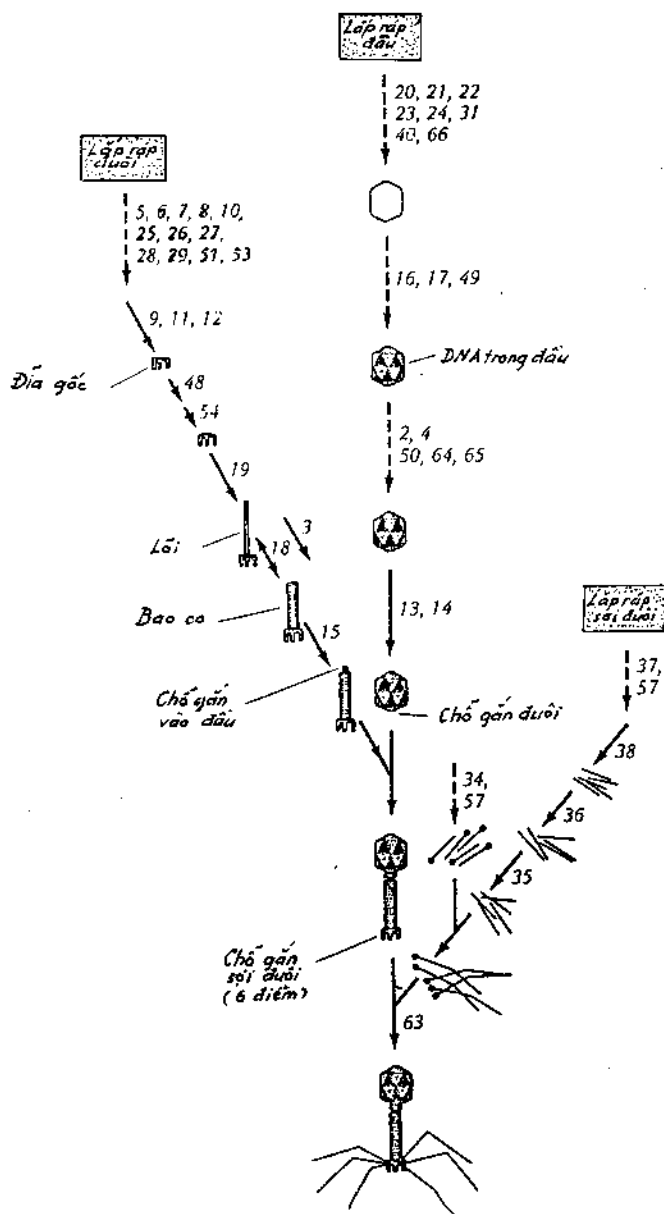
CHƯƠNG XVI

DI TRUYỀN HỌC PHÁT TRIỂN CÁ THỂ

Di truyền học phát triển cá thể là một trong những lĩnh vực khó hiểu nhất của di truyền học. Các nghiên cứu được tiến hành trên *nhiều đối tượng mô hình* khác nhau. *Tổ chức bộ gen* và nhiều nhân tố khác có ảnh hưởng đến sự phát triển cá thể. Các gen thực hiện chương trình phát triển theo thời gian, các tế bào *biệt hóa* theo nhiều hướng khác nhau và cơ thể từng bước được hình thành theo mẫu hình thiết kế. Toàn bộ sự phát triển được thực hiện theo *chương trình chính xác*.

I. CÁC ĐỐI TƯỢNG MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN HỌC PHÁT TRIỂN CÁ THỂ

Phát triển cá thể là một quá trình rất phức tạp, nên các nhà nghiên cứu đã sử dụng nhiều đối tượng mô hình khác nhau từ đơn giản nhất đến nhiều mức độ phức tạp khác nhau.

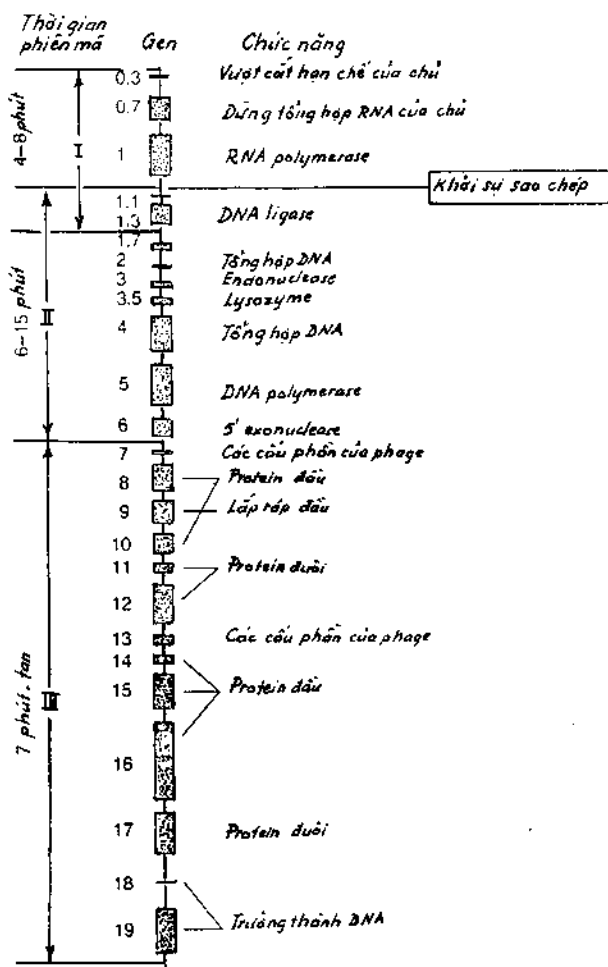


Hình 16.1. Trình tự phát triển hình thái của phage T4 (các số chỉ các gen)

1. Các đối tượng mô hình là virus

Các virus là mô hình đơn giản nhất được sử dụng để nghiên cứu sự phát triển. Các kết quả đạt được chi tiết nhất ở **phage T4** (hình 16.1). Hầu như tất cả các gen và vai trò tương ứng của phage T4 đã được biết.

Ngoài ra, trình tự **hoạt động nối tiếp** của các gen **theo thời gian** cũng được xác định (hình 16.2).

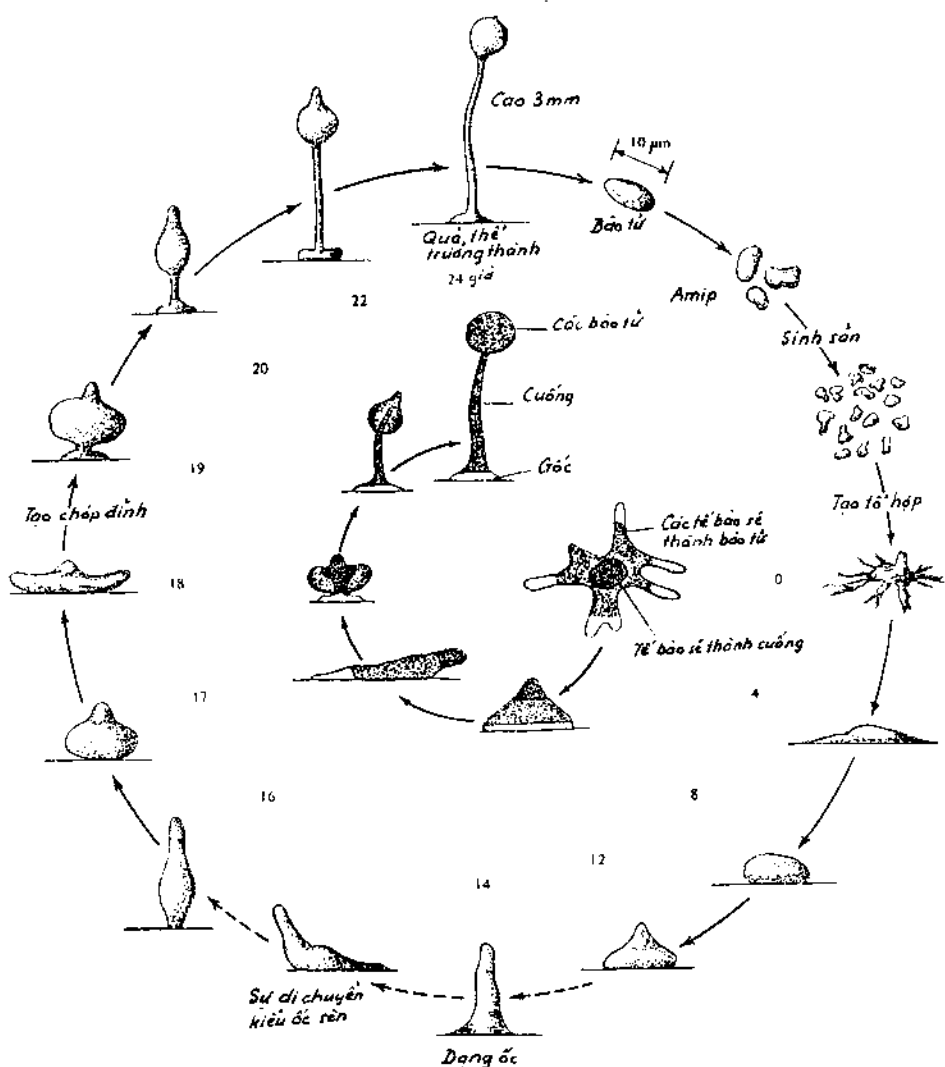


Hình 16.2. Trình tự hoạt động của phage theo thời gian

2. Các đối tượng mô hình ở nấm

Nấm men *Saccharomyces* là mô hình nghiên cứu của *Eukaryotae* nói chung. Các đột biến ở nấm men góp phần đáng kể vào sự hiểu biết các cơ chế của chu trình tế bào.

Nhiều nghiên cứu về sự điều hòa hoạt động gen được thực hiện ở **nấm nhầy dạng tế bào** (cellular slime mold) *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotae* đơn bội này có 3 kiểu tế bào: dạng amip di chuyển, dạng bào tử và tế bào uống (hình 16.3). Khi nguồn dinh dưỡng là các vi khuẩn cận, các tế bào



Hình 16.3. Chu trình sống của nấm *Dictyostelium discoideum*.

Trong pha nhiều tế bào, sự chuyển đổi từ dạng tổ hợp (aggregate) sang quá thể thường thành thường chiếm khoảng 24 giờ (các số trên hình). Ở một phần của chu trình sống, phụ thuộc vào môi trường, nấm có dạng di chuyển có thể kéo dài vài giờ đến vài ngày. Vòng trong: Vai trò của các tế bào chiếm những vị trí khác nhau trong tổ hợp (aggregate) và dạng ốc sên trong quá trình hình thành bào tử, cuống và gốc của nấm nhảy (theo Stricberger).

dạng amip kết với nhau thành tổ hợp (aggregate) có trật tự. Phụ thuộc vào điều kiện môi trường mà tổ hợp có thể di chuyển hay thành cụm. Chúng có thể hình thành cuống hay quả thể và phóng thích hàng ngàn bào tử. Bào tử nảy mầm tạo tế bào dạng amip. Hai trạng thái khác nhau được quan tâm nghiên cứu là tế bào cuống và bào tử.

Nhiều nghiên cứu cho thấy sự hình thành dạng tổ hợp được khởi sự khi hiện diện *c-AMP* (AMP vòng - cyclic AMP) với nồng độ cao nhất ở các tế bào trung tâm tổ hợp. Sự khuếch tán của chất này thu hút các tế bào dạng amip khác tập trung lại vùng đó với số lượng lớn.

Khi sự di chuyển kiểu ốc sên của dạng tổ hợp dừng, số phận của hai loại tế bào được xác định. Các tế bào ở đỉnh di chuyển xuống gốc và tạo thành các *tế bào cuống* giàu cellulose. Trong khi đó, các tế bào ở gốc di chuyển lên phía trên tạo *bào tử*. Số lượng tế bào nhiều ít không ảnh hưởng đến sự biệt hóa: tổ hợp lớn hình thành quả thể lớn, tổ hợp nhỏ hình thành quả thể nhỏ. Như vậy, các tế bào cảm nhận vị trí tương đối giữa chúng với nhau và phát triển theo chương trình di truyền cấu tạo chung của cơ thể - quả thể.

Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy sự phân hóa tế bào cuống gắn với chất được tiết ra gọi là DIF (differentiation inducing factor - nhân tố cảm ứng biệt hóa). Nhân tố DIF được coi là *morphogen* (nhân tố hình thái). Mặt khác, sự hình thành bào tử phụ thuộc vào sự hiện diện của NH_4 . Một số morphogen khác đã được phát hiện ở loài nấm này.

3. Éch *Xenopus laevis*

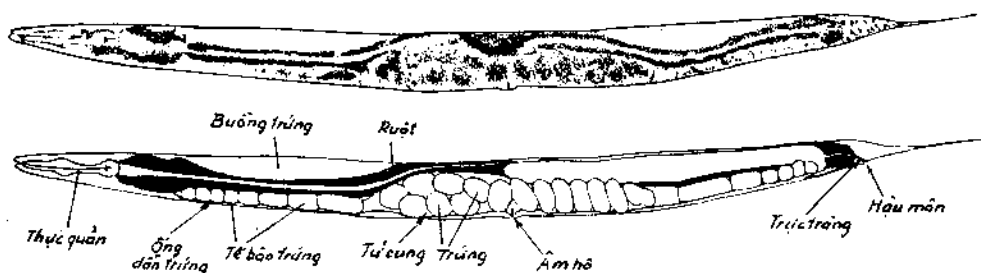
Loài ếch ở Châu Phi này có tế bào trứng to nên dễ thực hiện nhiều thao tác như vi tiêm. Éch này có ưu thế là màng tế bào trứng trong suốt nên dễ nhìn thấy các giai đoạn phát triển ở dạng ấu trùng sống trong môi trường nước.

4. Ruồi giấm *Drosophila melanogaster*

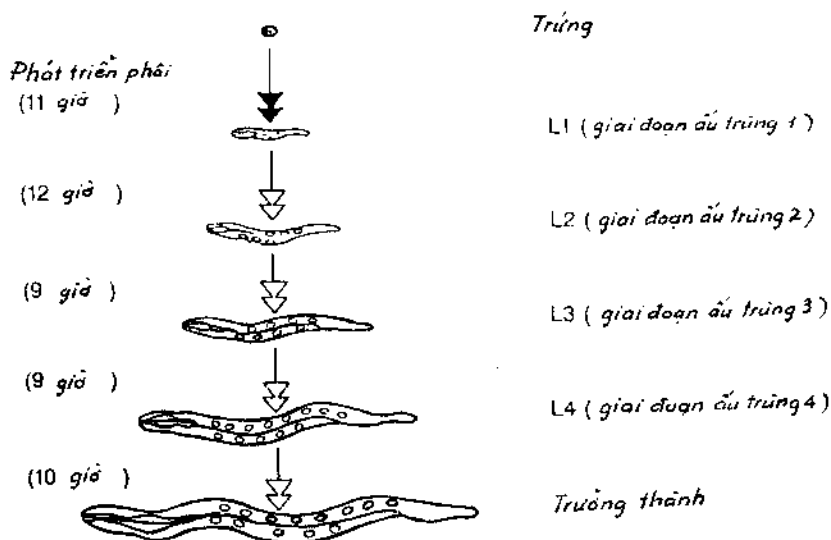
Ruồi này là đối tượng kinh điển của di truyền học, lại cũng có nhiều ưu thế trong nghiên cứu di truyền học phát triển. Chúng có số lượng lớn đột biến, đặc biệt có nhiều đột biến liên quan đến sự phát triển cá thể đã được nghiên cứu chi tiết về phương diện di truyền học và sinh hóa. Ruồi giấm là một sinh vật có cấu tạo tương đối đơn giản và nhiều *biến dị rất lạ lùng* của chúng vẫn có biểu hiện ở ruồi sống. Trong khi đó, nhiều đột biến kiểu như vậy ở các động vật khác thường gây chết. Nhờ vậy, ruồi trưởng thành hay các phôi có dị tật lớn trong sự phát triển có thể theo dõi được.

5. Tuyến trùng *Caenorhabditis elegans*

Đây là loài tuyến trùng nhỏ, dài 1 mm, cơ thể trong suốt có chu trình sống ngắn (hình 16.5), nhưng thể hiện nhiều đặc tính phát triển cá thể của các loài phức tạp hơn nhiều.



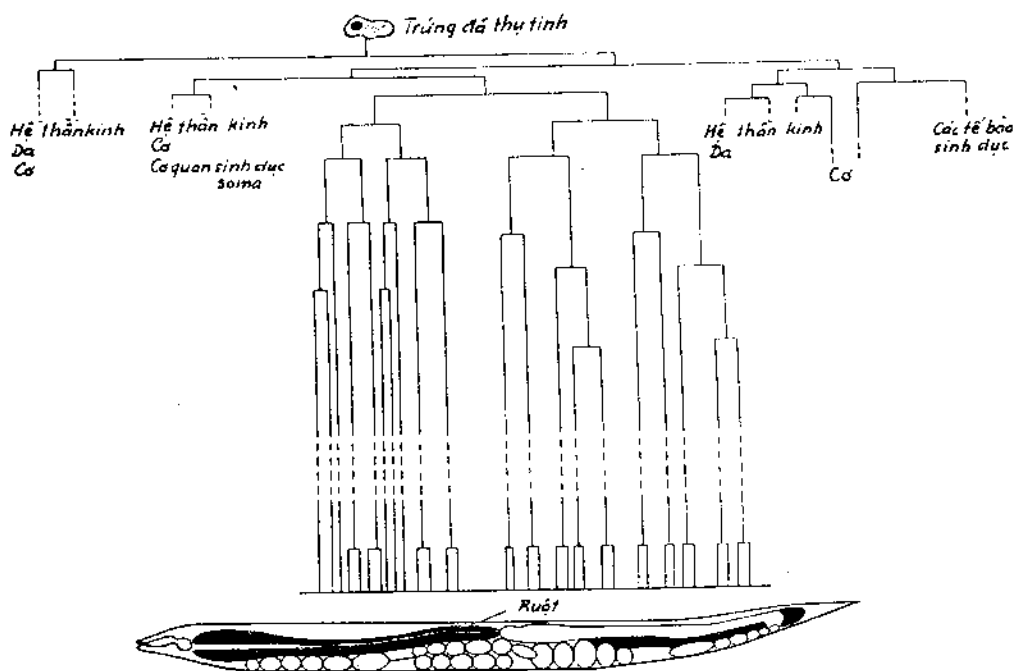
Hình 16.4. *Caenorhabditis elegans*



Hình 16.5. Chu trình sống của *Caenorhabditis elegans*.

Sự phát triển phôi ở 25°C được tính bằng giờ.

C. elegans dài khoảng 1 mm, gồm khoảng 1000 tế bào soma và 1000 – 2000 tế bào sinh dục. Con số chính xác là 959 tế bào soma cộng với khoảng 2000 tế bào sinh dục ở một giới tính và 1031 tế bào soma cộng với khoảng 1000 tế bào sinh dục ở giới tính khác. **Số lượng tế bào cố định** từ cá thể này sang cá thể khác và dòng tế bào có thể theo dõi chính xác từng cái (hình 16.6).



Hình 16.6. Tuyến trùng *Caenorhabditis elegans* và dòng tế bào tạo nên ruột của nó

Giải phẫu cơ thể cho thấy **mẫu cấu tạo cơ thể** (body plan) của tuyến trùng này về căn bản giống với các sinh vật bậc cao như đối xứng hai bên (bilateral), thân kéo dài có đầu và đuôi với hầu hết các mô căn bản (thần kinh, cơ, ruột, da) được tổ chức tương tự. Bao phía ngoài cơ thể gồm 2 lớp : **lớp hạ bì** (hypodermis) hay “da” và lớp cơ nằm phía dưới. Một ống do các tế bào **nội bì** (endodermal cells) hình thành nên ruột. Ống thứ hai là **ống sinh dục**, nằm giữa lớp bao ngoài và ruột, bên ngoài là tế bào soma, bên trong là các tế bào sinh dục.

C.elegans có 2 kiểu cá thể : lưỡng tính và đực. Cá thể lưỡng tính có thể xem là cá thể cái vì tạo tinh trùng với số lượng ít. Cá thể lưỡng tính có thể tự thụ tinh hay thụ tinh chéo khi giao hợp với con đực. Sự tự thụ tinh dẫn đến chỗ cha mẹ **dị hợp tử** tạo ra thế hệ con **đồng hợp tử**, đây là tính chất đặc hiệu làm cho *C.elegans* thành một đối tượng rất thuận tiện cho nghiên cứu di truyền học.

Thêm vào đó, bộ gen của *C.elegans* có cấu tạo đơn giản. Bộ gen gồm 6 **cặp nhiễm sắc thể** tương đồng với khoảng 3000 gen “**căn bản**” (những gen mà đột biến có thể gây chết hoặc có kiểu hình dễ quan sát) và bốn đến năm lần như vậy số gen khác. Bộ gen đơn bội gồm DNA với khoảng 10^8 bp, khoảng 20 lần nhiều hơn DNA của *E.coli*, gần bằng DNA của *Drosophila* và

ít hơn DNA của người 30 lần. Đến nay, hơn 900 gen căn bản đã được xác định nhờ đột biến.

C.elegans là đối tượng rất hấp dẫn cho nghiên cứu di truyền học phát triển cá thể vì:

- Thứ nhất, phân tích di truyền được thực hiện dễ dàng nhờ chu trình sống ngắn và bộ gen đơn giản cả về số lượng nhiễm sắc thể và số nucleotide của DNA.

- Thứ hai, tiến trình bình thường của sự phát triển thực hiện rất có hiệu quả và được theo dõi chi tiết đến từng vị trí của tế bào và mối liên hệ theo dòng của *từng tế bào*.

Tương tự ở các sinh vật khác, sự phát triển phụ thuộc vào tác động tương hỗ giữa các tế bào và các quá trình tự động của tế bào. Các thí nghiệm *chủ động phá hủy tế bào* cho thấy sự phát triển của *âm hộ* (vulva) phụ thuộc *tín hiệu cảm ứng* và các gen tham gia vào sự cảm ứng này có thể xác định được bởi các đột biến làm dừng sự phát triển âm hộ. Sự phân tích bằng di truyền học phân tử đã tìm ra các chức năng riêng lẻ của các gen này và cho thấy một số gen có tác động giống với các gen ở động vật có xương sống.

Sự phân tích trực tiếp theo dòng tế bào của các đột biến dẫn đến sự phát hiện nhiều nhóm gen quan trọng khác như :

- Các gen mà sản phẩm của chúng gây các biến đổi đặc hiệu ở tập tính theo thời gian trong quá trình phát triển cá thể.

- Các gen liên quan đến sự chết theo chương trình của tế bào.

C.elegans là đối tượng đầy triển vọng nên việc xác định trình tự nucleotide của bộ gen của nó đang tiến triển mạnh.

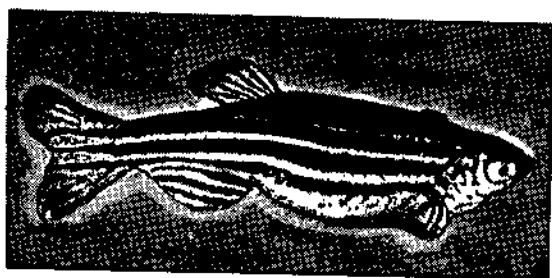
Nhiều thành tựu mới quan trọng đạt được trên các đối tượng động vật như tuyến trùng *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* và chuột.

6. Chuột bạch (*Mus musculus*)

Chuột bạch là động vật có vú được sử dụng trong phần lớn các thí nghiệm về sự phát triển cá thể. Chuột có thời gian mang thai ngắn nên thuận tiện cho nghiên cứu di truyền. Nhiều kỹ thuật sử dụng ở chuột như thụ tinh *in vitro* (*in vitro fertilisation*) hiện được sử dụng đối với thụ tinh *in vitro* tạo phôi người hoặc các động vật nuôi.

7. Cá sọc vằn Zebrafish (*Danio rerio*)

Cá này được sử dụng rộng rãi trong các thí nghiệm di truyền với quy mô lớn (hình 16.7). So với các động vật có xương sống khác, nó có nhiều ưu thế :



Hình 16.7. Cá *Danio rerio*

– Giao phối tạo ra hàng trăm phôi có sự **phát triển đồng thời** (synchronous).

– **Phôi trong suốt**, nên các đột biến tạo ra hay thí nghiệm chuyển ghép mô (transplantation) có thể theo dõi được sự phát triển thuận tiện hơn.

– Gần đây, có phương pháp giữ giống rẽ tiền và đơn giản nên tạo thuận tiện hơn cho thí nghiệm với quy mô lớn.

8. Thực vật

Arabidopsis thaliana là thực vật được sử dụng làm mô hình nghiên cứu về di truyền học phát triển cá thể.

Điểm qua các đối tượng, chúng ta thấy rõ sự phát triển cá thể rất phức tạp nên nhiều đối tượng mô hình khác nhau đã được lựa chọn sử dụng. Mỗi đối tượng cung cấp các chi tiết khác nhau góp phần vào bức tranh chung của di truyền học phát triển cá thể.

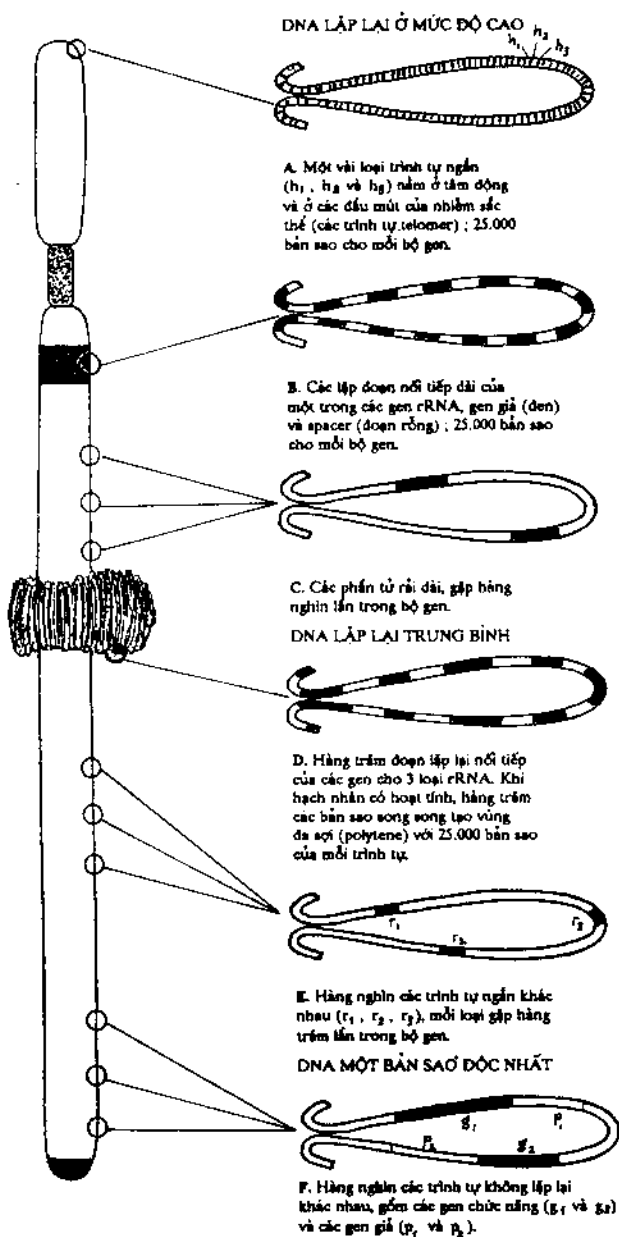
II. TỔ CHỨC BỘ GEN Ở EUKARYOTAE

Các bộ gen của sinh vật *Eukaryotae* lớn hơn rất nhiều so với của vi khuẩn (chương V). Thậm chí sự mã hóa cho protein nhiều hơn gấp trăm lần. Sự **đư thừa DNA** được thể hiện ở nhiều loại trình tự khác nhau. Phần lớn trong số chúng là các trình tự độc nhất có vai trò không thay thế được trong bộ gen của *Eukaryotae*.

Các tiến bộ kĩ thuật, nhất là kĩ thuật tạo dòng đã cho phép hiểu chi tiết về các loại trình tự khác nhau của bộ gen gắn liền với hoạt động chức năng của tế bào.

1. Sơ đồ khái quát về các loại trình tự DNA

Ở chương V, chúng ta đã biết, khi thực hiện phản ứng hồi tính có thể phân ra 3 loại trình tự DNA của *Eukaryotae*. Ở đây, mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng của chúng được tìm hiểu sâu hơn (hình 16.8).



Hình 16.8. Tổ chức DNA bộ gen của *Eukaryotae*.

- Trình tự ngắn lặp lại ở mức độ cao.
- Trình tự dài lặp đoạn (tandem repeat).
- Trình tự rải rác (Interspersed).
- Trình tự lặp lại nhiều bản sao (polytene).
- Lặp lại ở mức độ trung bình.
- Trình tự độc nhất.

a) Các trình tự DNA lặp lại ở mức độ cao

Các trình tự này chiếm 10-15% bộ gen của động vật có vú và không mã hóa cho protein. Chúng liên quan đến các *chất dị nhiễm sắc cơ cấu* (constitutive heterochromatine). Sự phân tích trình tự nucleotide cho thấy chúng gồm có 3 loại :

- Loại đầu tiên, chiếm phần lớn là các *trình tự ngắn* (5-10 bp) xếp lặp lại nối tiếp (tandem). Các trình tự này lặp lại rất nhiều lần. Ở nhiễm sắc thể Y, các trình tự lặp lại này được *siêu methyl hóa* (hypermethylation) ở tế bào soma và *thiếu methyl hóa* (hypomethylation) ở tế bào sinh dục.

- Loại thứ hai tương ứng với các *trình tự lặp lại tandem* nhưng với các *đoạn dài hơn* (100-200bp).

Có nhiều trình tự *lặp lại mức độ cao* phân tán phía ngoài chất dị nhiễm sắc.

- Các trình tự CEN và TEL đã được nêu ở chương V. Đáng lưu ý là một nhóm trình tự lặp lại mức độ cao nằm gần tâm động có vai trò quan trọng trong phân bào. Nhóm có trình tự lặp lại mức độ cao khác mã hóa cho *một loại rRNA* của ribosome.

b) Các trình tự lặp lại mức độ trung bình

Loại trình tự này chiếm 25-40% bộ gen người. Chúng cũng gồm các trình tự lặp lại nhưng dài hơn (100 - 1000 bp) và đa dạng hơn nhiều so với loại lặp lại cao. Nhiều số liệu cho thấy chúng có liên quan đến các *phần tử di động* gọi là *retroposon* (ch.XVII). Các trình tự này phân tán trong bộ gen và nếu cắt bộ gen thành đoạn 20-40kb thì có 90 đến 100% số đoạn có trình tự lặp lại trung bình. Trong số các trình tự lặp lại trung bình, có các họ trình tự đặc hiệu là *SINE* (Short interspersed repetitive element) và trình tự *LINE* (long interspersed repetitive element). Ngoài ra, trong số này cần kể đến các trình tự mã hóa cho nhiều loại RNA như : *rRNA*, *RNA 5S* và *RNA 7S*.

c) Các trình tự độc nhất

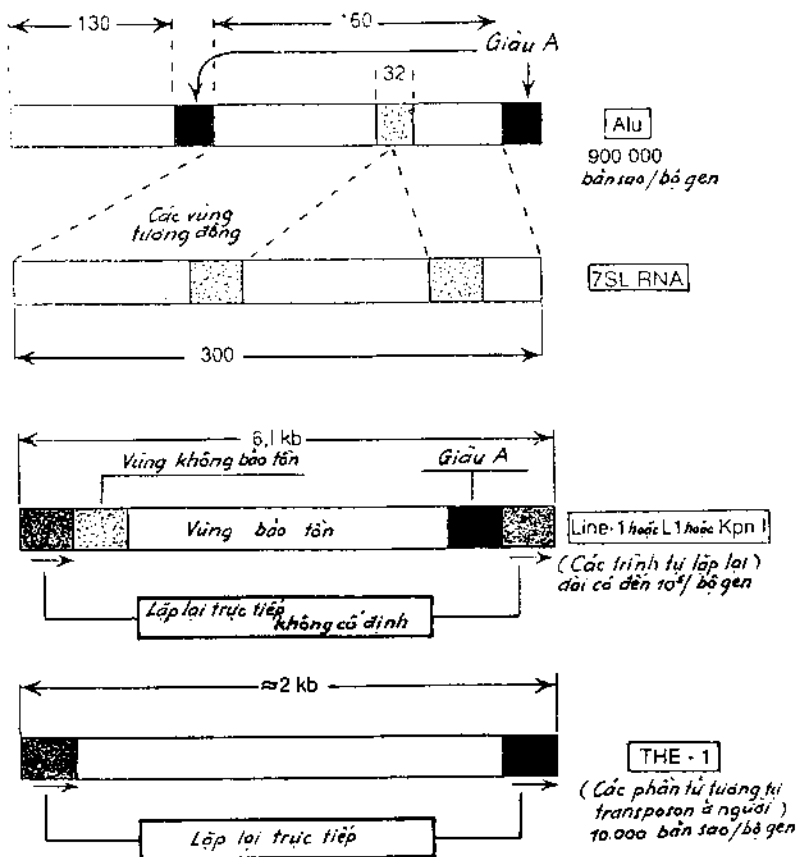
Các trình tự độc nhất chiếm phần lớn bộ gen, gồm 2 loại :

- Các *gen mã hóa cho protein*.
- Các *gen giả* (pseudogene).

2. Các họ trình tự đặc hiệu

a) Các trình tự SINE (còn gọi là Alu ở người)

Các trình tự này nhận được khi cắt bộ gen người với restriction endonuclease *Alu I*, trong số các đoạn có một dãy tạo nên họ *Alu*. Chiều dài các trình tự này khoảng 300 bp với khoảng 900.000 bản sao / bộ gen người. Các trình tự *Alu* dường như có được do kết quả retrotransposition (sự chuyển vị trí đoạn gen của retrovirus trên nhiễm sắc thể-xem chương XVII tiếp theo). Chúng có cấu trúc đối xứng (hình 16.9).



Hình 16.9. Trình tự SINE và LINE

Vai trò của các trình tự *Alu* đến nay chưa rõ. Một điều đáng kinh ngạc là có sự tương đồng (homologous) từ 80 đến 100% giữa phần 3' của *Alu* với đầu mút 5' và 3' của RNA 7SL, là phần tương tác với các tín hiệu peptide trước khi vận chuyển ra tế bào chất. Việc xác định trình tự nucleotide của *Alu* cho thấy có ít nhất 6 nhóm phụ và tất cả đều bắt nguồn từ DNA mã hóa cho RNA 7SL.

Các trình tự SINE là công cụ quý giá để nghiên cứu đặc điểm tiến hóa. Khi so sánh giữa người và vượn người đã phát hiện một số trình tự xuất hiện cách nay không lâu.

b) Các trình tự LINE

Chúng gồm các họ Line 1 hay *Kpn 1* và THE 1. Các trình tự Line được tạo ra do cắt bộ gen với restriction endonuclease *Kpn1*. Chúng có chiều dài khoảng 6 và 7 kb với gần 5000 bản sao nguyên vẹn và 100.000 bản sao từng phần rải khắp bộ gen người. Chúng là những trình tự lặp lại không mã hóa dài nhất và thường ở **vùng giàu AT**, giống như các trình tự *Alu*. Các bản phiên mã trình tự LINE gắn với protein tạo thành phức hợp **ribonucleoprotein**. Ở một dòng tế bào người bị ung thư (teratocarcinome), người ta quan sát thấy có các ribonucleoprotein này. Sự **xen đoạn** LINE vào các vị trí khác nhau có thể gây hậu quả nhất định, như trong một trường hợp bệnh máu không đông A (hemophilia A).

3. Các gen của rRNA, tRNA, RNA5S và RNA 7SL

Một loạt các gen giữ vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp protein như các gen của ribosome, tRNA, RNA 5S và RNA 7SL có sự lặp lại hàng nghìn lần.

a) Gen nhóm I: Các gen của ribosome

Các gen rRNA của người có cấu trúc như mô tả trên hình 16.8. Chúng được phiên mã bởi **RNA polymerase I**. Bản phiên mã đầu tiên là tiền rRNA 45S, (pre-rRNA), sau chế biến 3 loại rRNA 28S, 18S và 5,8S được tạo ra. Các gen này không phân tán mà **xếp thành cụm** (cluster), mà mỗi cụm có thể hơn 200 bản sao. Ở người, các cụm đó được tìm thấy trên **vai ngắn** của các **nhuộm sắc thể tâm đầu** (acrocentric) 13, 14, 15, 21 và 22. Các nhóm này xếp quanh nhân tổ **chức hạch nhân** (nucleolus organizer) hình thành kiểu cấu trúc đặc biệt trên nhiễm sắc thể và ở gian kì tạo nên các hạch nhân (nucleolus).

b) Gen nhóm III: Các tRNA, RNA 5S và RNA 7SL

Các gen này được phiên mã bởi **RNA polymerase III** nên gọi là nhóm III. Nhóm này gồm cả các gen mã hóa cho một số **RNA nhỏ** tìm thấy trong nhân và tế bào chất.

Người có hơn 200 gen mã hóa cho rRNA 5S. Các gen này tập trung thành cụm ở một số điểm nhất định của chất nhuộm sắc. Ở một số loài như *Xenopus* số bản sao của RNA 5S có thể hơn 20.000.

4. Các gen mã hóa cho protein

Đây là các gen thuộc **nhóm II** vì nó được phiên mã do **RNA polymerase II**. Trừ các gen mã hóa cho protein histone, các gen nhóm II có trình tự độc nhất hoặc với số ít bản sao. Các gen nhóm II này hầu như chỉ **mã hóa cho một loại protein**.

Đa số chúng có trình tự độc nhất hay gần như độc nhất. Một số gen có bản sao thứ hai trong quá trình tiến hóa. Cả hai bản sao có thể chuyển đổi bổ trợ nhau, như trường hợp các gen α của globine. Trong trường hợp khác, hai bản sao có sự phân hóa nhỏ trong tiến hóa tạo ra hai protein nhưng ít khác nhau. Sự biểu hiện của các gen có thể liên quan đến các chức năng trong quá trình phát triển của cơ quan hay cá thể.

a) Các họ của gen mã hóa cho protein

Một gen có thể tạo được nhiều bản sao rất sớm trong quá trình tiến hóa. Mỗi bản sao có sự phân hóa độc lập nhau do hiện tượng **nhân đôi** (duplication). Sự phân hóa (divergence) này dẫn đến hàng loạt gen mã hóa cho các protein tương đồng. Sự biểu hiện của các gen này phụ thuộc vào kiểu hay trạng thái của tế bào. Ví dụ, nhiều họ gen đã được biết rõ như:

- Họ các **gen globine**.
- Họ các **gen actine**.
- Họ các **gen myosine**.

Các gen globine tập hợp thành cụm: phức hợp của họ α globine nằm trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 16 và phức hợp β nằm trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 11. Trình tự sắp xếp của gen tương ứng với trình tự biểu hiện trong quá trình phát triển cá thể.

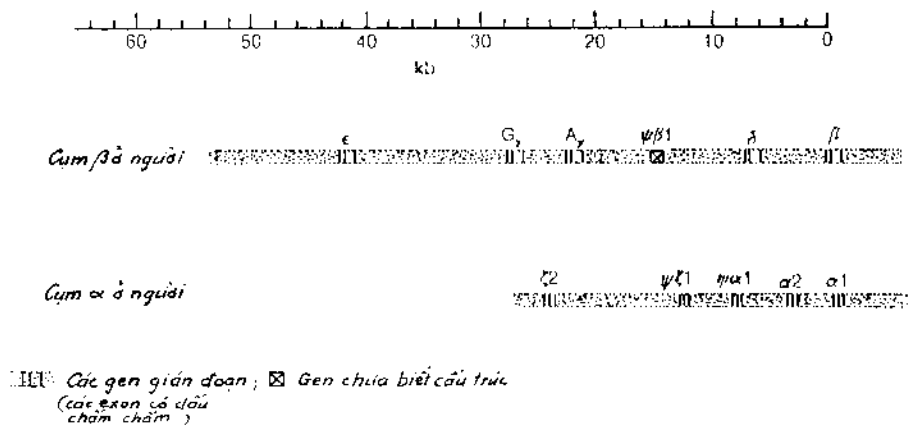
Hemoglobine là protein có cấu trúc tứ phân (tetramer). Ở động vật có vú trưởng thành, cấu trúc tứ phân gồm hai mạch polypeptide α và 2 mạch β .

Trong quá trình phát triển cá thể có sự thay đổi các dạng cấu phần như sau:

BẢNG 16.1. Mạch globine ở người trong quá trình phát triển cá thể

Polypeptide globine	Phôi	Thai	Người lớn
α - tương tự	ζ (Zeta)	α	α
β - tương tự	ϵ (epsilon)	G_γ, A_γ	δ, β

Có sự thay thế mạch β ở người lớn và một phần nhỏ mạch tương tự β gọi là δ (delta) . Hình 16.10 cho thấy các cụm gen globine trên nhiễm sắc thể. Ở đây có thể hiện rõ sự tổ chức di truyền của đoạn nhiễm sắc thể 50 kb trong trường hợp cụm β . Cần lưu ý là các exon chỉ chiếm một phần của đoạn trên . Trong các đoạn này có một số **gen giả** (pseudogene).



Hình 16.10. Họ các gen α và β globine

b) Các siêu họ (superfamily) của gen mã hóa protein

Sự xuất hiện một số **siêu họ gen** có lẽ rất sớm trong quá trình tiến hóa. Ví dụ, các **gen của immunoglobine** của thụ thể T, của sự **không dung hợp mô** (histocompatibility), ... Chúng bắt nguồn từ **gen chung tổ tiên** qua sự **tăng đôi đoạn** (duplication) với số lượng dao động khác nhau .

Ngay trong tổ chức của bộ gen đã thể hiện **sự hợp lý** cho biểu hiện gen trong quá trình phát triển cá thể. Các rRNA được **cùng phiên mã** đảm bảo có số lượng như nhau để tham gia vào sinh tổng hợp protein. Một số protein có nhiều trong cơ thể được xếp thành các họ và thành cụm theo tiến trình biểu hiện. Sự **khuếch đại** số lượng bản sao của gen cũng đáp ứng cho nhu cầu cơ thể phản ứng lại với môi trường ngoài.

5. Hoạt tính gen ở các phần khác nhau của nhiễm sắc thể

Ở các nhiễm sắc thể *Eukaryotae*, sự khác nhau trong hoạt tính của gen có thể nhận biết theo mức độ xoắn chặt thể hiện ở mức độ nhuộm màu. **Chất dị nhiễm sắc** nhuộm màu đậm biểu hiện vật chất di truyền bất hoạt. Các vùng dị nhiễm sắc nằm ở đỉnh của nhiễm sắc thể, xung quanh tâm động và tổ chức hạch nhân. Cơ cấu chất dị nhiễm sắc nói chung có sự dư thừa lớn và chứa các trình tự **DNA vệ tinh** (satellite).

Trong một số trường hợp, nhiễm sắc thể có thể ở một trong hai trạng thái : hoạt động chức năng hay bất hoạt.

III. CÁC NHÂN TỐ TÁC ĐỘNG ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN

1. Sự tiền định của tế bào chất ở trứng

Các tế bào trứng của phần lớn động vật là những tế bào to chứa nhiều chất dinh dưỡng và những cấu phần khác được xác định đặc hiệu do bộ gen mẹ. Ở lưỡng cư sự biến đổi lớn đầu tiên sau thụ tinh là sự quay vỏ ngoài tương đối so với lõi. Sự mất đối xứng ban đầu trong phân bố các chất trước khi thụ tinh, xác định trục trước - sau (anterio - posterior axe) và trục lưng - bụng (dorsoventral axe) của cơ thể. Trong quá trình phân cắt tế bào tiếp theo, tế bào trứng phân chia tiếp thành nhiều tế bào con nhỏ, nhưng không tăng trưởng.

Các nghiên cứu cho thấy rằng không có mRNA mới xuất hiện ngay sau khi trứng được thụ tinh với khuôn mRNA từ hợp tử và nhân con tạo ra từ các phần cắt sớm. Dù cơ chế nào hoạt hóa mRNA có sẵn trong trứng, hoạt tính nguyên phân của nhân được *cảm ứng bởi thụ tinh* cũng được thực hiện nhờ sao chép DNA và tăng số nhân con (nuclei) nhưng không cần thiết kèm theo tạo ra mRNA của nhân tế bào.

Như vậy, sự biệt hóa trong giai đoạn đầu có lẽ được tạo nên do sự khác nhau ở tế bào chất của trứng và vỏ của nó.

2. Thế năng (Potency) của sự phát triển

Trứng thụ tinh, sau quá trình phân cắt (cleavage), phôi vị hóa (gastrulation) và hình thành cơ quan (organogenesis), tạo nên phôi (embryo) có phần lớn các mô và cấu trúc ở dạng mầm nhỏ so với cơ thể trưởng thành. Mặc dù *sự biệt hóa* (differentiation) và *sự phát triển hình thái* (morphogenesis) thực hiện liên tục qua các giai đoạn phát triển, nhưng sự tăng trưởng của phôi là dạng thu nhỏ của cơ thể trưởng thành giữ vai trò quan trọng hơn cả. Sự tăng trưởng được thực hiện bởi nhiều lần phân bào, nhưng sự phân bào ở các phần của phôi thực hiện với tốc độ khác nhau.

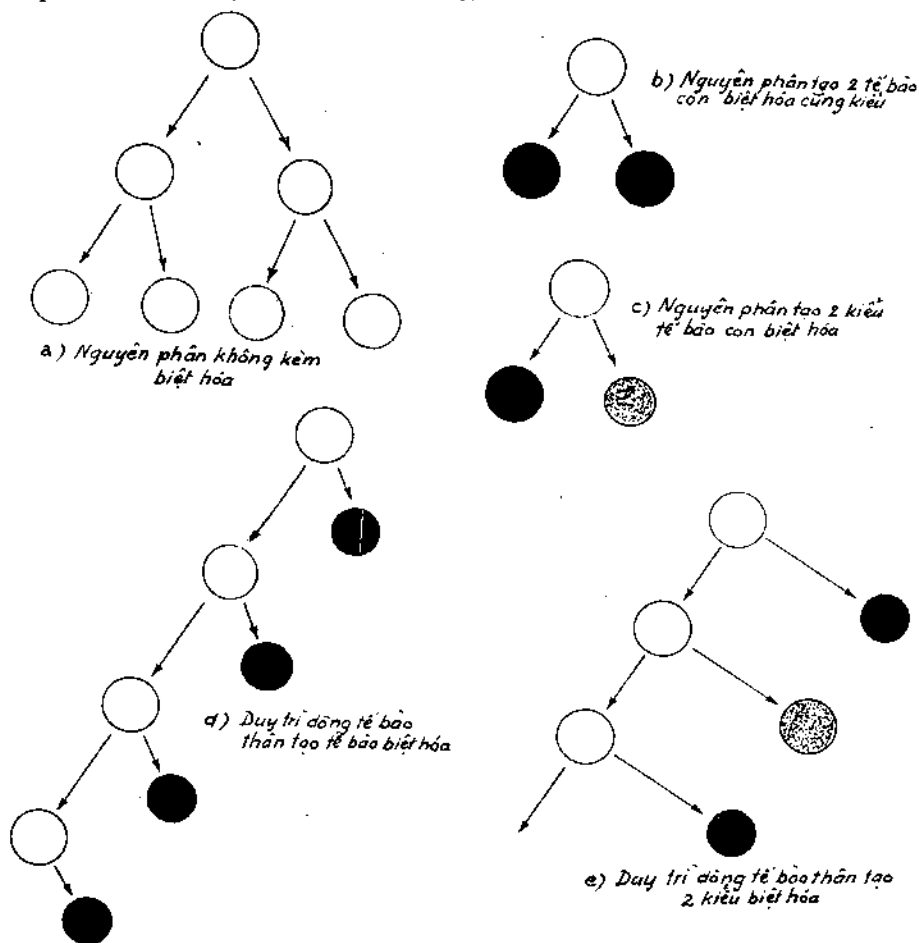
Các dòng tế bào của phôi chia nguyên phân theo nhiều hướng phát triển khác nhau (hình 16.11) :

- Các *tế bào thân* (Stem cells) phân chia tạo ra các tế bào con *không biệt hóa* (16.11a).

- Nguyên phân tạo ra 2 tế bào con *biệt hóa giống nhau* (16.11b).

- Tế bào qua nguyên phân tạo ra 2 tế bào **biệt hóa khác nhau** (16.11c).

Trường hợp dòng tế bào thân tạo ra chỉ một kiểu tế bào biệt hóa (16.11d) thì tế bào thân được gọi là **đơn thế** (unipotent), tức chỉ một thế năng phát triển. Ví dụ : một số tế bào phân chia tạo các tế bào thay thế mô biểu bì (epidermal tissue) của da là đơn thế.



Hình 16.11. Các dòng tế bào của phôi chia nguyên phân theo nhiều hướng phát triển khác nhau.

Khi tế bào thân tạo ra một số nhỏ tế bào khác nhau, nhưng gồm các kiểu tế bào gần nhau, được gọi là **đa thế** (pluripotent). Ví dụ : Các tế bào của tủy xương tạo tế bào máu là đa thế.

Sự toàn thế (Totipotency) có được khi tế bào có đủ khả năng phát triển thành cơ thể trưởng thành. Các tế bào thực vật phần lớn có tính toàn thế khi mô phân sinh đem nuôi có thể tạo ra cây có hoa và hạt. Tế bào hợp tử của động vật và các tế bào cuống phôi có tính toàn thế.

3. Kiểm soát hoạt tính của gen

Sự biệt hóa tế bào (xem chương VII) liên quan đến sự biểu hiện của gen, được kiểm soát ở nhiều mức độ khác nhau.

Mỗi loại tế bào đều có một số lượng lớn của một số ít loại protein đặc hiệu cho kiểu tế bào đó, được gọi là **protein xa xỉ** (luxury protein) do các **gen xa xỉ** xác định. Các protein xa xỉ này cũng có ở các tế bào khác, nhưng thường số lượng nhỏ. Trong khi đó, tất cả các tế bào đều có các protein giống nhau, được gọi là **protein nội trợ** (house keeping protein) do các **gen nội trợ** (house keeping gene) xác định. Các protein này giữ vai trò cốt lõi trong hoạt động sống của tế bào như : các enzymes của chu trình trao đổi chất. Số lượng các protein nội trợ dao động giữa các tế bào khác nhau, nhưng sự dao động ít hơn nhiều so với protein xa xỉ.

Hoạt tính khác nhau của các gen được minh họa rõ khi nghiên cứu các quần thể mRNA ở ống dẫn trứng (oviduct) và gan gà (bảng 16.2).

BẢNG 16.2. Quần thể mRNA ở ống dẫn trứng và gan gà. mRNA chia thành 3 nhóm : I - dư thừa. II - trung bình. III - hiếm

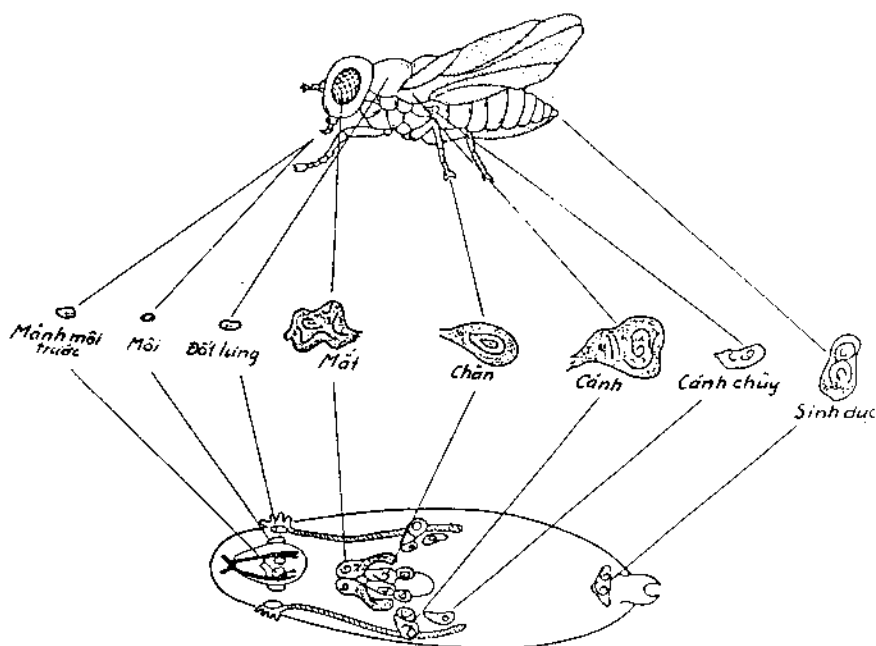
	Số lượng mRNA khác nhau	Số bản sao/tế bào	% so với tổng mRNA.
Tế bào trứng	1	100.000	50
	8	3.750	15
	14.000	5	35
Gan gà	1	32.800	16
	106	750	40
	11.600	7	44

4. Sự xác định (Determination) và sự biệt hóa (differentiation)

Nếu một nhóm tế bào được cấy sang chỗ mới trên phôi và sự phát triển tiếp theo của nó như lúc ở vị trí ban đầu thì được gọi là **xác định**. Nếu sự phát triển ở vị trí mới theo kiểu mới thì gọi là **không xác định** và có thể khác với biệt hóa khi tế bào đã chịu những biến đổi nhất định.

Các nghiên cứu ở *Drosophila* cho thấy rõ về sự xác định. Sự phát triển của ruồi giấm bắt đầu từ trứng qua dòi, kén và cuối cùng là ruồi trưởng thành. Dạng dòi hoàn toàn khác về cấu trúc so với dạng trưởng thành, thể hiện ở chỗ các tế bào của dòi, sẽ phát triển thành cấu trúc ở ruồi trưởng thành, chưa biệt hóa. Thay vào đó chúng xếp thành 19 nhóm riêng lẻ, gọi là

đĩa thành trùng (imaginal disc), mà mỗi một trong số chúng sẽ phát triển thành cấu trúc nhất định (hình 16.12).



Hình 16.12. Đĩa thành trùng ở *Drosophila*

Trạng thái xác định của nhóm tế bào có thể nghiên cứu bằng chuyển ghép (transplantation) các đĩa vào các thời điểm khác nhau. Thông thường, các tế bào biệt hóa thành cấu trúc dự kiến, nhưng trong vài trường hợp, các tế bào **xác định chuyển đổi** (transdetermination) hình thành cấu trúc điển hình của đĩa nơi tế bào được chuyển đến. Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy sự xác định chuyển đổi có thể do đột biến ở **gen kiểm soát**.

IV. SỰ PHÁT TRIỂN THEO KHÔNG GIAN : CÁC GEN TÁC ĐỘNG ĐẾN HÌNH MẪU THIẾT KẾ CƠ THỂ

Vấn đề quan trọng trong phát triển là sự biệt hóa tế bào đã được đề cập ở chương VII. Trong phần này, vấn đề quan trọng khác là sự phát triển hình thành các cấu trúc trong không gian theo **hình mẫu thiết kế của cơ thể** (body plan pattern). Trong những năm gần đây, nhờ sự can thiệp của kỹ thuật di truyền, lĩnh vực này có nhiều tiến bộ đáng kể.

1. Thông tin vị trí và sự hình thành mẫu thiết kế

Trong quá trình phát triển các nhóm tế bào tự tổ chức theo **mẫu thiết kế đặc hiệu** (particular pattern), mà mẫu này có thể biến đổi hay chỉnh lí khi sự phát triển được tiến hành. Một nhóm tế bào cục bộ giống nhau phát triển thành các mẫu thiết kế khác nhau, được gọi là **trường của phôi** (embryonic field). Để đi đến sự hình thành mẫu thiết kế thì các tế bào trong một nhóm của phôi phải liên lạc với nhau.

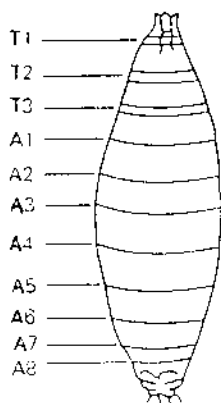
Một trong những phương thức tham gia vào **sự liên lạc** giữa các tế bào là thay đổi các tín hiệu hóa học từ điểm này sang điểm khác. Ví dụ, tạo thang nồng độ morphogen (nhân tố hình thái) được gọi là kiểu **chuyên biệt hóa học** định sự phát triển chuyên biệt của tế bào trong phôi.

Quan điểm cốt lõi của thuyết morphogen là thông tin vị trí (positional information) cho phép tế bào "**cảm nhận**" vị trí tương đối của nó so với các tế bào khác trong phôi. Các tế bào được thu hút bởi hàng loạt các tác động môi trường như nồng độ morphogen đạt đến một ngưỡng nào đó thì tế bào được xác định và biệt hóa theo một hướng. Thực ra, vấn đề phức tạp hơn nhiều, các tế bào riêng lẻ nhận biết và phản ứng với tín hiệu ở các nồng độ khác nhau. Như vậy sự **lựa chọn con đường biệt hóa** sẽ là kết quả của sự cảm ứng phối hợp của các biến đổi trong không gian.

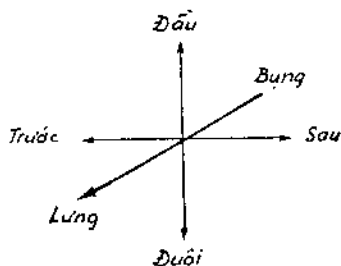
2. Các phức hợp gen homeobox ở *Drosophila*

Sự phát triển của phôi *Drosophila* được đặc trưng bởi 3 quá trình căn bản :

- Thiết lập **sự phân cực** (polarity) theo từng trục trong không gian 3 chiều.



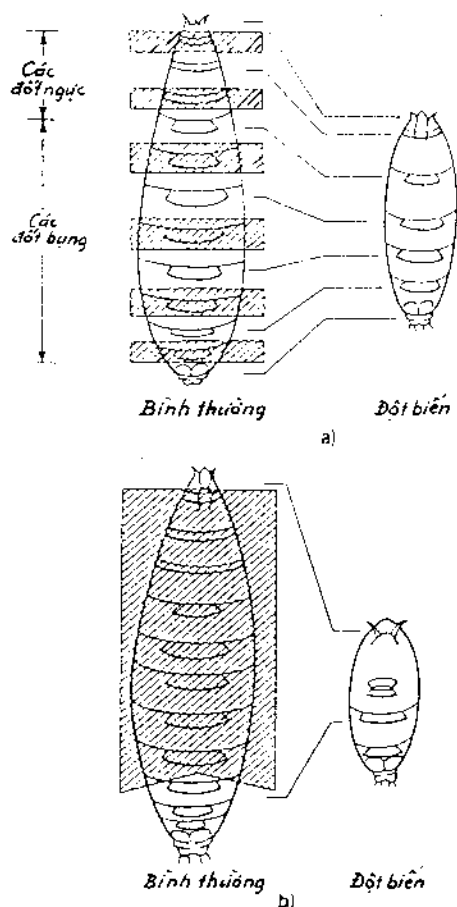
a)



b)

Hình 16.13. Sự phân đốt và sự phát triển phân cực ở phôi *Drosophila*

- a) Sự phân đốt ở *Drosophila* : T - đốt ngực (thoracic) và A - đốt thân (abdominal segments) ;
b) Sự định hướng của ba trục



Hình 16.14. Ví dụ về hai kiểu đột biến mất đốt ở ruồi.
a) Mất từng đoạn ; b) Mất nguyên cụm đốt.

đến sự thay đổi mẫu thiết kế cơ thể như mất một số đốt hay một nhóm các đốt kế cận (hình 16.14)

Vùng gạch chéo bị mất do đột biến. Một nhóm gen đặc biệt ảnh hưởng đến các phần của cơ thể trưởng thành được gọi là **gen homeotic**. Đột biến ở các gen *homeotic* tạo hiệu quả kiểu hình kì lạ. Có thể thay thế một phần phôi bằng cấu trúc điển hình của phần khác mà vẫn có biểu hiện. Ví dụ : đột biến gen *homeotic* của chân ở locus *antennapedia* thì chân homeotic mọc ở chỗ antenna (hình 16.15).

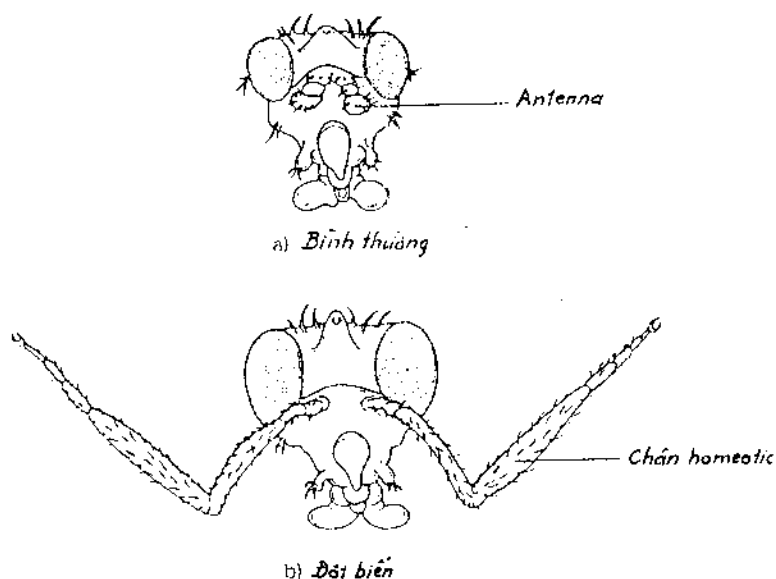
- Sự phân chia phôi thành các **đoạn** (segment) ở dòi.

- Sự **chuyên hóa** các phần ở ruồi trưởng thành.

Sự phân cực của phôi được xác lập rất sớm trong sự phát triển theo **ba trục không gian** vuông góc nhau (hình 16.13) : đầu - đuôi (proximal - distal) , lưng - bụng (dorso - ventral) và trước sau so ở hai bên (anterio - posterior from side to side).

Sự phân cực của phôi theo ba trục được kiểm soát bởi **ba nhóm gen** tương ứng. Ví dụ : *dorsal* (lưng) là một trong các gen kiểm soát sự phân cực theo trục lưng - bụng. Một số đột biến của gen này tạo các **đột biến "lưng"**, hoàn toàn mất các thành phần của bụng.

Các gen khác kiểm soát sự phân đốt được gọi là các (segmentation genes). Đột biến ở các gen này dẫn



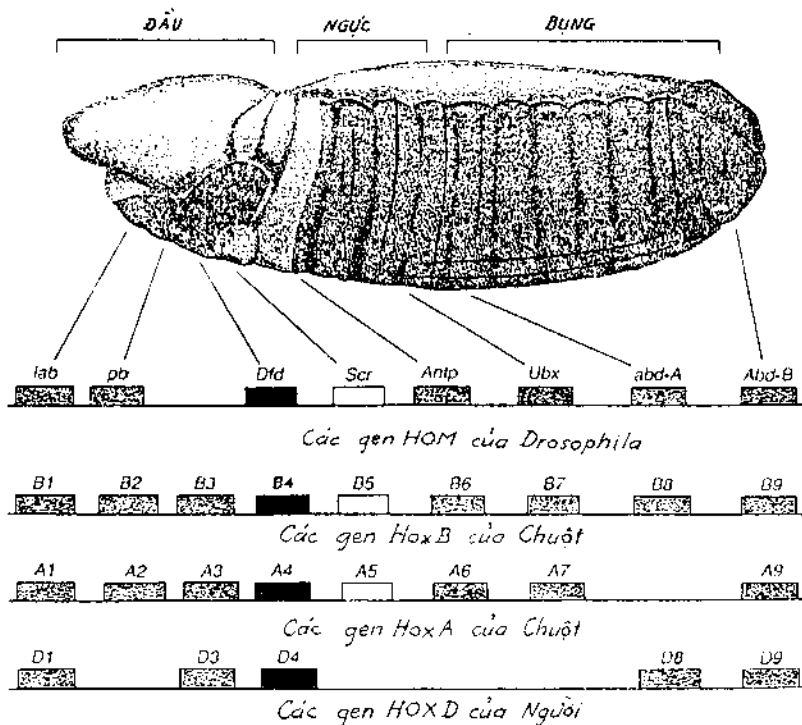
Hình 16.15. Hiệu quả của đột biến homeotic ở locus *antennapedia* của *Drosophila*
a) Dấu ruồi bình thường ; b) Dấu ruồi đột biến có chân homeotic

Nhiều gen homeotic và phân đốt đã được tạo dòng nhờ kĩ thuật di truyền. Các dòng này đã được so sánh và dùng làm mẫu để thử bộ gen của *Drosophila* đối với các trình tự có liên quan. Kết quả thử cho thấy, các gen phân đốt, homeotic và một số khác đều có chứa một đoạn DNA 180 bp được gọi là **homeobox**. Trình tự này có thể phiên mã tạo đoạn polypeptide với 60 gốc amino acid, được gọi là **vùng homeo** (homeo domain). Protein vùng này có tính bảo tồn (conserve) rất cao trong tiến hóa so với tất cả các trình tự DNA được nghiên cứu và chứa một tỉ lệ cao các gốc base. Các gen homeotic được gọi là **HOM** ở ruồi giấm. Các gen tương tự tìm thấy ở chuột và người gọi là **Hox**. Chúng là một phức hợp gồm nhiều gen nên gọi là các **phức hợp gen homeobox**. Các gen HOM của ruồi giấm chiếm các vị trí trên nhiễm sắc thể cùng trình tự đầu - đuôi (anterior - posterior) của các vùng cơ thể mà chúng kiểm soát sự phát triển (hình 16.16). Các gen Hox ở chuột và người cũng thử tự và biểu hiện tương tự.

Các nghiên cứu về hoạt động gen ở phôi cho thấy các phức hợp HOM xác định vị trí trên trục trong hình mẫu thiết kế cơ thể *Drosophila* như thế nào. Các gen HOM hiện diện trên DNA của tất cả các tế bào của ruồi, nhưng chỉ có hoạt tính trong một số tế bào. Khi được hoạt hóa, các phức hợp gen HOM phiên mã tạo mRNA để tổng hợp nên HOM protein. Trong các giai đoạn rất sớm của sự phát triển, trước khi các vùng của phôi có dấu hiệu về số phận tương lai, các phức hợp gen HOM khác nhau được hoạt hóa ở những vệt tế bào nối tiếp nhau dọc theo trục đầu - đuôi. Một số vệt đó có thể trùng

láp, nhưng mỗi phức hợp gen HOM có vùng ranh duy nhất phía đầu được hoạt hóa trong hình mẫu cơ thể (body plan).

PHÔI CỦA *DROSOPHILA*



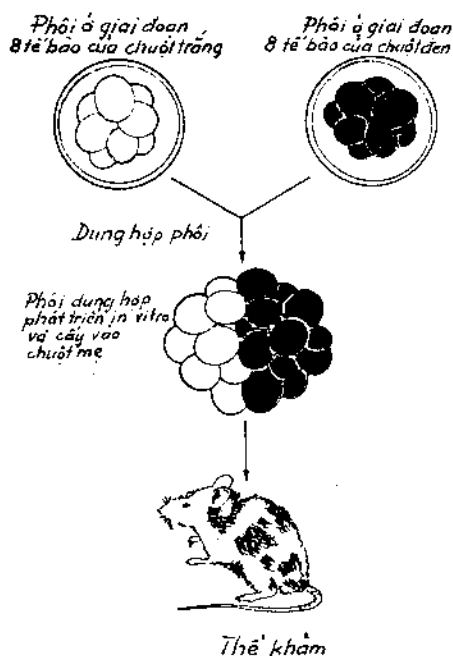
Hình 16.16. Các phức hợp gen HOMEODOMAIN ở *Drosophila*, chuột và người.

Sự sắp xếp các gen HOM tương ứng với không gian và chức năng của chúng.

Trong giai đoạn đầu của sự phát triển, các phôi của động vật có xương như cá, kì nhông, gà, thỏ và người có nhiều điểm giống nhau. *Drosophila* và các động vật không xương phát triển theo mẫu khác, nhưng ở những giai đoạn sớm nhất, chúng và các động vật có xương có chung các mẫu biểu hiện các gen homeotic giống nhau. Phát hiện này đặt ra vấn đề mới là mặc dù có sự khác nhau lớn trong sự biểu hiện cuối cùng ở các cấu trúc của động vật, chúng sử dụng các **gen có họ hàng gần** để xác định đặc hiệu các phần của cơ thể theo trục đầu - đuôi.

3. Các chuột khảm (*Chimeric mice*)

Thế khảm là phôi được phát triển từ **tổ hợp** (aggregate) của các nhóm tế bào khác nhau về mặt di truyền. Các tổ hợp khác nhau từ các tế bào, được tách ra từ nhiều phôi ở giai đoạn sớm của sự phát triển, có thể phát triển thành chuột khảm trưởng thành. Ví dụ, các tế bào từ chuột đen tổ hợp với



Hình 16.17. Quá trình tạo chuột khảm.

Chuột khảm có tế bào bắt nguồn từ bốn cha mẹ
(2 đen, 2 trắng)

các tế bào từ chuột trắng tạo ra chuột lang đen trắng (hình 16.17). Như vậy, các tế bào của phôi động vật có vú, ở giai đoạn rất sớm có **tính toàn thể** (totipotent). Các nghiên cứu ở chuột khảm chứng tỏ rằng **vị trí của tế bào trong phôi** sẽ xác định dòng tế bào nối tiếp, chứ không phải do các nhân tố di truyền.

Tóm lại, các nghiên cứu về sự phát triển cá thể trong không gian theo mẫu hình thiết kế của cơ thể động vật có những bước tiến đáng kể. Tuy nhiên, phía trước còn nhiều thách thức đối với sinh học như các cơ chế tác động nội và liên bào ảnh hưởng đến các **gen kiểm soát sự phát triển** như thế nào.

V. CHU TRÌNH PHÂN BÀO VÀ SỰ CHẾT CỦA TẾ BÀO

Sự tăng trưởng bình thường của cơ thể đa bào thường nhờ sự tăng số lượng các tế bào có cùng kích thước. Như vậy, sự tăng trưởng đòi hỏi sự phân bào. Các tế bào của sinh vật đa bào thường phân chia với tốc độ khác nhau.

BẢNG 16.3 : Các kiểu phân bào ở các động vật có xương sống

Phân bào thường xuyên (đổi mới liên tục)

- Tủy xương (tạo tế bào máu)
- Biểu bì (thay tế bào da)
- Một số tuyến (ví dụ, tuyến tiết chất nhờn)
- Tuyến sinh dục (tạo giao tử)

Phân bào tăng đột ngột

- Da (khi bị thương tổn)
- Gan (khi bị cắt mất một phần có thể mọc lại bằng khối lượng ban đầu)

Không bao giờ phân bào

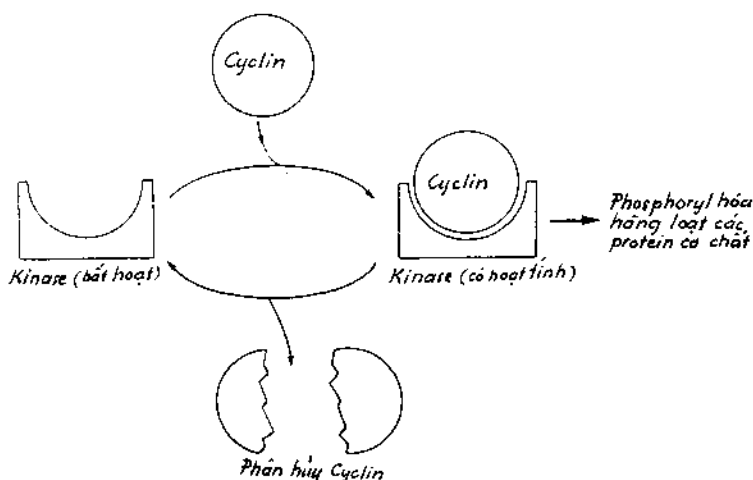
- Các tế bào não và dây thần kinh

Qua đó, ta thấy sự *điều hòa chu trình tế bào* có ý nghĩa rất quan trọng nên nó được quan tâm nghiên cứu. Trong vài năm gần đây, các cơ chế điều hòa chu trình tế bào (nguyên phân và gián kì) đạt được nhiều kết quả đáng kể.

1. Sự điều hòa chu trình tế bào

a) Các tổ hợp cyclin - kinase

Cơ chế kiểm soát nguyên phân được thực hiện do sự kết hợp của hai loại protein là *cyclin* và *kinase*, là protein chỉ có hoạt tính khi *gắn với cyclin*, gọi đúng là kinase phụ thuộc cyclin (cyclin-dependent-kinase). Cyclin là những protein được tích lũy và biến mất theo chu trình (cycle) tế bào (do đó đặt tên là cyclin). Sự kết hợp này tạo ra *nhân tố kích thích sự trưởng thành* M F (maturation promoting factor). Sự tăng một ít nồng độ cyclin làm hoạt tính M F tăng hơn gấp 10 lần. Sự phân bào được điều hòa bởi hai cơ chế liên hệ nghịch (feed - back). Đầu tiên, hoạt tính M F được *kích thích dương* bởi chính nó. Tiếp theo, M F *kích thích sự phân hủy cyclin* làm giảm nhanh hoạt tính của M F (liên hệ nghịch âm). Nhờ vậy hoạt tính cyclin và kinase có chu kì (hình 16.18).



Hình 16.18. Hoạt tính của kinase phụ thuộc cyclin

Khi kinase được hoạt hóa do gắn với cyclin, nó có khả năng phosphoryl hóa hàng loạt chất. Ngay sau đó, cyclin bị protease phân hủy và kinase lại mất hoạt tính.

b) Các cyclin - kinase ở tế bào nấm men và động vật có vú

Ở nấm men, nhiều cyclin khác nhau cùng tổ hợp với các sản phẩm của các gen của chu trình phân bào CDC2 hay CDC28 (CDC - cell division cycle) tác động ở các giai đoạn chuyển tiếp khác nhau từ pha S sang nguyên phân hay vào pha S. Các cyclin được phân hủy nhanh sau khi thực hiện xong chức năng. Năm loại cyclin ở người đã được phát hiện, kí hiệu A, B, C, D và E. Sự phân loại chúng căn cứ vào sự giống nhau của các trình tự amino acid.

Sự kiểm soát để tế bào bước vào nguyên phân là một quá trình phức tạp. Hoạt tính của tổ hợp cyclin - kinase được điều hòa bởi chính sự phosphoryl hóa và mất phosphoryl hóa (dephosphorylation) của chúng.

c) Các tác động của cyclin kinase và các nhân tố ức chế

Các cyclin kinase thực hiện các phản ứng chính trong chu trình tế bào như sau :

- *Làm tan màng nhân* là sự kiện cốt lõi của nguyên phân khi bước vào phân bào, gây nhiều biến đổi lớn như hình thành thoi vô sắc.

- *Cô đặc nhiễm sắc thể* có thể được thực hiện nhờ phosphoryl hóa histone H_1 .

- *Hoạt hóa sự phiên mã DNA* để tạo các protein quan trọng của chu trình tế bào.

Các nghiên cứu gần đây chứng minh rằng phần lớn kinase phụ thuộc cyclin gắn vào các *phần tử ức chế sự kiểm soát của chu trình tế bào* (inhibitory cell cycle control elements). Các *chất ức chế cyclin kinase* này (CKI - cyclin kinase inhibitors) là các protein có vai trò quan trọng trong điều hòa sự nối tiếp của đợt sóng dao động nồng độ của cyclin trong chu trình tế bào bình thường. Thường giữa cyclin kinase và inhibitor (chất ức chế) có sự cân bằng. Khi nồng độ cyclin kinase cao đến ngưỡng thì có sự chuyển giai đoạn trong chu trình tế bào.

2. Sự chết theo chương trình của tế bào - Apoptosis

Chu trình tế bào và nguyên phân đã được trình bày ở chương IV. Trong chu trình tế bào, sự tổng hợp DNA, sự phân li các nhiễm sắc thể và sự phân chia tế bào chất được thực hiện theo một *trình tự nghiêm ngặt* và được *kiểm soát chặt chẽ*. Sự kiểm soát được thực hiện ở sinh vật đơn bào lẫn đa bào.

a) Apoptosis

Nguyên phân làm tăng số lượng tế bào với bộ gen giống nhau. Song song với quá trình tăng số lượng tế bào đó, các sinh vật đa bào còn có những cơ chế phức tạp kiểm soát **sự chết của tế bào theo chu trình phát triển**. Nhờ cơ thể *Caenorhabditis elegans* **trong suốt** nên sự chết của tế bào theo chương trình định sẵn được phát hiện. Có thể phân loại sự chết của tế bào như sau :

– **Hoại tử** (necrosis) do bị thương tổn hay thiếu dinh dưỡng.

– **Chết theo chương trình : Apoptosis, sự teo và biệt hóa.**

Trong trường hợp **apoptosis**, các tế bào co lại, tách ra không tiếp xúc với tế bào kế cận và các gen **ced** (gen tự tử - suicide gene) được hoạt hóa. Điều quan trọng là tế bào chết theo chương trình không để bị nhiễm trùng và không cho virus xâm nhập vào tế bào .

Một số tế bào khi đạt **trạng thái biệt hóa** không tiếp tục phân chia và sau đó chết. **Sự teo** xảy ra khi quá trình sinh tổng hợp lấy mất các chất cần bản cần cho sự sống.

Giữa nguyên phân và apoptosis có 3 kiểu tương quan như sau :

– **Cân bằng động**, khi cả 2 có **tốc độ như nhau** tạo sự nội cân bằng (homeostasis) cho mô .

– Sự phát triển hướng về **tăng trưởng** khi **nguyên phân mạnh hơn**. Ví dụ, ung thư có thể xảy ra khi nguyên phân mạnh hơn hoặc apoptosis giảm và ngừng.

– Sự **thu nhỏ** lại (Resorption) khi **apoptosis mạnh hơn**. Ví dụ, lúc nòng nọc mất đuôi .

Apoptosis xảy ra ở từng tế bào hay cụm tế bào riêng lẻ trong chu trình tái sinh của mô tế bào. Apoptosis cần năng lượng và thường đòi hỏi sự tổng hợp các đại phân tử mới. Thường apoptosis trải qua nhiều giai đoạn : tế bào co lại → bề mặt tế bào có mụn nước (bleb) → không bào (vacuole) được tạo ra bên trong tế bào → nhân có mụn nước → chromatin cô đặc và có cạnh (marginant) → tế bào và nhân gãy thành đoạn → tạo thành các thể apoptosis → tế bào kế cận hoặc macrophage tiêu hủy các thể apoptosis (apoptosis bodies) → các thể apoptosis bị tiêu hủy hoàn toàn do lysosome.

Ở các sinh vật đa bào sự kiểm soát phân bào và chết theo chương trình do những **hệ thống phức tạp**. Số lượng các tế bào có hoạt động chức năng do phân bào tạo ra và thời gian cần thiết để chúng tự tử được kiểm soát rất chính xác. Ở các tế bào ung thư, sự kiểm soát này bị hỏng dẫn đến nguyên phân không giới hạn và tế bào hầu như không biệt hóa.

b) Sự kiểm soát di truyền đối với apoptosis

Các chứng cứ về sự tự tử của tế bào theo chương trình được thu nhận từ các nghiên cứu ở *Caenorhabditis elegans*. Tuyến trùng này tạo ra 1031 tế bào soma trong quá trình phát triển bình thường đạt trưởng thành, nhưng 131 trong số đó có số phận định sẵn là chết theo chương trình định trước. Có 14 gen khác nhau tham gia vào kiểm soát di truyền đối với apoptosis. Quá trình chết của tế bào *C. elegans* có thể chia thành 4 bước :

– “**Sự quyết định**” (“decision”) của các tế bào riêng rẽ thực hiện chết theo chương trình.

– **Tế bào tự tử.**

– **Sự phồng lên** của tế bào chết.

– **Sự phân hủy** tế bào chết.

Các gen nêu trên có vai trò sống còn đối với các giai đoạn chết. Sự hoạt hóa của 2 gen, *ced-3* và *ced-4* trong số đó, là cần bản đối với sự chết theo chương trình của 131 tế bào được tiền định chết bằng apoptosis. Các đột biến làm bất hoạt *ced-3* hay *ced-4* gây ra sự sống sót của gần như tất cả các tế bào đáng lẽ chết bình thường trong quá trình phát triển. Protein được mã hóa do gen *ced-3* rất giống protein ICE (interleukin 1 β converting enzyme) của động vật có vú. ICE là **cysteine protease** cắt protein M_r 33.000 thành M_r 17.500, mà protein nhỏ này là dạng có hoạt tính sinh học của cytokine interleukin 1 β converting enzyme. Sản phẩm của gen *ced-3* có thể hoạt động với chức năng như **cysteine protease**.

Gen thứ ba *ced-9* tổng hợp protein làm chức năng bảo vệ tế bào khỏi chết. Các đột biến làm mất chức năng (gain-of-function) ở *ced-9* hoặc sự biểu hiện vượt trội (over expression) của *ced-9* gây ra sự sống còn của tế bào mà bình thường phải chết. Ngược lại, các đột biến làm bất hoạt *ced-9* gây ra apoptosis ở nhiều tế bào mà bình thường sống sót. Thế hệ tuyến trùng mất *ced-9* chết nhanh chóng trong phát triển phôi (embryogenesis), chứng tỏ hoạt tính bảo vệ có vai trò sống còn đối với sự phát triển bình thường của *C.elegans*.

Chức năng và cấu trúc bậc một của protein CED-9 giống với sản phẩm của proto-oncogene (gen tiền ung thư) có tên là *bcl-2* (gen tiền ung thư từ tế bào lymphoB - B cell lymphoma).

Sự tương đồng giữa protein CED-9 và protein *bcl-2* cho thấy các cơ chế phân tử của apoptosis được bảo tồn từ tuyến trùng (nematode) đến động vật có vú.

Protein p53, sản phẩm của **gen ức chế ung thư** (tumor suppressor gene), là **chất hoạt hóa** (activator) một trong những con đường dẫn đến apoptosis của động vật có vú và làm giảm số lượng **protein bcl-2**.

c) Apoptosis và bệnh

Apoptosis giữ vai trò cốt lõi đối với nhiều bệnh. Ví dụ, apoptosis điều hòa trực tiếp sự phát triển của khối u. Sự kiểm soát apoptosis có thể góp phần ngăn chặn hay làm chậm đi sự phát triển của bệnh AIDS, nếu tế bào nhiễm virus HIV bị chết.

Nhiều chứng minh cho thấy vai trò của apoptosis trong các bệnh liên quan đến các tế bào **mất tăng sinh** (non-proliferating), sống lâu, biệt hóa cuối cùng (terminally differentiated). Một số bệnh thoái hóa thần kinh như Alzheimer, hóa vôi (sclerosis) và bệnh tim có thể liên quan một phần đến apoptosis.

Apoptosis tuy được phát hiện không lâu nhưng nó thu hút nhiều nhà khoa học và hàng loạt công ti được phẩm lao vào nghiên cứu nhằm tìm con đường mới chữa trị bệnh ung thư và nhiều bệnh khác.

3. Từ các chu trình tế bào đơn giản đến các tổ chức phức tạp

Các sinh vật đa bào có **chu trình tế bào phức tạp** hơn với nhiều cơ chế điều hòa trung gian so với các sinh vật đơn bào. Các sinh vật đa bào gồm nhiều mô được biệt hóa cao mà tổ chức của chúng được kiểm soát bởi nhiều yếu tố cốt lõi của sự biệt hóa như nhân tố tăng trưởng, các hormone, sự tiếp xúc tế bào - tế bào và thông tin vị trí.

Để trải qua các giai đoạn của chu trình tế bào đến pha S, các tế bào động vật có vú phụ thuộc vào sự hiện diện của các hormone, các mitogen (tác nhân gây nguyên phân) và các nhân tố tăng trưởng (growth factor). Nhiều biến đổi xảy ra trong tế bào khi chúng được kích thích bởi các tác nhân trên. Nhiều tín hiệu đến nhân tế bào và kích thích làm chúng phiên mã. Đó là các gen mã hóa cho :

- Các **nhân tố điều hòa** chu trình tế bào như Cdc2, Cdks và cyclin.
- Các **protein gắn với DNA** (DNA - binding protein) và các nhân tố phiên mã.
- Các protein tham gia vào **dịch mã**.
- Các enzyme cần thiết cho **sinh tổng hợp các nucleotide và DNA**.
- Các protein liên quan đến hình thành **nền ngoại bào** (extracellular matrix).

Nói chung, sự tiến hóa của các sinh vật đa bào gắn liền với sự hình thành nhiều cơ chế mới với mức phức tạp cao hơn trong điều hòa chu trình tế bào.

VI. SỰ PHÁT TRIỂN Ở THỰC VẬT

Trong lịch sử tiến hóa, động vật và thực vật tách nhau cách nay khoảng 1 tỉ năm. Thực vật cũng có nhiều điểm khác đáng kể so với động vật:

- Sử dụng năng lượng mặt trời làm nguồn năng lượng.
- Tế bào có vách cứng, không di chuyển như động vật.

Những khác biệt quan trọng đó chi phối các cơ chế của sự phát triển cá thể, mà việc nghiên cứu hầu còn rất ít.

1. *Arabidopsis thaliana* là mô hình nghiên cứu sinh học phân tử ở thực vật

Đây là loài thực vật có nhiều đặc tính thuận lợi cho nghiên cứu di truyền và sự phát triển.

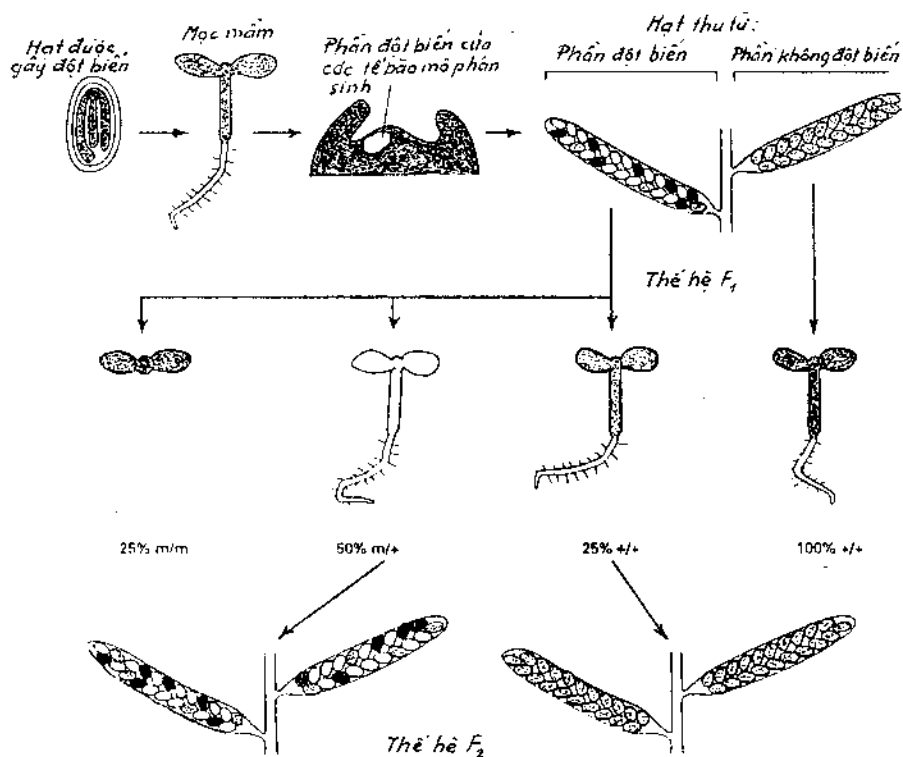
Sự phát triển ở thực vật được nghiên cứu ít hơn ở động vật nguyên do vì có **chu trình sống dài** và **bộ gen lớn**. Nhiều cây được nghiên cứu chi tiết về mặt di truyền học nhưng có giá trị kinh tế nên các tính trạng liên quan đến năng suất được chú ý nhiều hơn. *A. thaliana* có bộ gen nhỏ hơn so với nhiều thực vật và có thể nuôi trong phòng thí nghiệm 8 - 10 tuần nên trở thành đối tượng mô hình ở thực vật với nhiều tên gọi khác nhau như “**ruồi giấm xanh**” hay “**con bọ xanh**”.

Có thể xử lý các tác nhân gây đột biến khác nhau trên đối tượng này để thu nhận nhiều dạng đột biến. Hạt có phôi đa bào, được xử lý hóa chất gây đột biến và cho mọc lên thành cây. Cây này sẽ thành thể khảm gồm nhiều dòng tế bào khác nhau mang đột biến. Sự tự thụ phấn của các hoa sẽ tạo nên các dòng đồng hợp tử (m/m) hoặc dị hợp tử ($m/+$) với tỉ lệ $1/4$ đồng hợp tử lặn và $1/4$ đồng hợp tử dạng hoang dại (hình 16.20).



Hình 16.19. Cây *Arabidopsis thaliana*

Cây lúa (*Oryza sativa*) cũng có thể dùng để nghiên cứu di truyền vì số nhiễm sắc thể ít ($2n = 24$), bộ gen DNA nhỏ (4,3 Mb) và có nhiều gen đánh dấu (markers).



Hình 16.20. Gây đột biến ở *Arabidopsis thaliana*

2. Các gen chọn lọc homeotic (*Homeotic selector gene*)

Ở *A. thaliana*, một loạt các đột biến biến đổi lá thành hoa có thể coi tương tự các đột biến **thay đổi đốt thân** (body segment) ở ruồi giấm. Như vậy ở thực vật cũng như ở ruồi, có thể tìm thấy các **đột biến homeotic** biến đổi một phần mẫu thiết kế cơ thể này thành khác. Căn cứ theo kiểu hình, có thể chia các đột biến thành 3 nhóm :

- Đột biến ***apetala 2*** : lá đài (sepal) thành lá noãn (carpel) và tràng hoa (petal) thành nhị (stamen).
- Đột biến ***apetala 3*** : tràng hoa thành lá đài và nhị thành lá noãn.
- Nhóm thứ 3, mà đại diện là đột biến ***agamous*** có nhiều biến đổi phức tạp như nhị biến thành tràng hoa và lá noãn thay đổi vị trí tạo một loạt các lá đài và tràng hoa lồng vào nhau.

Ba nhóm đột biến này có thể coi tương ứng với 3 **nhóm gen homeotic ở ruồi giấm**. Các nghiên cứu tương tự được tiến hành ở *Antirrhinum majus*, và nhận được các đột biến với kiểu hình tương tự.

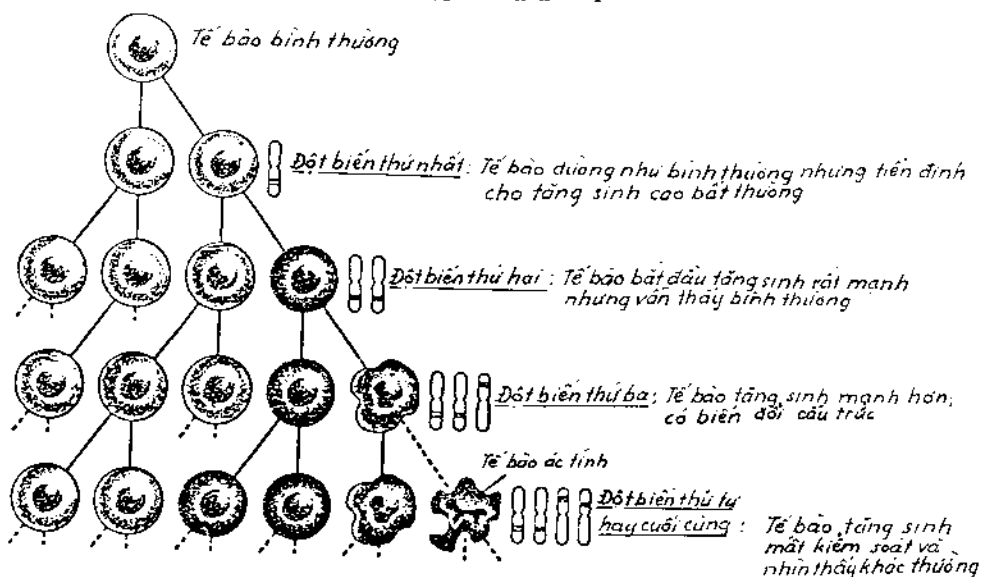
Nghiên cứu di truyền học phân tử của sự phát triển ở thực vật chỉ mới bắt đầu. Nhiều vấn đề đang được đặt ra như các hệ thống di truyền kiểm soát các tín hiệu vị trí và thông tin cục bộ trong sự hình thành mẫu thiết kế cơ thể thực vật.

VII. UNG THƯ

Ung thư là căn bệnh của thế kỉ, được loài người tập trung nghiên cứu và tìm cách chữa trị. Nguyên nhân gây ung thư rất nhiều và khác nhau, nhưng ở cơ chế phân tử đều liên quan đến các biến đổi di truyền trên DNA làm sai hỏng tiến trình tăng sinh (proliferation) bình thường.

1. Ung thư là một quá trình vi tiến hóa (microevolution)

Theo định nghĩa, các tế bào ung thư tăng sinh bất chấp các sự kiểm soát bình thường và có khả năng **tấn công xâm chiếm** các mô xung quanh biến chúng thành **ác tính** (malignant). Các tế bào này tạo **u thử cấp hay di căn** (metastase) nên khó can thiệp bằng giải phẫu.



Hình 16.21. Sơ đồ về sự xuất hiện tế bào ung thư

Phần lớn ung thư **bắt nguồn từ một tế bào** bị đột biến soma, nhưng các tế bào con của nó phải có những **biến đổi tiếp** do nhiều đột biến khác trước

khi trở thành ung thư (hình 16.21). Hiện tượng tiến triển này của khối u gọi là **tiến hóa theo dòng** (clonal evolution), thường có thể kéo dài nhiều năm, phản ánh tác động của các đột biến và chọn lọc tự nhiên đối với các tế bào soma. Tốc độ của quá trình được tăng nhanh do tác động của các **tác nhân gây đột biến** và một số **tác nhân không gây đột biến**. Chúng tác động lên sự biểu hiện của gen, kích thích tăng sinh và thay đổi mối quan hệ giữa tế bào đột biến với tế bào không đột biến. Sự tăng sinh của các tế bào ung thư thường gắn với **sai hỏng trong biệt hóa** làm cho các tế bào con của tế bào thân (stem cell) có khả năng tiếp tục phân chia thay vì đi vào trạng thái không phân chia hay chết. Các tế bào ung thư có thể xuyên qua màng và gây di căn.

2. Các nhóm gen liên quan đến ung thư

Sự xác định và đánh giá các đặc tính của nhiều gen liên quan đến ung thư là một trong những **thành tựu vĩ đại** của di truyền học phân tử.

Sự tăng sinh của tế bào có thể được **điều hòa trực tiếp** hoặc **gián tiếp - trực tiếp** qua cơ chế xác định tế bào có vượt qua **điểm tới hạn** (restriction point) hay không trong chu trình tế bào.

Tương ứng với điều này, có 2 con đường dẫn đến ung thư :

– Thứ nhất, các biến đổi làm **gen kích thích** (stimulatory gene) trở nên **siêu hoạt** (hyperactive) : kiểu đột biến này có hiệu quả **trội**. Allele biến đổi được gọi là **oncogene** (gen ung thư), còn allele bình thường là **proto-oncogene** (gen tiền ung thư) (từ chữ Hi Lạp là *onkos* - khối u).

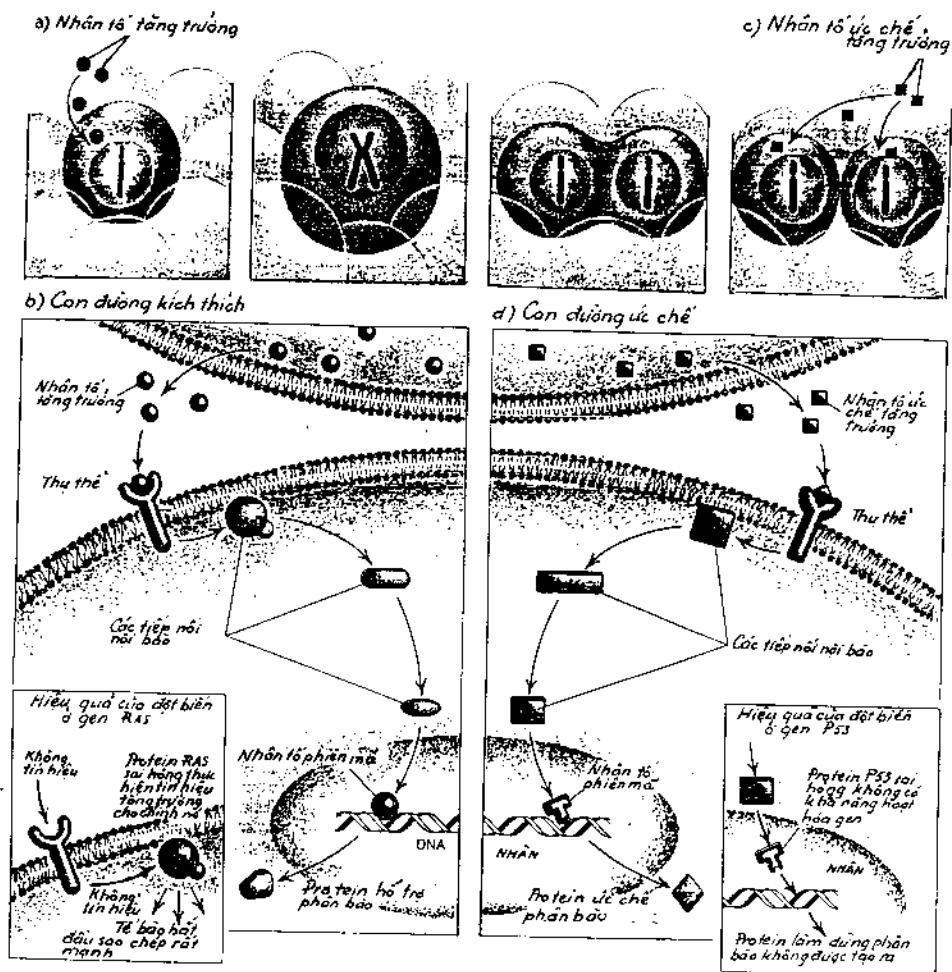
– Thứ hai, các biến đổi làm **gen kìm hãm** (inhibitory gene) **bất hoạt** (inactive) : kiểu đột biến này thường có hiệu quả **lặn**. Gen kìm hãm ban đầu được gọi là **gen ức chế khối u** (tumor suppressor gene).

Sơ đồ hình 16.22 mô tả hai kiểu tác động đối với hai nhóm gen.

3. Các oncogene và proto-oncogene

a) Các oncogene do retrovirus biến nạp

Các virus đã đóng một vai trò đáng kể trong việc nghiên cứu các nguyên nhân di truyền ung thư ở người. Mặc dù các virus không đóng vai trò quan trọng trong phần lớn ung thư ở người, nhưng các nghiên cứu ở virus động vật cung cấp những hiểu biết then chốt về các cơ chế gây ung thư nói chung.



Hình 16.22. Hai kiểu tạo tế bào ung thư

- a) và c) Tế bào sinh sản bình thường
- b) Con đường kích thích
- d) Con đường kìm hãm

Các **retrovirus**, do cơ chế sinh sản và đặc biệt là khả năng biến bộ gen RNA thành DNA gắn vào DNA của tế bào chủ (chương XI), có thể hoạt động như **vector mang oncogene** làm biến đổi tế bào. Chúng có thể ngẫu nhiên mang các oncogene của người và làm biến đổi tế bào chủ bằng **xen đoạn DNA** của chúng kể proto-oncogene của tế bào chủ. Hàng loạt các oncogene đã được xác định từ retrovirus gây biến đổi tế bào (bảng 16.4).

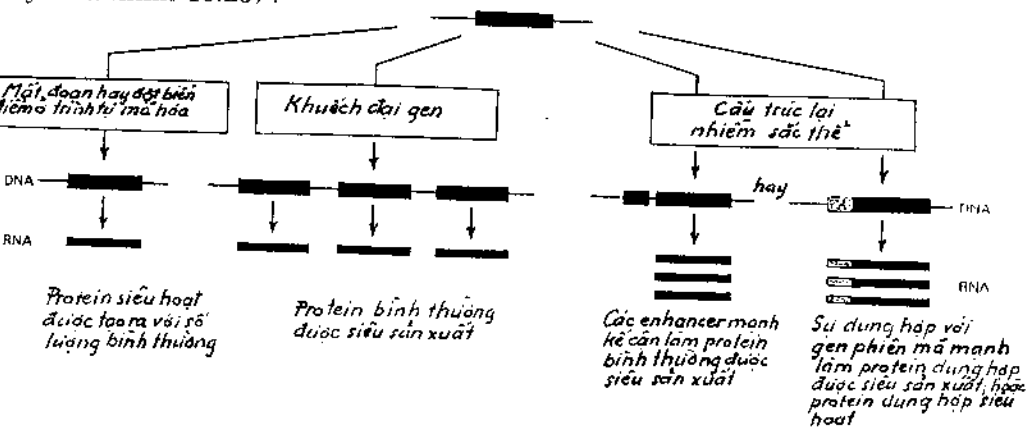
BẢNG 16.4. Một số oncogene được xác định qua sự hiện diện ở retrovirus gây biến đổi (transforming retrovirus)

Oncogene	Chức năng của proto-oncogene	Nguồn của virus	U do virus gây ra
<i>abl</i>	protein kinase (tyrosine)	chuột, mèo	pre-B-cell leukemia
<i>erb-B</i>	protein kinase (tyrosine) : thụ thể của nhân tố tăng trưởng biểu bì EGF (epidermal growth factor (EGF) receptor)	gà	erythroleukemia fibrosarcoma
<i>sis</i>	nhân tố tăng trưởng bắt nguồn từ bản máu, mạch B	gà	sarcoma; myelocytoma, carcinoma
<i>src</i>	protein kinase	khí	sarcoma

Một số oncogene khác được phát hiện không nhờ virus. Bảng trên chỉ nêu một số rất nhỏ trong **hơn 60 proto-oncogene** được phát hiện cho đến nay. Phần lớn các proto-oncogene mã hóa cho các cấu phần của các **cơ chế điều hòa tập tính xã hội** (social behavior) của tế bào trong cơ thể, đặc biệt là các cơ chế mà nhờ đó các tín hiệu từ các tế bào kế cận có thể thúc đẩy chúng phân chia, biệt hóa hay chết. Trên thực tế, các proto-oncogene hầu như liên quan đến tất cả các cấu phần tham gia vào **hệ thống tín hiệu** của tế bào như các protein được tiết ra, các thụ thể xuyên màng (transmembrane receptor), các gen điều hòa, v.v...

b) Các cách biến đổi proto-oncogene thành oncogene

Có nhiều cách biến đổi proto-oncogene thành oncogene. Ba cách chủ yếu là (hình 16.23) :



Hình 16.23. Ba cách biến đổi proto-oncogene thành oncogene

- **Mất đoạn hoặc đột biến điểm** trong trình tự mã hóa.
- **Khuếch đại gen** (Gene amplification).
- **Cấu trúc lại nhiễm sắc thể.**

Các gen có thể bị biến đổi do đột biến điểm, mất đoạn, chuyển đoạn nhiễm sắc thể hay do xen đoạn bộ gen của retrovirus.

4. Các đột biến ở tumor suppressor gene

Các đột biến ở tumor suppressor gene thường là lặn, nên tế bào chỉ mất kiểm soát khi cả 2 allele đều bị đột biến. Tuy nhiên, những người được truyền thụ một bản sao đột biến có gen có nhiều khả năng bị ung thư, do chỉ cần một đột biến ở allele kia thì chức năng ức chế khối u hoàn toàn bị tê liệt.

Các nghiên cứu phát hiện 2 tumor suppressor gene là :

- Gen **Rb** tạo retinoblastoma protein ức chế một dạng ung thư mắt là retinoblastoma. Retinoblastoma protein có tác dụng ức chế đối với một số dạng ung thư khác.

- Gen **p53** tạo protein p53 ức chế nhiều dạng ung thư. Các nghiên cứu gần đây cho thấy protein p53 tham gia hệ thống cấp cứu, sửa chữa nhiều sai hỏng của tế bào đang phân chia.

Các virus DNA như papillomavirus và SV40 có thể gây ung thư bằng cách cô lập các sản phẩm của tumor suppressor gene như retinoblastoma protein hay protein p53.

5. Các virus liên quan đến ung thư

Khoảng 15% ung thư ở người tính chung trên thế giới có cơ chế hình thành liên quan đến virus. Chúng có các nhóm sau :

- **DNA virus** : họ apovavirus (papillomavirus), họ Hepadnavirus (Hepative - B virus), họ Herpesvirus (Epstein -Barrvirus).
- **RNA virus** : họ Retrovirus (HIV-1, virus AIDS).

Các virus gây ung thư có thể tác động do **xen đoạn DNA** của chúng vào bộ gen chủ như đã nêu, ngoài ra có thể thực hiện :

- **Hoạt hóa bộ máy sao chép DNA** của tế bào chủ như một phần trong chiến lược sống còn cho bản thân chúng.

- **Kìm hãm tác động** của các tumor suppressor gene chủ yếu để **hoạt hóa sao chép DNA**.

Như vậy, bằng nhiều cách khác nhau các virus khi xâm nhập tế bào có thể làm tế bào mất sự kiểm soát bình thường.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Quá trình phát triển cá thể được thực hiện do nhiều **cơ chế điều hòa** rất phức tạp nên được nghiên cứu với nhiều **đối tượng mô hình** khác nhau từ virus đến động vật có vú, đặc biệt là *Drosophila* và *C. elegans*. Tổ chức bộ gen hợp lý cho việc biểu hiện đúng lúc, đúng nơi. Sự phát triển cá thể chịu tác động của nhiều yếu tố như : **sự tiền định của tế bào chất, thế năng phát triển, sự kiểm soát hoạt tính của gen, sự tiền định và biệt hóa**. Các **gen homeotic** (HOM và *hox*) chi phối sự phát triển theo hình mẫu thiết kế của cơ thể. Các **tổ hợp cyclin - kinase** có tác động chủ yếu đến chu trình tế bào. **Apoptosis**, sự chết theo chương trình có ý nghĩa quan trọng đối với sự phát triển. Sinh học phát triển cá thể ở thực vật chỉ mới ở bước đầu trên đối tượng *Arabidopsis thaliana*. Di truyền học phân tử của **bệnh ung thư** đạt được những thành tựu to lớn, nó cho thấy tế bào ung thư xuất hiện ở **một dòng** qua một quá trình lâu dài. Các nhóm gen liên quan đến ung thư gồm : **oncogene, proto - oncogene và tumor suppressor gene**. Các **virus** cũng là nguyên nhân quan trọng gây ung thư.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu các đặc tính của morphogen.
2. Nêu ví dụ về homeobox gen.
3. Vì sao một số sinh vật thích hợp cho việc làm mô hình nghiên cứu hơn các sinh vật khác ? Phân tích.
4. Hãy nêu giả thuyết giải thích hợp lý vì sao có sự hiện diện liên tục của các chất ức chế cyclin kinase trong tế bào có chu trình bình thường.
5. Kể tên 3 enzyme hay nhóm của các enzyme có hoạt tính quan trọng trong apoptosis.
6. Gen nào làm chết tế bào theo chương trình ở *C. elegans* mà tương ứng với gen ở động vật có vú ? Nêu tên các protein được tạo ra do các gen đó của động vật có vú.
7. Hoạt tính endonuclease xuất hiện trong trạng thái nào của tế bào ?

8. Nhân tố nào có thể ngăn chặn tế bào không chuyển sang apoptosis ?
9. Gen CDC 2 ở *S. cerevisiae* có vai trò gì ?
10. Vì sao không tính được xác suất xuất hiện bệnh ung thư ?
11. Các biến đổi nào làm cho proto-oncogene biến thành oncogene.
12. Các virus gây ung thư gây những biến đổi nào để biến tế bào thành ác tính ?
13. Hãy kể 6 kiểu tế bào biệt hóa tạo các protein xa xỉ tương ứng với chúng.

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Để theo dõi tổng hợp protein của mRNA, hệ thống dịch chiết noãn bào đã bị loại bỏ mRNA tự do được sử dụng. Nếu giả thuyết giải thích vì sao khi thêm mRNA mã hóa cyclin bị cắt bớt 90 gốc amino acid đầu so với kiểu protein hoang dại thì làm cho dịch chiết noãn bào không có mRNA tự do sẽ :

- a) Tổng hợp cyclin bị xén bớt.
- b) Hoạt tính kinase được thực hiện.
- c) Có nhân chuyển sang kì giữa.
- d) Có chu trình tế bào dừng lại ở điểm này.

Bài giải

a) Việc khởi sự phiên mã của cyclin mRNA có lẽ không phụ thuộc vùng mã hóa cho 90 gốc amino acid đầu tiên.

b) Cyclin bị xén ngắn phải chứa các trình tự amino acid cần cho sự hoạt hóa cyclin-dependent kinase.

c) Cyclin-dependent kinase gắn với cyclin bị xén ngắn có khả năng tác động làm G_2 chuyển sang kì giữa.

d) Sự thoát khỏi nguyên phân phụ thuộc vào sự phá hủy cyclin, điều này lại phụ thuộc vào sự hiện diện của “vùng phân hủy” nằm trong đoạn 90 amino acid. Vì “vùng phân hủy” bị mất nên sự thủy giải cyclin không xảy ra và tế bào không thoát ra khỏi nguyên phân. Chu trình tế bào dừng lại ở kì giữa.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Polypeptide điển hình gồm 300 gốc amino acid. Khoảng 15.000 mRNA khác nhau có thể phát hiện trên polysome của một kiểu tế bào người biệt hóa. Nếu bộ gen người có 10^9 bp, phần nào của bộ gen đại diện cho số đó? Làm cách nào tính số còn lại?

2. Trong giai đoạn phát triển sớm của phôi, nhằm đáp ứng nhu cầu phân bào nhanh cần tăng vọt tốc độ sinh tổng hợp protein nên tế bào trứng của một loài lưỡng cư có dự trữ sẵn 10^{12} ribosome. Tốc độ sản sinh ra ribosome trong tế bào trứng tăng trước tiên bằng khuếch đại khoảng 10^3 lần gen rRNA. Các gen này đồng thời được phiên mã ở tế bào trứng gần với tốc độ tối đa, trong khi đó ở tế bào soma chúng chỉ được phiên mã một phần với tốc độ tối đa. Cần khoảng bao nhiêu năm để tổng hợp 10^{12} ribosome với tốc độ trung bình ở tế bào soma là 3×10^6 ribosome một ngày.

3. Tế bào hợp tử có tính toàn thể và trong quá trình phát triển các tế bào biệt hóa có thành phần protein khác nhau được tạo ra. Có 2 giả thuyết giải thích sự biệt hóa:

– Giả thuyết về sự phát triển khảm: các gen bị mất dần trong nguyên phân chỉ còn lại gen tạo protein đặc hiệu cho từng loại tế bào biệt hóa.

– Giả thuyết điều hòa: các nhóm gen khác nhau im lặng hay được hoạt hóa tùy loại tế bào.

a) Nêu phương pháp thử nghiệm để kiểm tra giả thuyết nào đúng?

b) Nêu thí nghiệm để có câu trả lời dương tính rằng tế bào biệt hóa có toàn thể hay không?

4. Đột biến *antennapedia* ở *Drosophila* làm cho chân mọc ở đầu thay chỗ *antenna* lúc bình thường liên quan tới nhóm gen nào?

CHƯƠNG XVII

CÁC BIẾN ĐỘNG CỦA BỘ GEN

Chương này đề cập đến *cơ chế phân tử* và *các kiểu tái tổ hợp gen*, các *phần tử di động* của nhiễm sắc thể và cơ chế di truyền của sự *miễn nhiễm*. Tái tổ hợp di truyền không những là cơ chế chủ yếu thực hiện trao đổi thông tin di truyền giữa các sinh vật, mà còn góp phần sắp xếp lại các gen trong quá trình phát triển cá thể.

Tái tổ hợp di truyền được phát hiện rất sớm trước khi DNA được chứng minh là vật chất di truyền. Trong sửa sai DNA có sự tham gia của các cơ chế tái tổ hợp. Các phân tử DNA có thể tái tổ hợp với nhau để *tổ chức lại* (rearrangement) vật chất di truyền bằng nhiều cách khác nhau, chủ yếu có 4 loại sau : *tái tổ hợp tương đồng* (homologous recombination), *tái tổ hợp điểm chuyên biệt* (site specific recombination), *transposition* (chuyển vị gen) và *tái tổ hợp không chuẩn* (illegitimate recombination).

Loại cuối cùng liên quan đến việc mất hay gắn đoạn DNA vào những điểm không tương đồng như trường hợp *mất đoạn* và *chuyển đoạn*, mà đến nay cơ chế phân tử chưa rõ.

I. TÁI TỔ HỢP TƯƠNG ĐỒNG

Tái tổ hợp tương đồng được phát hiện đầu tiên ngay trong các thí nghiệm của Morgan ở *Drosophila*. Cơ chế của nó dẫn đến sự *hoán đổi thuận nghịch* (reciprocal exchange) các đoạn tương ứng giữa hai nhiễm sắc thể tương đồng và không làm mất thông tin di truyền. Trong trường hợp conversion (chương XIII) là sự hoán đổi không thuận nghịch. Tuy nhiên, cả tái tổ hợp tương đồng và conversion có lẽ cũng có cơ chế căn bản giống nhau.

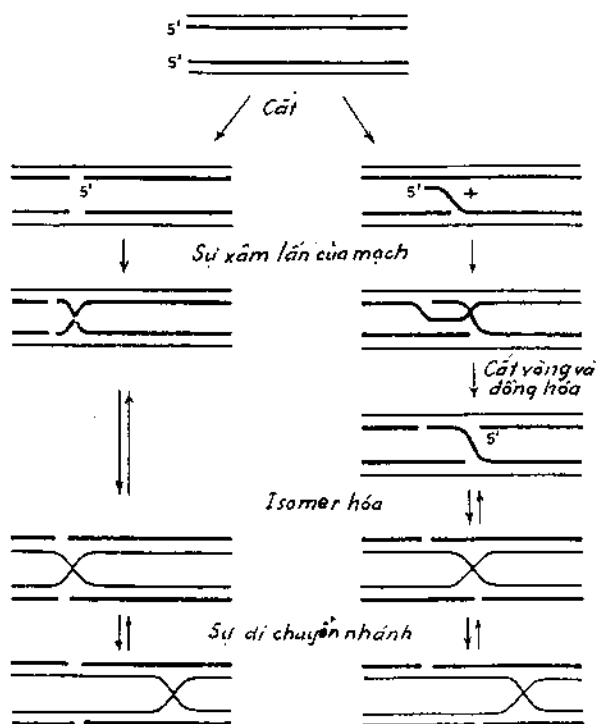
Mặc dù đã phân lập được nhiều đột biến sai hỏng tái tổ hợp (đặc biệt ở phage, E.coli và nấm men) và nhận được nhiều sản phẩm protein tinh sạch đặc hiệu cho quá trình này, nhưng tái tổ hợp tương đồng chưa được tiến hành *in vitro* và nhiều chi tiết chưa biết rõ. Hiện nay, đa số cho rằng tái tổ hợp ở *Prokaryotae* và *Eukaryotae* liên quan đến đứt và nối các đoạn DNA.

1. Các mô hình trao đổi đoạn

Các mô hình giải thích cơ chế phân tử của tái tổ hợp tương đồng căn cứ vào sự tham gia của các đoạn đứt mạch đơn hay mạch kép (single or double stranded break).

a) Sự trao đổi đoạn khởi sự bằng mạch đơn

Sự trao đổi đoạn khởi sự bằng mạch đơn (single strand initiated exchange) được mô tả trên hình 17.1.



Hình 17.1. Các mô hình tái tổ hợp tương đồng được khởi sự bằng mạch đơn

Bên trái : mô hình của B.Lewis B (1990).

Bên phải : mô hình của Radding CM (1978).

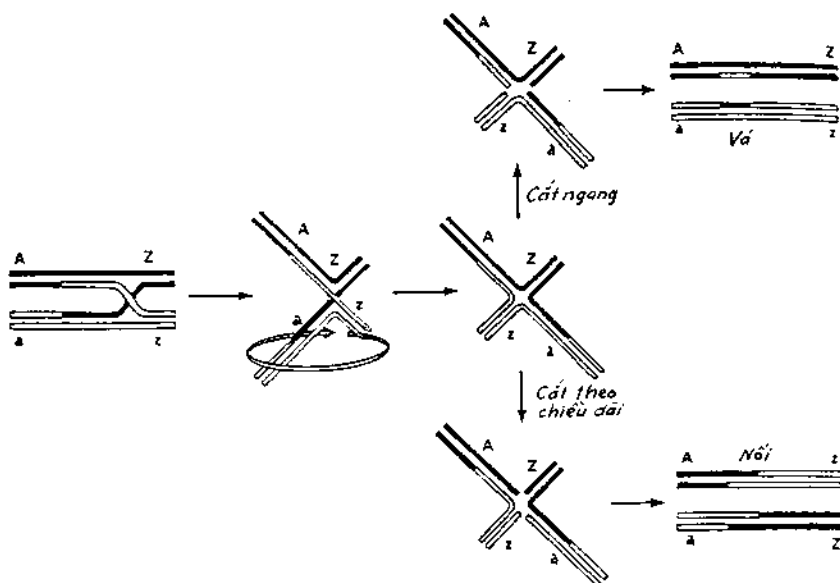
Diễn biến như sau :

– Sự xếp thẳng các đoạn kép tương đồng (homologous duplexes).

– **Sự xâm lấn** (Invasion) của các mạch bị đứt vào đoạn kép đối tác. Sự nối các mạch vào các đoạn tương đồng tạo ra **cấu trúc nối trung gian Holliday** (Holliday - tên người phát hiện cấu trúc này), trong đó hai sợi kép kết nhau nhờ trao đổi chéo mạch đơn (hình 17.2). Nghiên cứu cấu trúc cho thấy có sự bắt cặp hoàn toàn của các mạch DNA trong cấu trúc trung gian. Các mạch từ cả hai sợi kép ban đầu có thể xâm lấn cùng điểm hay chỉ một mạch xâm lấn trong trường hợp sau, sao chép có thể được thực hiện nhằm **lấp chỗ trống** do mạch xâm lấn để lại (hình 17.1).

– **Sự di chuyển nhánh** (Branch migration) của cấu trúc nối làm tăng chiều dài của đoạn trao đổi.

– **Phân tách** (Resolution) các phân tử nối. Như lúc khởi sự, điều này đòi hỏi cắt mạch và vị trí của các điểm cắt này xác định sản phẩm của tái tổ hợp. Nếu điểm cắt cuối cùng ở trên một mạch như chỗ khởi sự thì sản phẩm như cũ, trong khi đó sự cắt ở mạch đối diện tạo ra các **đoạn tái tổ hợp** (hình 17.2)



Hình 17.2. Sự isomer hóa và cắt của cấu trúc nối Holliday tạo các sản phẩm khác nhau

b) Mô hình hồi phục chỗ trống mạch kép

Mô hình **hồi phục chỗ trống mạch kép** (double stranded gap repair) là cơ chế tái tổ hợp ở phage λ và T4, ở nấm men và trong một số trường hợp ở *E.coli* (hình 17.3).

Quá trình thực hiện như sau :

– Sự **xếp thẳng** hai phân tử DNA tương đồng.

– Sự **phân hủy** bởi exonuclease chỗ đứt tạo chỗ trống (gap) với sự căng mạch đơn.

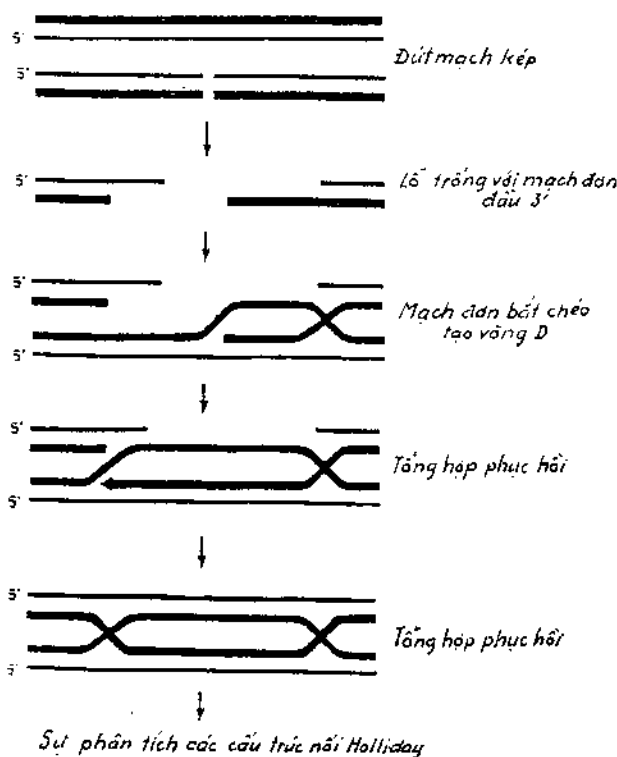
– Sự **xâm lấn** của một trong các đầu mút đoạn mạch đơn vào thể kép (duplex) tạo vòng D (D-loop).

– **Tổng hợp DNA** được khởi sự ở đầu 3'-OH của mạch xâm lấn. Việc này thay thế trình tự mất do sự phân hủy của exonuclease và phủ kín điểm

- cắt ban đầu. Mạch được tạo vòng chữ D có thể bắt cặp với phía kia của chỗ đứt, tạo primer cho tổng hợp DNA của mạch đối.

– Sự **phân tách** của cấu trúc nối **Holliday** tạo ra 2 phân tử tái tổ hợp, trong đó chỗ gãy ban đầu được làm liền lại.

Các mô hình trên và những biến dạng của chúng đã được nêu ra để giải thích các số liệu thu nhận được và cung cấp dữ liệu cho việc tìm ra các enzyme của quá trình tái tổ hợp.



Hình 17.3. Mô hình hồi phục chỗ trống mạch kép của tái tổ hợp tương đồng (theo Lewis B - 1990)

2. RecA protein của *E.coli* và các protein khác tham gia trao đổi mạch

Quá trình cắt, trao đổi, nối và tách các mạch trong tái tổ hợp tương đồng phức tạp nên cần có sự tham gia của nhiều protein. **Gen RecA**, mã hóa cho protein thực hiện trao đổi mạch, giữ **vai trò trung tâm** hầu như trong tất cả các quá trình tái tổ hợp tương đồng ở *E.coli*. Các đột biến sai hỏng ở gen *RecA* không thực hiện được tái tổ hợp tương đồng, sửa sai sau sao chép và bất kì chức năng nào của hệ thống SOS.

RecA protein tinh sạch gắn phối hợp với DNA mạch đơn tạo **phức hợp nucleoprotein** là phần có hoạt tính trong trao đổi mạch DNA. *RecA* còn có các hoạt tính khác như sự thủy giải ATP và cắt repressor cũng được hoạt hóa bởi sự gắn *RecA* vào DNA mạch đơn. *RecA* còn gắn vào DNA mạch kép, mặc dù chậm hơn so với DNA mạch đơn và có thể làm chuỗi xoắn kép tháo xoắn một phần.

RecA xúc tác sự trao đổi mạch giữa nhiều loại phân tử DNA với cấu hình (conformation) khác nhau. Các đòi hỏi về mặt cấu trúc đối với cơ chất DNA là :

- Có vùng DNA **mạch đơn** để ráp sợi *RecA*.
- Sự **tương đồng** DNA - DNA giữa hai cặp.
- Đầu tự do bên trong vùng tương đồng cho phép mạch **xoay vòng**.
- Sự hiện diện **topoisomerase** giúp **nối chéo** các mạch.

Trong các điều kiện cần thiết cho tái tổ hợp *in vitro*, SSB protein (single strand binding) tham gia hỗ trợ *RecA*, nó có vai trò quan trọng trong duy trì sự ổn định về hoạt tính của **phức hợp *RecA* - DNA mạch đơn** trong suốt phản ứng trao đổi mạch.

Trong các mô hình về tái tổ hợp tương đồng, các nuclease giữ vai trò quan trọng trong giai đoạn khởi sự và tách mạch đơn. Ngoài chúng ra, các enzyme cắt các cấu trúc nối trung gian **Holliday** trong các giai đoạn cuối của quá trình trao đổi mạch tương đồng.

II. TÁI TỔ HỢP ĐIỂM CHUYÊN BIỆT

Khác với tái tổ hợp tương đồng, sự chuyển các đoạn DNA trong trường hợp này không đòi hỏi các đoạn DNA tương đồng hay bộ máy thực hiện gồm nhiều protein như *RecA*. Tái tổ hợp điểm chuyên biệt phụ thuộc vào **một** hay **vài protein**. Ít nhất, một trong số các protein đó tương tác với điểm nhận biết ngắn, và sự khởi sự của tái tổ hợp phụ thuộc vào các **tương tác protein - DNA**, chứ không phải DNA - DNA. Trong các phản ứng điển hình của kiểu tái tổ hợp này, sự cắt và nối DNA ở những điểm xác định tạo ra các phân tử tái tổ hợp chính xác và đồng dạng.

1. Các hệ thống tái tổ hợp điểm chuyên biệt

Các nghiên cứu sinh học phân tử cho thấy tái tổ hợp điểm chuyên biệt là hiện tượng rất phổ biến và có nhiều hệ thống khác nhau như mô tả trên

bảng 17.1. Đáng lưu ý là một số hệ thống liên quan đến sự biểu hiện của gen và sự ráp nối gen trong quá trình phát triển cá thể.

BẢNG 17.1. Các hệ thống tái tổ hợp ở điểm chuyên biệt

Chức năng	Hệ thống	Đặc điểm
— Sự gắn vào và cắt rời ra của phage (phage integration and excision)	λ Int	Hệ thống được nghiên cứu tốt nhất; Các phage tương tự λ như P ₂₂ , P ₂ và P ₄ sử dụng các hệ thống tương tự.
— Sự phân tách các đa phân vòng tròn (Resolution of circular multimers).	Tn 3 và γ δ resolvase.	Chế biến các sản phẩm cùng kết hợp với sự chuyển vị (processing of cointegrate products of transposition).
	ColE ₁ Cer	Sự phân tách các đa phân làm tăng tính ổn định của plasmid, cần sự tham gia của 3 protein tế bào chủ.
	P ₁ lox-cre	Sự hình thành vòng tròn trong nhiễm phage; Sự phân tách các đa phân làm tăng tính ổn định của plasmid.
	2 μ FLP	Sự đảo đoạn (inversion) cho phép khuếch đại plasmid bằng tạo vòng tròn quay kép (double rolling-circle) trung gian.
— Các đảo đoạn cho sự biểu hiện của các gen theo cách khác (Inversions for expression of alternate gene).	Hin Gin Pin	Các gen của tiêm mao ở Salmonella. Sợi đuôi của phage μ_v Sợi đuôi của phage P ₁
- Sự lắp ráp (Assembly) của các gen trong phát triển cá thể.	Nhân tố σ của tế bào mẹ chuyên biệt (mother-cell-specific σ factor) ở B.subtilis. Các gen cố định nitrogen ở Anabaena Immunoglobulin và các gen thụ thể của tế bào T (T-cell receptor genes) ở động vật có vú.	

Quá trình tái tổ hợp có các đặc tính chung như sau :

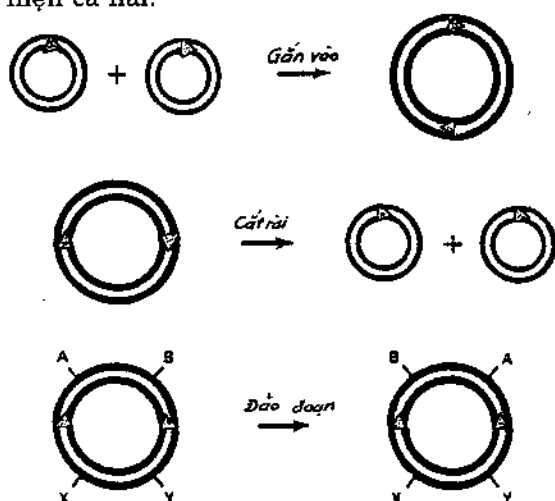
– Tái tổ hợp có tính **bảo tồn** (conservative), không đòi hỏi tổng hợp DNA và các trình tự không bị mất cũng như không nhận thêm qua phản ứng.

– Sự trao đổi thực hiện giữa các **điểm tương đối nhỏ** của DNA của những trình tự gần giống nhau. Một số phản ứng đòi hỏi trình tự DNA có tác động *cis* để đạt hiệu quả cao.

– Một **recombinase protein** chịu trách nhiệm chính cho việc nhận biết các **điểm tái tổ hợp** (recombination site) và cho việc tách và nối DNA. Các tổ hợp trung gian **protein - DNA** giữ năng lượng cất dùng cho phản ứng nối, nên không cần nucleotide cofactor. Các protein phụ gắn với DNA thường hỗ trợ sự lắp ráp của recombinase vào các điểm tái tổ hợp .

– Các phản ứng có thể xảy ra **giữa các phân tử** (intermolecular) như sự gắn của bộ gen λ vào nhiễm sắc thể tế bào chủ (chương XI) hay **bên trong phân tử** (intramolecular) như phân tách các **đa phân vòng tròn** (circular multimers).

– Các phản ứng trong phân tử có thể hoặc do **đảo đoạn** (inversion), trong đó sự định hướng của đoạn DNA giữa các điểm tái tổ hợp đảo ngược so với 2 đoạn bên, hoặc do **mất đoạn** (deletion) do đoạn DNA bị cắt rời (hình 17.4). Các sản phẩm được tạo ra phụ thuộc vào sự **định hướng** của các điểm tái tổ hợp : cắt đứt đoạn do tái tổ hợp giữa các lặp đoạn trực tiếp (direct repeat) trong khi đó các đảo đoạn hình thành sự định hướng của các điểm đảo ngược. Một số recombinase xúc tác chỉ một trong các sự kiện, trong khi đó số khác thực hiện cả hai.



Hình 17.4. Các hậu quả của tái tổ hợp ở điểm chuyển biệt

2. Các recombinase

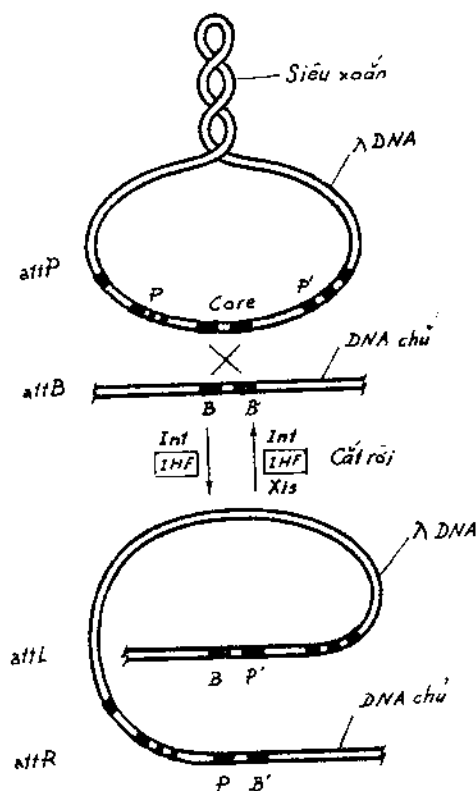
Các recombinase được chia thành hai nhóm khác nhau gồm các protein có quan hệ gần.

a) Họ Integrase

Họ này gồm các protein $P_{I}Cre$ và $2\mu FLP$, protein λInt và integrase của một số các phage khác. Các protein này thực hiện cắt lệch (staggered breaks) trên DNA đầu 5' của đoạn 6 - 8 nucleotide và hình thành liên kết hóa trị DNA - protein qua tyrosine gắn vào 3'-P.

Sự gắn của bộ gen λ vào tế bào chủ trong quá trình tiềm tan (lysogenisation) là ví dụ đầu tiên được nghiên cứu tốt hơn cả về tái tổ hợp điểm chuyên biệt (chương XI).

Protein Int (integrase) nhận biết các điểm tái tổ hợp, thực hiện các phản ứng cắt và nối. Ngoài protein Int, cả sự gắn vào và cắt rời ra (excision) cần có sự tham gia của protein IHF (integration host factor). Sự cắt rời được thực hiện còn nhờ protein Xis của phage và protein Fis (factor for inversion stimulation) của *E.coli* (hình 17.5).



Hình 17.5. Các cấu phần gắn vào và cắt rời trong tái tổ hợp ở phage λ .

$attP$ siêu xoắn gắn vào $attB$ thẳng với sự có mặt của Int và IHF tạo sản phẩm $attL$ (Left - trái) và $attR$ (Right-phải); Phản ứng cắt rời nhờ thêm Xis.

Tái tổ hợp gắn vào (Integrative recombination) xảy ra giữa các điểm gắn (attachment site) của phage ($attP$) và vi khuẩn ($attB$). Giữa hai điểm gắn này xảy ra **tiếp hợp** (synapsis) : $attP$ gắn vào $attB$ tạo **phức hợp ổn định** để kết các điểm tái tổ hợp trước khi thực hiện trao đổi. Sự trao đổi được thực hiện bởi hai phản ứng nối tiếp cắt và nối mạch đơn nhờ protein Int.

b) Họ resolvase (Resolvase family)

Họ này gồm *Tn3* và $\gamma\delta$ *resolvase* và họ *Hin* của *invertase*. Sự gắn cộng hóa trị *protein* - DNA thực hiện nhờ liên kết với *serine* - 5'P. Ở họ này, *gắn đầu N* có vùng tham gia vào *trao đổi mạch* và vùng *đầu C* chịu trách nhiệm *gắn đặc hiệu* DNA.

Các *invertase*, có cơ chế tác động tương tự resolvase, xúc tác phản ứng tạo *đảo đoạn* (inversion - do đó có tên invertase) hơn là tạo đứt đoạn (deletion) và không có khả năng thực hiện tái tổ hợp giữa các phân tử.

3. Sự lắp ráp gen (*Gene assembly*) trong phát triển cá thể

Tái tổ hợp điểm chuyên biệt có thể hoạt hóa các gen vào những thời điểm chính xác trong quá trình phát triển cá thể. Ở *B.subtilis*, gen xác định nhân tố σ của *RNA polymerase* được lắp ráp ở tế bào mẹ trong quá trình *tạo bào tử* nhờ sự mất đoạn đặc hiệu của một vùng bộ gen. Ở vi khuẩn lam *Anabaena*, các gen tham gia cố định nitrogen được cắt bởi đoạn rời 11kb trong quá trình tạo heterocyst (tế bào chuyên hóa cho cố định nitrogen). Gen XisA có lẽ mã hóa cho recombinase ở điểm chuyên biệt dùng cho sự cắt rời này.

III. TRANSPOSITION (SỰ CHUYỂN VỊ)

Các trình tự đặc hiệu của DNA *di chuyển* đến vị trí mới trên cùng nhiễm sắc thể được gọi là *transposition*. Các phân tử DNA, được gọi là *transposon* (kí hiệu gen : *Tn*), các *phần tử chuyển vị* (transposable elements) hay các *trình tự xen đoạn* (insertion sequence). Đây là hiện tượng rất phổ biến trong thiên nhiên, các transposon được tìm thấy ở vi khuẩn, nấm, thực vật và động vật. Chúng có chức năng như các vector quan trọng thực hiện biến đổi di truyền. Các xen đoạn, mất đoạn và cấu trúc lại bộ gen thường kèm theo sự di chuyển của các transposon. Chúng *hoạt hóa* hay *làm bất hoạt* các gen bằng cách xen đoạn vào kề bên hay vào giữa đoạn gen. Các transposon, là các *phần tử lặp đoạn* (repetitive elements), còn tạo các vùng tương đồng rải trong bộ gen, nhờ đó các hệ thống tái tổ hợp tương đồng có thể tác động.

Transposition gồm 3 kiểu chính :

— *Transposition không sao chép* (nonreplicative) : Phần tử chuyển vị được cắt khỏi DNA cho (donor) và được gắn vào phân tử DNA mục tiêu. Thuộc loại này có *Tn10*, *Tn5*, *Tn7*.

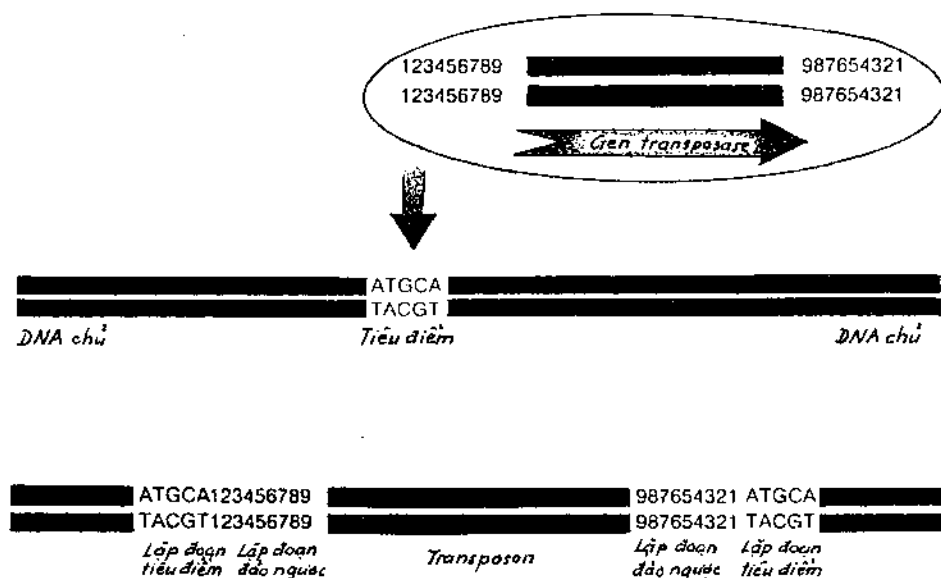
– **Transposition sao chép** (replicative) : DNA được nhân đôi và bản sao được xen vào vị trí mới tạo **cointegrate** (cộng gán). Thuộc loại này có *Tn3*, *Mu*.

– **Retrotransposition** : Sự di chuyển qua **trung gian RNA**, nhờ reverse transcriptase tạo thành cDNA, và sự **xen đoạn cDNA** vào vị trí mới.

1. Các trình tự xen đoạn IS

Các **transposon đơn giản nhất** là các **trình tự xen đoạn** (insertion sequence) và được kí hiệu bởi tiếp đầu ngữ IS kèm số thứ tự như IS₄.

Các phần tử IS là các cấu phần bình thường của DNA vi khuẩn và plasmid. Dòng *E.coli* chuẩn thường chứa vài bản sao (<10) của bất kì một trong các IS chung thường gặp. Để mô tả sự xen đoạn vào điểm đặc biệt, kí hiệu 2 chấm kép được sử dụng như λ :: IS₁ chỉ IS₁ xen vào phage λ.



			Chiều dài toàn bộ	Sự chọn lựa tiêu điểm
IS1	9 bp	23 bp	768 bp	ngẫu nhiên
IS2	5 bp	41 bp	1327 bp	điểm nóng
IS4	11-13 bp	18 bp	1428 bp	AAAN ₂₀ TTT
IS5	4 bp	16 bp	1195 bp	điểm nóng
IS10R	9 bp	22 bp	1329 bp	NGCTNAGCN
IS50R	9 bp	9 bp	1531 bp	điểm nóng
IS903	9 bp	18 bp	1057 bp	ngẫu nhiên

Hình 17.6. Sơ đồ cấu trúc của transposon có các IS, các lặp đoạn đảo ngược và tạo lặp đoạn trực tiếp ở hai đầu DNA điểm mục tiêu

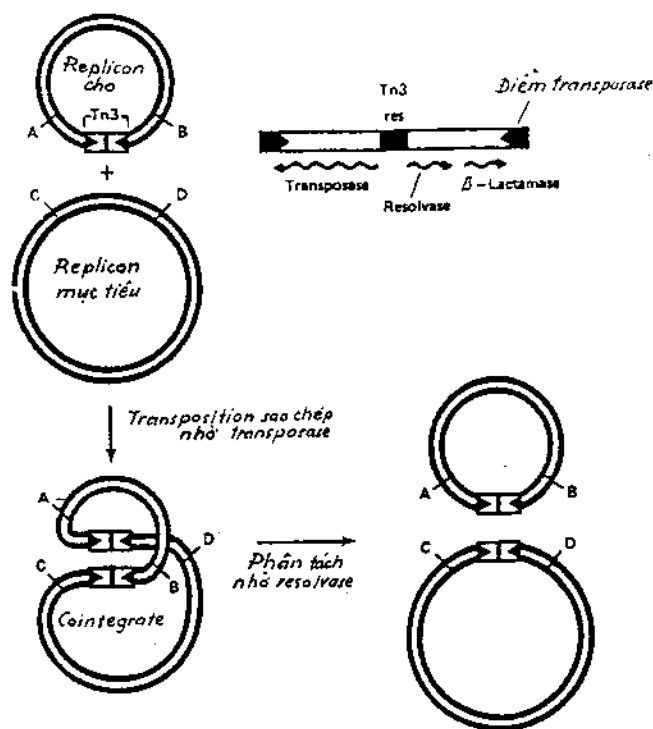
Các IS là những đơn vị tự trị, mỗi một trong chúng mã hóa cho chỉ một protein cần thiết cho sự chuyển vị bản thân chúng. Trình tự của mỗi loại IS có khác nhau, nhưng trong tổ chức cấu tạo có nhiều tính chất chung. Cấu trúc để gây ra sự chuyển vị trước và sau sự xen đoạn ở **tiêu điểm** (target) được minh họa trên hình 17.6 mà phía dưới tóm tắt các chi tiết về IS.

Các đầu mút của transposon có **trình tự lặp lại đảo ngược** (inverted repeat). Trong ví dụ này, tiêu điểm có 5 bp. Các đầu mút của transposon gồm các lặp đoạn đảo ngược 9bp được đánh số từ 1 đến 9.

Ở hai đầu của IS luôn có hai **trình tự lặp đoạn trực tiếp** (direct repeat) ngắn. Các trình tự này dao động tùy transposon, nhưng cố định đối với mỗi loại IS. Chiều dài của phần lớn lặp đoạn trực tiếp là 9, chúng xác định các đầu mút của transposon.

2. Transposon không sao chép và sao chép

Sự chuyển vị DNA trong cả hai kiểu này có những tính chất chung (hình 17.7).



Hình 17.7. Sơ đồ về transposition sao chép transposon Tn3
A,B = các gen của replicon cho ; C,D = các gen ở replicon mục tiêu.
Đoạn thẳng phía trên là cấu trúc của Tn3

– Cả hai đầu của phân tử mang gắn như một trình tự có định hướng *đảo ngược* nhau.

– Các transposon mã hóa ít nhất một protein là *transposase*. Transposase gắn đặc hiệu và cắt các trình tự ở cuối để thực hiện chuyển vị.

– Các transposon tạo bản sao ngắn ($\leq 12\text{bp}$) của DNA ở điểm mục tiêu trong transposition. Chiều dài của trình tự này đặc trưng và không đổi đối với một phân tử nhất định và được tạo ra nhờ sự *cắt so le* (staggered cleavage) của DNA mục tiêu nhờ transposase.

Cơ chế transposition được nghiên cứu chi tiết ở *phage Mu* và có thể tóm tắt như sau :

– Sự nhận biết và bắt cặp 2 đầu mút của transposon nhờ transposase để hình thành cấu trúc chuyển biệt *protein - DNA*. Sự hình thành phức hợp được kích thích bởi các *protein HU* và *IHF* là các nhân tố tham gia tái tổ hợp điểm chuyển biệt Mu transposase, giống như λInt protein, có 2 vùng gắn độc lập.

– Sự *cắt khác* (nicking) do transposase tạo ra 3'-OH ở mỗi đầu của Mu.

– *Cắt tiêu điểm* nhờ transposase tạo đầu mút so le 5' - P dài 5 bp.

– Sự *nối đầu 5' - P* của tiêu điểm với 3'-OH của transposon tạo *cấu trúc trung gian chuyển mạch* (strand - transfer intermediate).

Tn10 có lẽ sử dụng cơ chế tương tự để thực hiện transposition không sao chép.

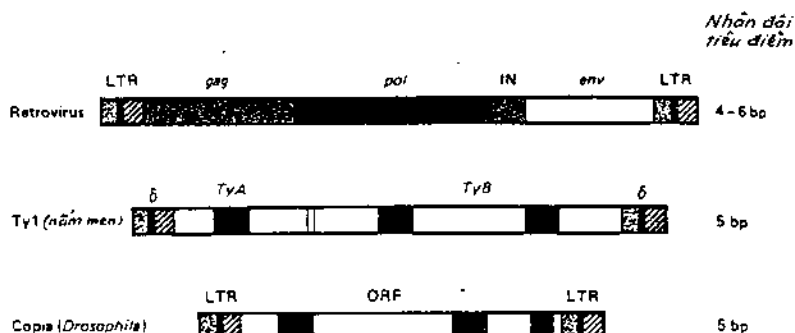
3. Retrotransposition

Nhóm các transposon, được phát hiện ở nấm men (Ty) và *Drosophila* (*copia*) và có liên quan đến retrovirus, di chuyển đến vị trí mới qua trung gian RNA. Transposon của nấm men Ty, giống với retrovirus, có *lặp đoạn cuối dài* (long terminal repeat) được gọi là trình tự ở nằm ở 2 phía đoạn mã hóa. Các protein được mã hóa, có trình tự tương đồng với integrase của retrovirus và reverse transcriptase, rất cần thiết cho transposition.

Phương thức phiên mã ngược của các phân tử di động tương tự như của retrovirus. Có sự tương tự về cấu trúc giữa retrovirus và các retrotransposon ở nấm men (Ty) và *Drosophila* (*copia*) (hình 17.8).

Retrotransposition tạo bản sao của phân tử ở vị trí mới, trong khi phân tử cho ban đầu vẫn giữ nguyên cấu trúc không biến đổi. Do vậy, retrotransposition tạo nên một ít đứt đoạn và các tái cấu trúc

(rearrangement) của bộ gen tế bào chủ. Những biến đổi của bộ gen liên quan với retrotransposition sẽ dẫn đến việc làm *ngừng* hay *hoạt hóa các gen*, mà một số có thể gây ung thư.



Hình 17.8. Sự tương tự giữa retrovirus với Ty và copia

LTR $\rightarrow$ LTR và δ (long terminal repeat) : các lặp đoạn cuối dài.

Orf (open reading frame) : khung đọc mở.

IN (Integration protein) : protein gắn vào.

Gag, pol, env : các gen của virus.

Các nghiên cứu di truyền ở bắp, do Mc Clintock tiến hành vào những năm 1940, cho thấy các **phần tử kiểm soát** (controlling elements) có thể di chuyển trên nhiễm sắc thể gây ra hiện tượng hạt dõm. Điều đó cho thấy transposition có thể gây nhiều hậu quả di truyền khác nhau.

IV. SỰ DI TRUYỀN CỦA CÁC CƠ CHẾ MIỄN NHIỄM

Miễn nhiễm học (Immunology), khoa học nghiên cứu các phản ứng miễn nhiễm, đã có những thành tựu to lớn trong 30 năm qua thể hiện ở 7 giải Nobel vào các năm 1960, 1972, 1977, 1980, 1984, 1987 và 1990. Các kĩ thuật miễn nhiễm học được ứng dụng có hiệu quả trong nhiều lĩnh vực sinh học và y dược học.

1. Về hệ thống miễn nhiễm

Các *Metazoa* và thực vật có các cơ chế phức tạp để chống lại các tác nhân gây bệnh và kí sinh. Phản ứng miễn nhiễm ở động vật có xương bậc cao được thực hiện do hệ thống phức tạp, trong đó có sự tương tác của các tế bào và phân tử **độc hiệu** (specific) và **không độc hiệu** (non-specific) bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân gây nhiễm. Một số động vật không xương sống và thực vật có hệ thống bảo vệ giống sự bảo vệ không đặc hiệu ở động vật có

xương sống, mặc dù các thực vật cho thấy có sự đa dạng đáng kể trong các phản ứng chống lại sự nhiễm bệnh.

Các **cơ chế miễn nhiễm không đặc hiệu** hình thành hàng rào bảo vệ đầu tiên chống lại các vi sinh vật gây bệnh. Nhờ đó sự **miễn nhiễm đặc hiệu** có đủ thời gian để hình thành. Các sản phẩm của các hệ thống miễn nhiễm đặc hiệu của động vật có vú tác động chủ yếu bằng sự **kích thích các tế bào hành động không đặc hiệu** (non-specific effectors cells). Các tương tác phức tạp đó có thể tổng kết như sau :

Macrophage tác động với tư cách các **tế bào mang kháng nguyên** (antigen- presenting cells) đối với các **lymphocyte T hỗ trợ đặc hiệu** (helper T lymphocyte - T_H). Các macrophage này tạo ra **IL-1** (interkeuline-1) kích thích sự hoạt hóa của tế bào T_H . Các **tế bào T** được kích thích bởi kháng nguyên (antigen - stimulated T cells) sản sinh ra **IFN γ** (interferon γ), mà IFN γ lại làm tăng hoạt tính của macrophage và **tế bào sát thủ tự nhiên NK** (natural killer cell).

Thêm vào đó, các **tế bào T_H** sản xuất ra **IL-2** làm tăng hoạt tính của các **tế bào NK** và **IL-3**, mà nó lại làm tăng số lượng của các **thực bào** (phagocytic cells) trong máu và làm tăng số lượng cũng như hoạt tính của các tế bào mỡ trong mô. **Tế bào helper T** cũng sản sinh ra **IL-4** và **IL-5** để tăng số lượng và hoạt tính của các tế bào mỡ và eosinophil tương ứng. Các hoạt tính nêu trên có vai trò quan trọng trong sự miễn nhiễm chống các dạng kí sinh đa bào. Các immunoglobulin IgC và IgM được hoạt hóa bổ sung nhau, và như vậy kích thích **thực bào** (phagocytosis).

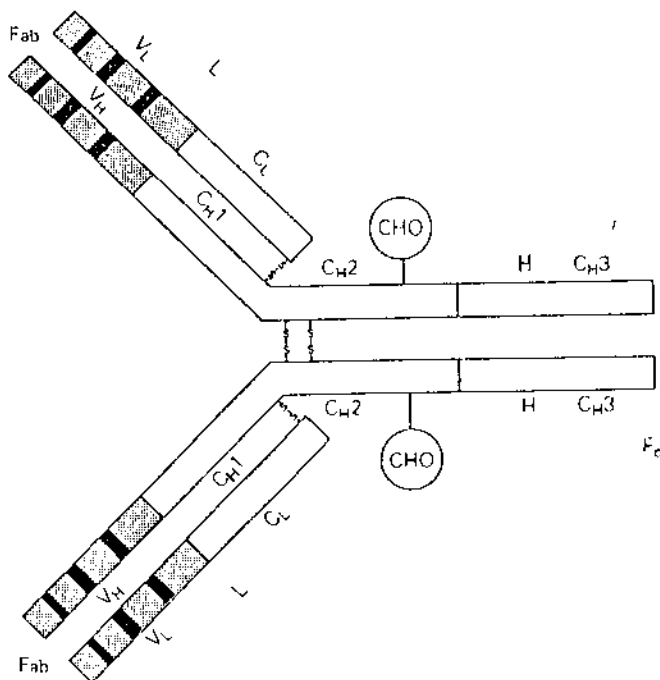
Hiệu quả của hệ thống trên được thấy rõ khi bị các bệnh **sai hỏng miễn nhiễm** như AIDS do **virus HIV** (human immunodeficiency virus) gây ra hậu quả nặng nề.

2. Cấu trúc và chức năng của các kháng thể

Các **kháng thể** (antibody), hay **immunoglobulin** (Ig), là các **glycoprotein** được tìm thấy trong dịch máu, trong các chất được tiết ra như nước bọt, nước mắt và dịch tiêu hóa. Phần lớn các phân tử kháng thể được tìm thấy ở phần **γ -globulin** của huyết tương (serum).

Ở người có 5 nhóm immunoglobulin : **IgM, IgG, IgA, IgE** và **IgD**. Chúng khác nhau về cấu trúc, sự phân bố và các đặc tính sinh học. IgA quan trọng hơn vì là kháng thể được tiết ra bảo vệ bề mặt bên ngoài của cơ thể. IgG và IgM có nhiều trong máu, thực hiện chức năng bảo vệ thể dịch chống vi khuẩn.

Việc tìm hiểu cấu trúc của IgG giúp hiểu rõ về cấu trúc của các phân tử kháng thể. Phân tử IgG là glycoprotein có trọng lượng phân tử $M = 150.000$. Nó gồm có 4 mạch polypeptide: 2 mạch nặng tương tự H (heavy chain, $M = 50.000$) và 2 mạch nhẹ tương tự nhau L (light chain, $M = 25.000$). Các mạch gắn nhau nhờ các cầu nối disulphide (hình 17.9).



Hình 17.9. Sơ đồ cấu trúc của phân tử IgG

H- mạch nặng ; L- mạch nhẹ ; C- cố định (constant);
Fab- vùng kháng thể đặc hiệu ; V- biến đổi (variable)

Các kháng thể được tiết ra từ các tế bào bắt nguồn từ lymphocyte B, hình thành qua chọn lọc dòng (clonal selection) dưới tác động đặc hiệu của xác định thể kháng nguyên (antigenic determinant). Tất cả các phân tử kháng thể đặc hiệu được sản sinh ra do 1 loại tế bào plasma đặc hiệu. Sự đặc hiệu của kháng thể do trình tự các gốc amino acid của vùng Fab độc nhất cho mỗi kháng thể. Mặt khác, tất cả các phân tử IgG gây nên sự loại bỏ các immunogen bằng một số cách hạn chế sau khi gắn vào chúng. Như vậy, phân tử kháng thể có 2 phần: phần giống và phần khác với các phân tử kháng thể tạo ở tế bào khác.

Tất cả các loại kháng thể cũng có cấu trúc căn bản theo mô hình 4 mạch như IgG mặc dầu có nhiều điểm khác nhau ở mạch nặng, mạch nhẹ và mức độ glycosil hóa (glycosilation).

3. Sự xác định di truyền các immunoglobulin

Mỗi một mạch nặng hay mạch nhẹ của immunoglobulin là sản phẩm của một vài *gen gián đoạn* trong tế bào dòng phôi. Trong quá trình phát triển của *tế bào B ở tủy sống* (bone marrow), các gen này tái cấu trúc lại bởi các quá trình *splicing*, *mất đoạn* (deletion) và *nối lại* (rejoining). Quá trình này được mô tả trên hình 17.10 đối với các gen mã hóa mạch nặng, nhưng quá trình cũng xảy ra tương tự ở mạch nhẹ. Các gen mã hóa cho các vùng biến đổi của immunoglobulin ở người gồm *vài trăm gen* mã hóa cho trình tự khác nhau của vùng V và một số lớn khác mã hóa cho vùng D và J (bảng 17.2) và một nhóm gen mã hóa cho vùng *cố định* (C).

BẢNG 17.2. Số lượng các gen dòng mã hóa cho các vùng biến đổi của immunoglobulin ở người.

Polypeptide	V	D	J
Mạch nặng	> 300	10 – 20	6
Mạch nhẹ κ	200	—	5
Mạch nhẹ λ	< 100	—	5

Lô các *gen nối J* (joining) và lô các *gen đa dạng D* (diversity) và các *gen biến đổi V* (variable) được nêu trên hình 17.10. Cần phân biệt các gen V, D, J với các polypeptide tương ứng. Các gen D không có ở đoạn mã hóa mạch nhẹ.

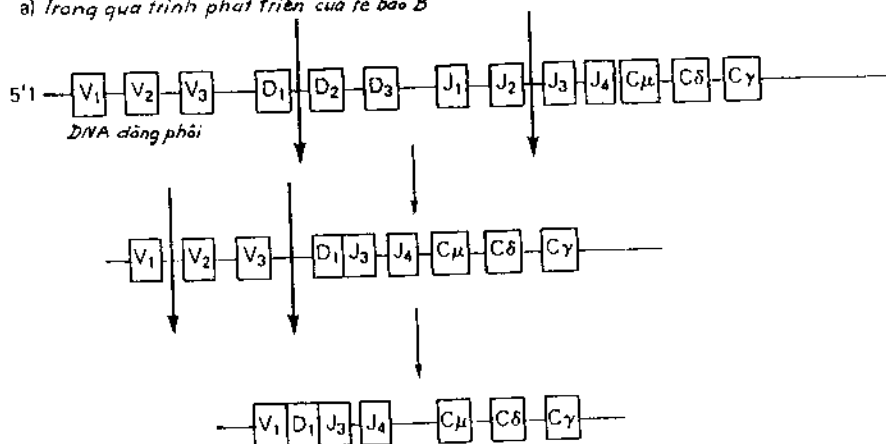
Sự cấu trúc lại thực hiện nối 1 gen D vào 1 gen J và sau đó DJ nối với một gen vùng V và DNA ở giữa bị loại khỏi tế bào. Đây là trường hợp *mất đoạn DNA* của bộ gen ở tế bào chuyên biệt trong quá trình phát triển. Sự kết hợp ngẫu nhiên của bất kì exon V nào với bất kì J hay J-D được gọi là *chuyển đoạn tổ hợp* (combinational translocation). Sự cấu trúc lại của V, D và J sẽ xác định tính đặc hiệu của phân tử kháng thể, biểu hiện ở màng tế bào. Như vậy, tế bào B trưởng thành có khả năng sản xuất kháng thể với tính *đặc hiệu độc nhất*, mặc dù vài nhóm immunoglobulin có thể được tạo ra.

Sự đánh giá số lượng các cấu phần của immunoglobulin ở chuột cho thấy sự đa dạng của các phân tử kháng thể lớn đến mức có thể đạt được $2,7 \times 10^8$ phân tử kháng thể khác nhau.

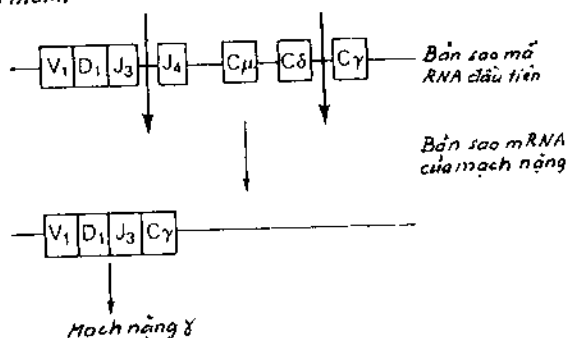
Các *thụ thể của tế bào T* (T-cell receptor) cũng có sự đa dạng được tạo ra do *cấu trúc lại* các sản phẩm của V, D và J trong quá trình phát triển. Mỗi lymphocyte T trưởng thành biểu hiện ra các *thụ thể đặc hiệu* đối với 1 loại kháng nguyên.

Tóm lại, sự xác định di truyền đối với việc tạo thành các phân tử kháng thể đặc hiệu là cơ chế phức tạp được hình thành trong quá trình phát triển cá thể. Ở đây thể hiện sự biến động bộ gen ngay trong quá trình phát triển và có sự **mất đoạn DNA** trong phát triển cá thể.

a) Trong quá trình phát triển của tế bào B



b) Tế bào B trưởng thành



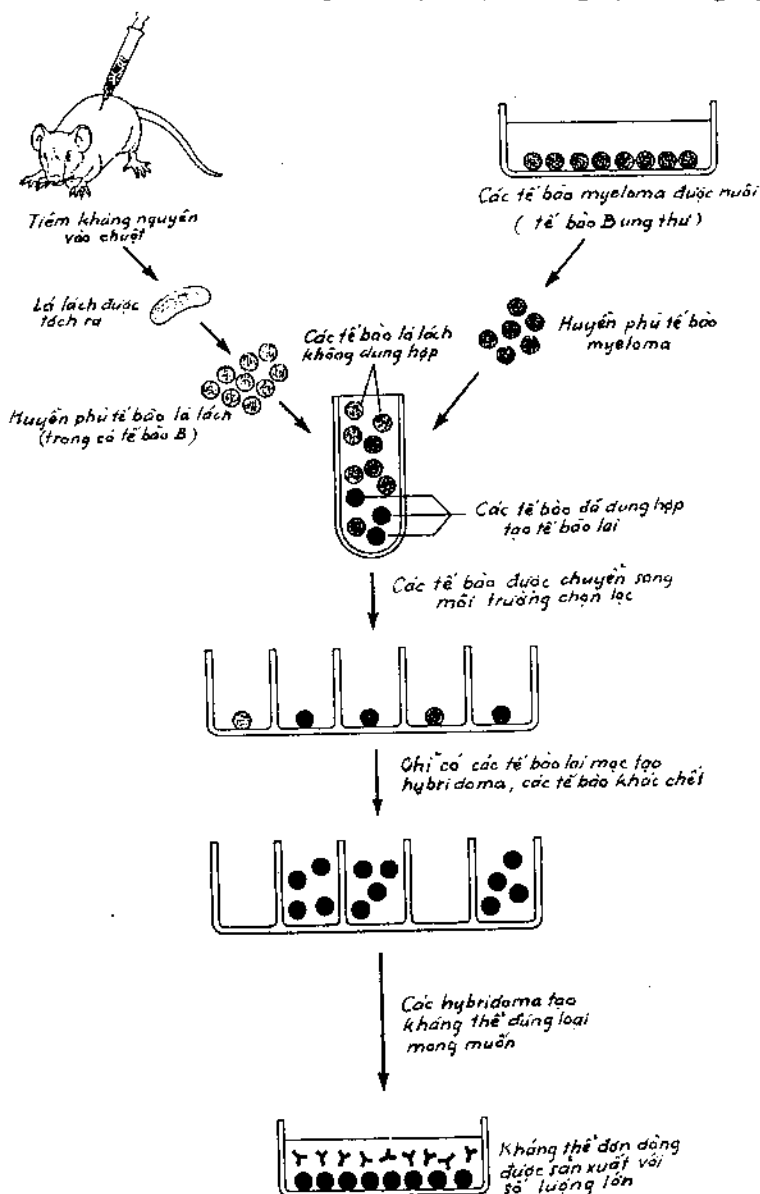
Hình 17.10. Cấu trúc lại trong các gen mạch nặng của immunoglobulin

a) DNA ở các lymphocyte đầu tiên của dòng phôi chứa cấu trúc lại. Các tế bào có vài trăm gen mà mỗi gen mã hóa cho một trong các trình tự dao động khác nhau của mạch nặng (trên hình chỉ nêu tượng trưng 3). D, J và C tương ứng với đa dạng (diversity), nối (joining) và cố định (constant). Trong quá trình phát triển của tế bào B, gen D nối với gen J bằng splicing ngẫu nhiên và nối lại. Với cách tương tự, một đoạn của vùng gen V nối với đoạn cấu trúc lại DJ.

b) Trong tế bào B trưởng thành, tính đặc hiệu của kháng thể được xác định bởi trình tự đã cấu trúc lại. Sự splicing tiếp sau của bản phiên mã RNA đầu tiên và nối lại với vùng cố định đơn của gen có thể hạn chế tế bào chỉ sản xuất một nhóm **immunoglobulin duy nhất**.

4. Các kháng thể đơn dòng (*Monoclonal antibodies*)

Các kháng thể đơn dòng là những sản phẩm của một dòng tế bào bạch cầu (plasma cell) bắt nguồn từ một dòng tế bào được kích thích. Khi tiêm một kháng nguyên vào chuột, kháng nguyên sẽ kích thích **phản ứng miễn nhiễm đặc hiệu** tạo dòng tế bào B có kháng thể đặc hiệu chống lại kháng nguyên.



Hình 17.11. Quá trình tạo hybridoma để nhận kháng thể đơn dòng

Nhưng dòng tế bào bình thường tạo kháng thể đặc hiệu sẽ chết sau một thời gian nuôi cấy. Trong khi đó tế bào myeloma (tế bào bạch cầu ung thư) có khả năng sinh sản vô hạn, nhưng không tạo kháng thể đặc hiệu. Từ năm 1975, kĩ thuật tạo **hybridoma** ra đời tạo nên cuộc cách mạng trong sản xuất các kháng thể đơn dòng. Hybridoma, được tạo ra khi lai một tế bào bạch cầu tạo kháng thể đặc hiệu với tế bào myeloma, có khả năng **sinh sản vô hạn** (nhận từ tế bào myeloma) và tiết ra kháng thể đặc hiệu (nhận từ tế bào bạch cầu) (hình 17.11).

Các kháng thể đơn dòng có nhiều ứng dụng thực tiễn như chẩn đoán và trị các bệnh nhiễm trùng, dùng trong các thử nghiệm miễn nhiễm và tinh sạch protein.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Ngoài các loại biến dị di truyền từ các thế hệ trước, bộ gen có thể biến đổi trong quá trình phát triển cá thể do **tái tổ hợp tương đồng**, **tái tổ hợp điểm chuyên biệt** và **transposition**. Phần lớn các dạng tái tổ hợp liên quan đến đứt và nối các đoạn DNA do các enzyme khác nhau xúc tác phản ứng. **RecA protein** giữ vai trò chủ yếu trong tái tổ hợp tương đồng. Có nhiều hệ thống tái tổ hợp ở điểm chuyên biệt trong tế bào với sự tham gia của nhiều loại enzyme **recombinase** như **integrase**, **resolvase**. Sự di chuyển vị trí của gen có thể được thực hiện do **transposition**. Transposition gồm các loại: IS, sao chép và không sao chép và retrotransposition (qua trung gian RNA).

Hệ thống miễn nhiễm gồm nhiều cơ chế phức tạp bảo vệ cơ thể khỏi sự gây nhiễm do nhiều loại tác nhân khác nhau. Các cơ chế di truyền đã xác định được **sự đa dạng** của các phân tử immunoglobulin, mà mỗi loại phân tử có tính đặc hiệu độc nhất tương ứng với kháng nguyên. Cơ chế di truyền này có thể coi là một ví dụ điển hình cho thấy **sự biến động** của bộ gen trong quá trình phát triển cá thể và là trường hợp duy nhất có **sự mất đoạn DNA** (không ngẫu nhiên) trong phát triển cá thể.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày các đặc điểm chủ yếu của tái tổ hợp tương đồng.
2. Phân tích sự giống nhau và khác nhau giữa các mô hình giải thích cơ chế phân tử của tái tổ hợp tương đồng.
3. Hãy phân tích cho thấy tái tổ hợp điểm chuyên biệt là hiện tượng phổ biến trong thiên nhiên.

4. Phân tích những điểm giống nhau và khác nhau giữa tái tổ hợp tương đồng và tái tổ hợp ở điểm chuyên biệt.
5. Hãy nêu các ví dụ về tái tổ hợp chuyên biệt xảy ra trong quá trình phát triển cá thể.
6. Khi phát hiện ra transposition, có người cho rằng DNA có tính chất "lưu động" (fluidity). Giải thích vì sao có thể nói như vậy?
7. Phân tích sự giống nhau và khác nhau giữa các kiểu transposition.
8. Các trình tự lặp lại đảo ngược có vai trò gì trong transposition?
9. Các interleukine (IL) có vai trò gì trong cơ chế miễn nhiễm?
10. Cơ chế di truyền nào dẫn đến tạo ra rất nhiều loại kháng thể mà mỗi cái có tính đặc hiệu chuyên biệt cho một loại kháng nguyên?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Số lượng các gen dòng phôi (germ-line) mã hóa cho các vùng biến đổi của immunoglobulin ở chuột như sau :

Polypeptide	V	D	J	V-D	D-J
Mạch nặng H	250	10	4	3	3
Mạch nhẹ k	250	3	4		

Hãy tính số loại phân tử kháng thể tối đa có khả năng được tạo ra từ sự tổ hợp của các gen nói trên.

Bài giải

Các mạch L kiểu k có 250V, 4J và 3D ; tổng cộng số các mạch L kiểu k = $250 \times 4 \times 3 = 3000$.

Mạch nặng H có 250V, 10D, 4J, 3V-D và 3D-J; tổng cộng số mạch nặng H = $250 \times 10 \times 4 \times 3 \times 3 = 90.000$.

Sự kết hợp theo kiểu tổ hợp giữa 3000 mạch L với 90.000 mạch H = $3000 \times 90.000 = 2,7.10^8$ loại kháng thể tối đa được tạo ra từ sự tổ hợp các gen immunoglobulin.

Số nêu trên thấp hơn so với thực tế vì chưa tính đến các mạch nhẹ kiểu λ, các đột biến soma có thể xảy ra trên các mạch.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Các proto-oncogene của tế bào thường có intron; các oncogene ở virus không có :

a) Nêu giả thuyết giải thích nguồn gốc oncogene ở virus.

b) Vì sao có nhiều khả năng hơn là oncogene bắt nguồn trong tế bào, chứ không ở virus ?

2. Bảng sau ghi nhận các kiểu hồi biến (reversion) của dãy các đột biến *gal* ở operon *gal* của *E. Coli*. Dấu + chỉ tần số hồi biến cao, dấu - chỉ không có hồi biến và "thấp" chỉ tần số hồi biến thấp.

Đột biến	Hồi biến				
	Ngẫu nhiên	2-amino -purine	ICR 191	UV	EMS
<i>gal-1</i>	-	-	+	+	-
<i>gal-2</i>	-	-	+	-	-
<i>gal-3</i>	thấp	thấp	thấp	thấp	thấp
<i>gal-4</i>	-	-	-	-	-
<i>gal-5</i>	thấp	+	thấp	+	+

a) Đột biến nào có nhiều khả năng do bị xen đoạn của các phần tử di động (transposable element) ? Vì sao ?

b) Có thể nêu các đột biến khác thuộc loại này không ?

3. Các phần tử di động được gọi là các gen nhảy, vì chúng di chuyển từ chỗ này sang chỗ khác. Khi đã biết cơ chế của transposition, thuật ngữ "gen nhảy" thích hợp như thế nào đối với các phần tử di động ở vi khuẩn ?

4. Khi ông Rhoades lấy phấn hoa từ túi phấn của cây có sắc tố đều có kiểu gen a_1a_1DtDt và thụ phấn cho cây cái dùng thử nghiệm (tester) a_1a_1dtdt , ông thấy có hạt màu đều và một ít hạt dốm. Giải thích nguồn gốc của cả hai loại hạt. (Chú thích : Allele A_1 có màu (sắc tố), a_1 không màu ; Dt (dotted) tạo dốm trên kiểu hình a_1a_1 không sắc tố, và dt không tạo dốm.

DI TRUYỀN HỌC TIẾN HÓA

Sự kết hợp *học thuyết tiến hóa cổ điển* của Darwin với *di truyền học* đã tạo nên bước phát triển mới trong nghiên cứu sự tiến hóa. Thứ nhất, biến đổi tiến hóa chỉ có được khi có sự *biến đổi kiểu gen của quần thể*, tập hợp của nhiều cá thể cùng loài. Quần thể là *đơn vị tiến hóa*. Thứ hai, biết rõ về *các loại biến dị*, cơ chế và vai trò của chúng đối với tiến hóa. Thứ ba, hiểu rõ về các kiểu và cơ chế *tác động của chọn lọc*. *Sự tiến hóa thích nghi* là kết quả tác động đồng thời của các nhân tố tiến hóa lên quần thể.

Sinh học phân tử góp phần tích cực cho sự hiểu biết *cơ chế phân tử* của sự tiến hóa và *sự tiến hóa của gen*.

I. DI TRUYỀN HỌC QUẦN THỂ

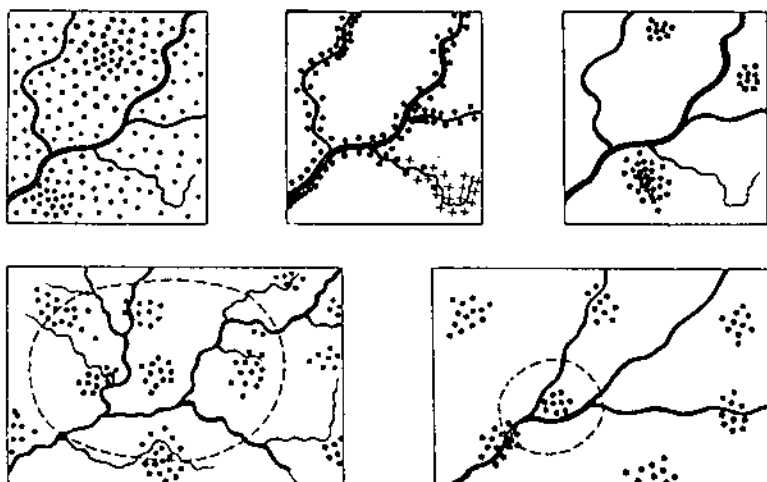
Darwin là người đầu tiên có *quan điểm quần thể trong tiến hóa* và thúc đẩy sự phát sinh ý niệm quần thể trong sinh học. Di truyền học đã làm sáng tỏ *quần thể* là *đơn vị tiến hóa cơ sở*, nơi diễn ra các *biến đổi tiến hóa đầu tiên*.

1. Quần thể (Population)

a) Định nghĩa

Giữa cá thể và loài tồn tại một *mức tổ chức trung gian* có tầm quan trọng đặc biệt đối với tiến hóa, đó là *quần thể*. Việc nghiên cứu các quần thể tự nhiên trở thành công việc chủ yếu của nhiều bộ môn sinh học: di truyền học, sinh thái học và phân loại học.

Thuật ngữ "*quần thể*" được dùng theo một số nghĩa khác nhau. Các nhà sinh thái học có thể nói về quần thể sinh vật nổi của một hồ nước, ngụ ý là dùng chữ *quần thể* để chỉ một *tập hợp nhiều cá thể* của những loài khác nhau. Khi nói về quần thể người thì có nghĩa là nói về một tập hợp các cá thể của một loài. Đó là loài người. Trong trường hợp này thuật ngữ dùng đúng. Hiện nay người ta giới hạn việc sử dụng thuật ngữ quần thể trong sinh học, *thường dùng để chỉ một quần thể địa phương* tức một *tập hợp những cá thể có thể giao phối với nhau*, sống ở một địa phương nhất định. Loài gồm nhiều quần thể địa phương, mỗi quần thể có sự tách biệt nào đó, nhưng đồng thời có mối quan hệ qua lại với nhau (hình 18.1).



Hình 18.1. Sơ đồ vùng phân bố các cá thể của một loài

(Các chấm đen là cá thể, chúng phân bố thành những nhóm riêng là các quần thể.
Vòng tròn chỉ tầm hoạt động của cá thể)

Quần thể có thể được định nghĩa như sau :

"Quần thể là tập hợp các cá thể của một loài nhất định trong một thời gian tương đối dài (số lớn thế hệ), sống trên một lãnh thổ nhất định trong đó thật sự diễn ra giao phối tự do, bên trong nó không có chướng ngại rõ rệt và tách riêng với các quần thể lân cận ở mức độ cách li ít nhiều" (Theo I-a-blô-cốp)

Quần thể không phải là một nhóm cá thể cùng loài được tập hợp lại một cách ngẫu nhiên mà là một **đơn vị tồn tại** của loài trong tự nhiên, có một **lịch sử phát triển lâu dài**. Quần thể còn là **đơn vị sinh sản của loài**. Trong loài sinh sản hữu tính, đơn vị sinh sản nhỏ nhất là một cá thể lưỡng tính tự phối hoặc một cặp cá thể đơn tính giao phối, nhưng trên quan điểm tiến hóa quần thể mới là đơn vị sinh sản của loài.

Về mặt **sinh thái** quần thể được đánh giá qua các đặc điểm như khu phân bố, số lượng cá thể, mật độ cá thể, thành phần tuổi, thành phần giới tính.

b) Khả năng tiến hóa độc lập

Loài và quần thể có 2 đặc điểm căn bản có ý nghĩa quan trọng đối với sự tiến hóa:

- *Tồn tại trong một thời gian không hạn định.*
- *Có khả năng phát triển tiến hóa độc lập.*

Các cá thể sinh vật do mức phát triển và cấu tạo di truyền có thể tồn tại từ vài phút đến vài nghìn năm rồi chết. Ngược lại cấu trúc của loài không có nhân tố nào giới hạn sự tồn tại của nó trong một thời gian nhất định. Do có nhiều cá thể, một số già chết đồng thời với số trẻ phát triển lên và **sự sinh sản đảm bảo nối tiếp nhiều thế hệ**. Dĩ nhiên, sự biến đổi của môi trường sớm muộn sẽ làm cho loài bị diệt vong hoặc có biến đổi tiến hóa.

Thời gian tồn tại không hạn định của loài và quần thể là cơ sở để chúng **biến đổi tiến hóa**.

Cần nhấn mạnh rằng trong các mức tổ chức của sự sống thì quần thể và loài là các mức có khả năng làm **trường hoạt động cho chọn lọc tự nhiên**. Các đại phân tử, tế bào, cơ thể sinh học, là những hệ thống chặt chẽ. Các thành phần cấu trúc của chúng gắn chặt với nhau đến mức chọn lọc tự nhiên khó tác dụng được. Ví dụ: sự thương tổn của nhân tế bào có thể làm tế bào hủy diệt nên không kịp biến đổi tiến hóa. Các thành phần riêng rẽ của quần thể thường không gắn chặt với nhau như vậy, nên **không cản trở chọn lọc** các nhóm hoặc các cá thể. Ví dụ: chọn lọc tự nhiên có thể hủy diệt số lớn cá thể nhưng số ít còn lại có thể phát triển tiến hóa thành quần thể mới. Tuy mối liên hệ không chặt, nhưng các cá thể của quần thể có sự phụ thuộc lẫn nhau làm thành một **hệ thống toàn vẹn**.

Tuy loài và quần thể có khả năng phát triển tiến hóa độc lập, nhưng khả năng này có được hiện thực hay không còn tùy thuộc các điều kiện cụ thể dưới tác động của chọn lọc tự nhiên. Loài có thể phát triển tiến hóa thành loài mới, nhưng cũng có khả năng bị diệt vong.

2. Vốn gen và quần thể cân bằng

a) Vốn gen của quần thể

Các nhà di truyền học nghiên cứu không phải quần thể của các cá thể, mà là **quần thể của các gen**. Các cá thể chết đi nhưng **gen được truyền lại, tất cả gen trong quần thể** tạo thành một **vốn gen** (genofond). Vốn gen này được xây dựng lại qua mỗi thế hệ.

Cá thể là một bể chứa tạm, trong đó tạm thời chứa một bộ phận nhỏ của vốn gen, nhờ đột biến nó có thể mang một hoặc hai gen mới. Nếu cá thể có một **tổ hợp gen** có khả năng sống và phát triển đặc biệt, nó có thể làm **tăng một ít tần số** của những gen nhất định trong vốn gen, nhưng nói chung sự đóng góp của nó rất nhỏ bé so với tổng hàm lượng chung của vốn gen.

Trong quần thể, các gen tác động qua lại bởi vô số các tổ hợp nhờ **giao phối tự do** và trao đổi các giao tử. Điều này dẫn đến tình trạng mỗi cá thể

có thể **tập trung phần lớn khả năng di truyền** của quần thể. Ở đây các **gen mới** và các **tổ hợp gen mới** trải qua những **thử thách**.

Một quần thể có khả năng thay đổi theo thời gian. Trạng thái động này của quần thể có một ý nghĩa sinh học thậm chí lớn hơn vai trò của nó trong một thời gian nhất định nào đó. Đôi khi người ta định nghĩa **tiến hóa** như là "**sự thay đổi thành phần di truyền của quần thể**" (Dobzhansky, 1951). Những thay đổi di truyền như thế được biểu lộ ra trong kiểu hình (phenotype) bằng các con đường khác nhau, và việc nghiên cứu về những thay đổi kiểu hình này đã được dùng làm cơ sở cho phần lớn các thuyết tiến hóa và những giả thuyết về hình thành loài.

b) Quần thể cân bằng

Nếu xét quần thể về mặt sinh thái qua các đặc điểm như khu phân bố, số lượng và mật độ cá thể, tuổi thọ, giới tính thì rất phức tạp, nên các nhà di truyền học nghiên cứu **quần thể của các gen** tức tính **tần số của các allele** (số % allele) trong quần thể. Để dễ nghiên cứu hơn nữa các nhà di truyền học đã trừu tượng hóa thêm một bước: nêu ra khái niệm "**quần thể cân bằng**" với các điều kiện như sau:

– **Số lượng cá thể lớn** (tránh dao động ngẫu nhiên).

– Xảy ra **giao phối tự do** và **ngẫu nhiên**, có nghĩa là các cá thể có kiểu gen và kiểu hình khác nhau có thể gặp nhau một cách ngẫu nhiên và giao phối không có chọn lọc.

– Các loại giao tử đều có sức sống và được thụ tinh như nhau. Các loại hợp tử đều có **sức sống như nhau**.

– **Không chịu tác động** ở bên trong cũng như từ ngoài vào, cụ thể là **không xảy ra đột biến, không có chọn lọc** và cũng **không di nhập gen**.

3. Phương trình Hardy - Weinberg

Một **quần thể cân bằng** như trên là "lý tưởng" và không có trong thực tế, nhưng nó giúp cho việc nghiên cứu được dễ dàng. Bước tiếp theo là xét sự di truyền của **một gen đơn giản nhất** gồm 2 allele. Ví dụ : A và a. Các kiểu gen được xác định theo tần số tức **tỉ lệ phần trăm** căn cứ theo nhóm chọn, tức một số ít cá thể đại diện chung cho quần thể.

Ví dụ đối với một gen có 2 allele là A và a thì trong quần thể có tối đa 3 kiểu gen AA, Aa và aa, với số lượng cá thể tương ứng là n_1 (AA), n_2 (Aa), n_3 (aa). Tổng số cá thể :

$$n_1 + n_2 + n_3 = N$$

Mỗi loại cá thể sẽ chiếm một tỉ lệ nhất định.

$$\frac{n_1}{N} = x \quad \frac{n_2}{N} = y \quad \text{và} \quad \frac{n_3}{N} = z$$

x, y, z là tỉ lệ số cá thể AA, Aa và aa trong quần thể, tương ứng ta sẽ có:

$$x + y + z = 1 \text{ tức } 100\%$$

Các allele A và a sẽ chiếm một tỉ lệ nhất định trong quần thể, chúng ta gọi p là tần số allele A và q là tần số allele a.

$$p + q = 1$$

Do quá trình giao phối xảy ra tự do và ngẫu nhiên nên ta sẽ có kết quả lai trong quần thể như sau :

♀ \ ♂	p giao tử A	q giao tử a
pA	p^2 AA	pq Aa
qa	pq Aa	q^2 aa

Kết quả ta có phương trình :

$$p^2 AA + 2pq Aa + q^2 aa = 1$$

Phương trình này được tìm ra năm 1908 đồng thời do nhà toán học Anh G.Hardy và một bác sĩ người Đức V.Weinberg nên còn được gọi *quy luật Hardy - Weinberg* và có thể phát biểu như sau : "Trong một quần thể có số lượng lớn, giao phối tự do và ngẫu nhiên ở vào thế cân bằng, không có chọn lọc cũng không có đột biến, thì tần số allele không thay đổi từ đời này qua đời khác."

Nếu lúc đầu, tần số kiểu gen chưa đạt cân bằng thì ở thế hệ sau hoặc qua vài thế hệ sẽ đạt được. Nếu coi số liệu trên là của thế hệ T, các thế hệ tiếp theo cũng có tần số allele A và a tương tự. Trường hợp đối với gen có 3 allele thì công thức sẽ là :

$$pa_1 + qa_2 + ra_3 = 1$$

và

$$p^2 a_1 a_1 + 2pqa_1 a_2 + q^2 a_2 a_2 + 2qra_2 a_3 + 2pra_1 a_3 + r^2 a_3 a_3 = 1$$

Với 3 allele chúng ta thấy có 6 kiểu gen, nếu số allele nhiều hơn nữa số kiểu gen sẽ tăng đáng kể.

Phương trình này đúng cả cho các gen *trội, lặn, di truyền tương đương*. Trường hợp *liên kết với giới tính* thì qua nhiều thế hệ sẽ đạt sự cân bằng.

Lúc mới tìm ra người ta chưa hiểu hết ý nghĩa của phương trình trên, về sau này mới xác định được đây là *phương trình căn bản* để nghiên cứu di truyền học quần thể.

Căn cứ vào tỉ lệ kiểu gen đồng hợp tử lặn aa có biểu hiện kiểu hình, ta có thể suy ra *tần số của các kiểu gen khác*. Ví dụ : Bệnh dư phenylalanine (phenylketoruria) xuất hiện với tần số 1 trên 25.000 người. Bệnh do 1 gen lặn nên ta có :

$$q^2 aa = 1/25.000 \rightarrow q = \sqrt{1/25000} = \frac{1}{159}$$

$$\text{Vậy : } pAA = 1 - q = \frac{158}{159} \text{ và}$$

$$2pq = 2 \times \frac{1}{159} \times \frac{158}{159} = \frac{316}{25.000}$$

Dựa vào *kiểu gen aa*, có thể xác định tỉ lệ các kiểu gen khác. Đồng thời, kết quả trên còn cho thấy tuy có 1 người mắc *bệnh* nhưng 316 người có *mang gen bệnh* ở dạng dị hợp tử Aa. Điều này nói lên rằng tần số allele trong quần thể dù nhỏ đến đâu, chúng không tự nhiên mất đi mà được duy trì từ thế hệ này sang thế hệ khác.

Sự di truyền theo Mendel cho thấy *đột biến dù có tần số nhỏ vẫn được duy trì* trong quần thể.

Ngoài ra phương trình còn giúp xác định xem những dấu hiệu nào trong quần thể ở trạng thái cân bằng do không bị tác động đáng kể, dấu hiệu nào bị tác động. Phương trình cũng cho thấy *sự đa dạng và phức tạp* của các kiểu gen trong quần thể.

Tóm lại, việc khẳng định vai trò cấu trúc cơ sở trong tiến hóa của quần thể là một đóng góp lớn của di truyền học cho học thuyết tiến hóa. Các quá trình di truyền trong quần thể có thể theo dõi đánh giá, có thể xác định được tần số các allele.

Quần thể với một vốn gen nhất định, trong đó quá trình lai giữa các cá thể làm cho nó thành một *thể thống nhất*. Quá trình tiến hóa *bắt đầu* bằng những biến đổi di truyền *trong quần thể*, nó dẫn đến sự *thay đổi tần số tương đối của các allele* những gen điển hình của quần thể.

II. BIẾN DỊ

Darwin cho rằng các cá thể của quần thể cùng có một kiểu di truyền ít nhiều giống nhau và một số nhỏ các biến dị hiếm hoi. Hiện nay, di truyền học đã chứng minh rằng các quần thể tự nhiên chứa một số lượng biến dị di truyền đáng kể. Điều đó cho thấy sự *ngẫu nhiên* đóng vai trò tinh vi hơn như Darwin giả thiết. Nhờ những thành tựu của sinh học phân tử, các nhà sinh học hiểu rõ hơn *nguồn gốc* của biến dị di truyền, *phương thức duy trì* chúng trong quần thể, cùng *vai trò* của chúng trong biến đổi tiến hóa.

1. Biến dị cá thể và hiện tượng đa hình

Xuất phát từ quan điểm tiến hóa, người ta có thể phân ra hai kiểu biến dị sinh học : *biến dị nhóm* được hiểu như là sự khác nhau giữa các quần thể và *biến dị cá thể* được hiểu là sự khác nhau giữa những cá thể của một quần thể.

a) Biến dị cá thể

Không có hai cá thể hoàn toàn giống nhau ở loài sinh sản hữu tính. Cái làm cho nhà tiến hóa quan tâm trước hết không phải *biến dị* đó như thế nào, mà là *ý nghĩa của nó*. Biến dị bên trong quần thể có thể phân thành biến dị *không di truyền* và biến dị *di truyền*. Nói chung, có thể nói rằng *biến dị không di truyền thích ứng cho cá thể*, trong khi đó *biến dị di truyền thì thích ứng cho quần thể*.

Biến dị không di truyền có nhiều loại : biến dị theo tuổi, biến dị theo mùa, biến dị các thế hệ, biến dị sinh cảnh,... thường mang tính chất thích nghi.

Biến dị di truyền là biến dị của kiểu gen. Một bộ phận đáng kể của biến dị này ảnh hưởng đến biến dị kiểu hình tức biến dị không di truyền. Biến dị di truyền thường được nhắc tới trong các nghiên cứu tiến hóa và chúng đóng *vai trò chủ yếu*.

b) Hiện tượng đa hình

Thuật ngữ "*hiện tượng đa hình*" (polimorphism) thường để chỉ tính *biến dị bên trong của một quần thể* nào đấy. Theo một định nghĩa đơn giản, đó là "sự có mặt của những kiểu hình khác nhau rõ ràng bên trong một quần thể thống nhất giao phối được với nhau". Hiện tượng đa hình phổ biến rộng rãi.

Sự đa hình có được trên cơ sở do tác dụng ít nhất của hai cơ chế. Cơ chế thứ nhất là *sự đa hình dị hợp tử*. Các cá thể dị hợp tử có kiểu gen Aa khi giao phối với nhau sẽ phân li tạo ra 3 kiểu gen AA, Aa và aa.

Cơ chế thứ hai là **sự đa hình thích nghi**. Trong trường hợp này hai hay nhiều dạng khác nhau được tồn tại do các điều kiện sống nhất định. Ví dụ: ở một số loài cỏ của đồng cỏ châu Âu có dạng nở hoa sớm, có dạng nở hoa muộn trong mùa hè.

Biến dị cá thể và hiện tượng đa hình là nguồn biến dị làm **nguyên liệu cho tiến hóa**. Bên cạnh đó còn có các cơ chế tạo nguồn biến dị, như quá trình đột biến, tái tổ hợp và sự duy trì biến dị bên trong quần thể.

2. Đột biến gen

Đột biến gen tạo ra các tính trạng mới cung cấp **nguyên liệu ban đầu** cho tiến hóa. Như vậy nó là **nhân tố tiến hóa** khi làm thay đổi tần số các allele.

a) Tần số đột biến

Đột biến thường xuyên xuất hiện ở các cá thể với tần số nhất định (ch.VIII). Tuy tần số xuất hiện đột biến của mỗi gen là rất nhỏ nhưng cá thể có nhiều gen nên có **số lượng đột biến là đáng kể**, đủ cung cấp nguyên liệu cho tiến hóa. Ví dụ : Ở ruồi giấm mỗi thế hệ có đến 25% giao tử chịu đột biến.

b) Ảnh hưởng đến mọi dấu hiệu

Đột biến ảnh hưởng đến mọi dấu hiệu của sinh vật như hình thái, sinh lí, sinh hóa, và cả tập tính. Chúng ảnh hưởng theo **mọi hướng**. Đột biến có thể làm tăng hay giảm mức độ biểu hiện của tính trạng.

Ví dụ : Ở ruồi giấm có đột biến như *vestigal* làm cánh cụt, đột biến khác *curly* làm tăng độ dài cánh - cánh vênh lên.

c) Ảnh hưởng đến các dấu hiệu sinh học quan trọng

Thử xét hai dấu hiệu sinh học quan trọng là **sức sống** tương đối của đột biến và khả năng **sinh sản**.

Đa số các đột biến có sức sống giảm, chỉ một số rất ít trường hợp là tăng sức sống. Tuy nhiên, nhiều đột biến ở trạng thái **dị hợp tử** có sức sống tăng và có thể có ưu thế. Ví dụ : Người mang gen hồng cầu hình liềm có khả năng đề kháng bệnh sốt rét, nên mật độ gen này cao ở một số vùng Châu Phi là nơi phổ biến bệnh này.

Ngoài ra trong quá trình giao phối các cá thể mang đột biến **tích lũy các gen biến đổi** làm tăng sức sống. Có nhiều đột biến ảnh hưởng đến **khả năng sinh sản** như ở bắp có đột biến làm hoa đực thành hoa cái và ngược lại.

Như vậy đột biến ảnh hưởng đến các dấu hiệu sinh học quan trọng có ý nghĩa trong tiến hóa.

d) Có mật độ nhất định trong các quần thể tự nhiên

Các cá thể của quần thể bề ngoài có kiểu hình giống nhau nhưng có **kiểu gen đa dạng**. Chetvericov là người đầu tiên phát hiện các quần thể tự nhiên chứa nhiều đột biến lặn ở trạng thái dị hợp tử. Ông cho các ruồi tự nhiên cận giao phối và phát hiện nhiều đột biến gây chết ở trạng thái lặn.

Mức độ dị hợp tử ở người trung bình là 6,7%. Nếu cho rằng ở người có 100.000 gen, sẽ có 6.700 gen dị hợp tử. Số gen dị hợp tử này sẽ tạo ra 2^{6700} tức 10^{2017} loại giao tử khác nhau. Số loại giao tử này lớn hơn rất nhiều số nguyên tử tạo nên vũ trụ mà ta biết (ở mức độ 10^{80}). Với sự đa dạng như vậy nên không lạ gì khi không có hai người giống hệt nhau (trừ sinh đôi cùng trứng). Sự đa dạng này trước hết do đột biến tạo nên các gen dị hợp tử, sau đó nhờ quá trình giao phối tức **tái tổ hợp** mới tạo ra **số lượng khổng lồ** các kiểu gen.

Như vậy các đột biến có **mật độ nhất định** trong quần thể, là nguồn cung cấp **nguyên liệu** cho tiến hóa.

e) Đột biến là nhân tố tiến hóa

Tần số đột biến xuất hiện ngẫu nhiên đối với đa số gen trong khoảng 10^{-4} - 10^{-7} , nhưng số lượng gen rất nhiều nên tính chung số lượng đột biến lớn tạo nên một **áp lực đột biến** nhất định trên quần thể.

Quá trình đột biến là một nhân tố tiến hóa, nó duy trì **mức không đồng nhất cao** của các quần thể tự nhiên. Vai trò của nó là cung cấp nguyên liệu cho quá trình chọn lọc tự nhiên.

Tuy nhiên, quá trình đột biến là **nhân tố ngẫu nhiên**, cung cấp nguyên liệu, nhưng bản thân nó **không đưa đến hình thành dấu hiệu mới**, vì đột biến mất dần trong sinh sản hữu tính. Ví dụ : Nếu cá thể mang đột biến không sinh sản được thì đột biến mất. Tính chung qua mỗi thế hệ sinh sản hữu tính, đột biến mất khoảng 1/3.

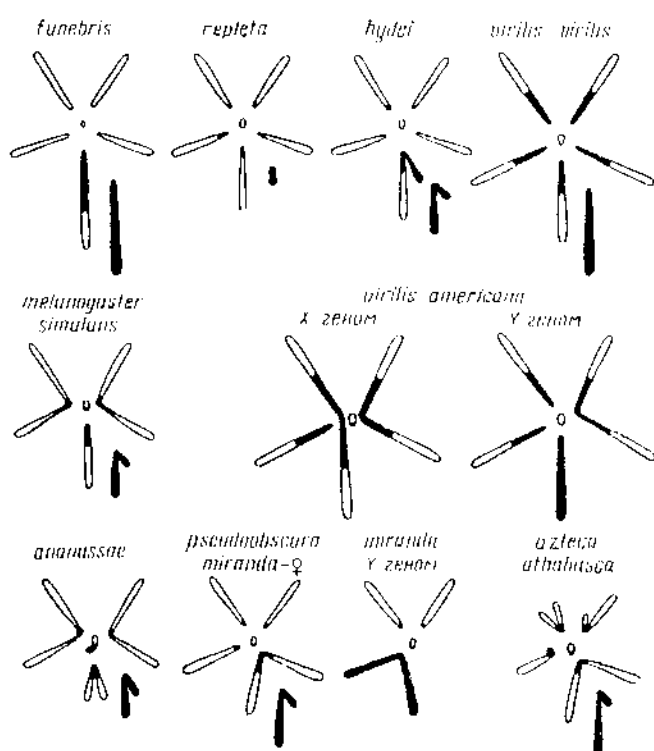
Ngoài ra tần số đột biến rất thấp, nên nếu thay đổi một tính trạng chỉ bằng đột biến phải cần thời gian rất dài.

3. Đột biến cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể

Các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể và sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể có ý quan trọng trong việc **hình thành loài**. Sự ngăn trở giao phối tự do, được gọi là **cách li**, là một nhân tố tiến hóa tạo điều kiện cho các quần thể

phân hóa thành loài. Sự cách li bằng các cơ chế di truyền học là quan trọng nhất. Các sai hỏng trong kiểu nhân thường dẫn đến kiểu hình giảm sức sống, bất thụ một phần hay hoàn toàn hoặc các dạng lai chết sớm.

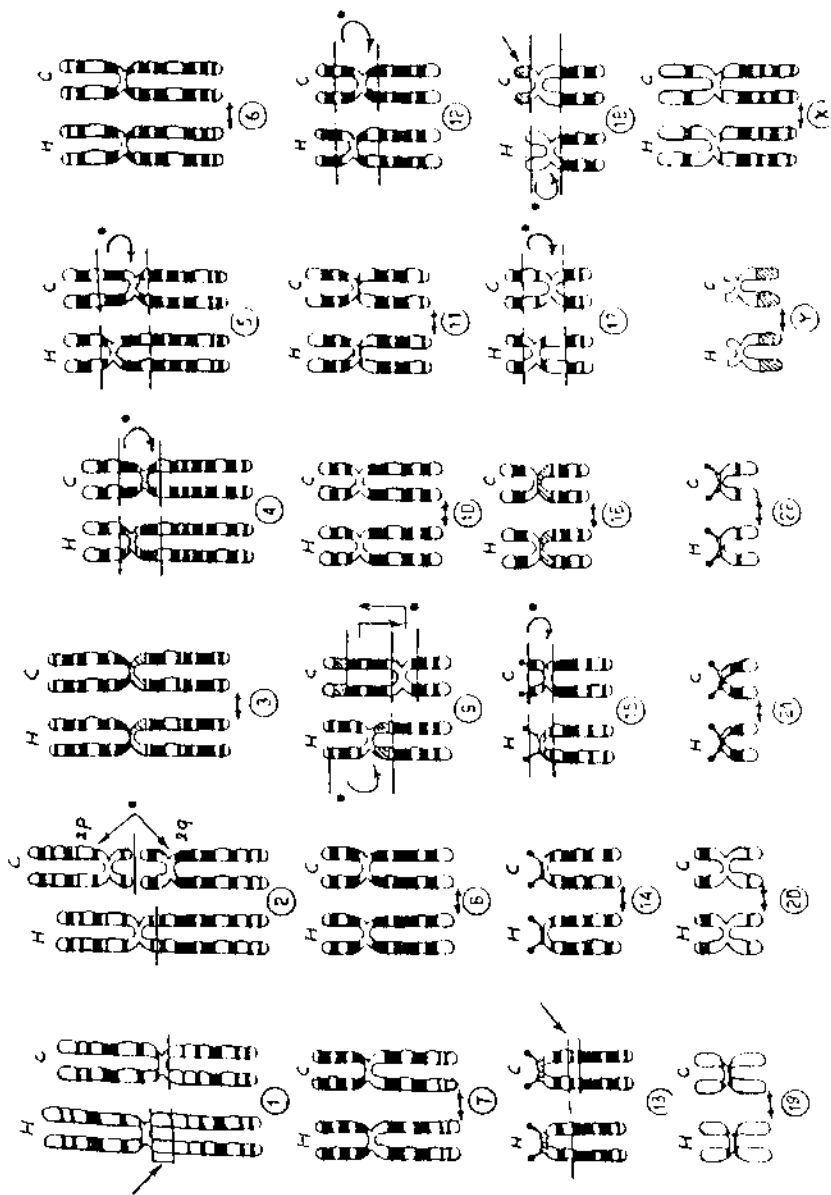
Ở *Drosophila*, nhiều loài gần nhau nhưng không giao phối lẫn nhau được do các biến đổi cấu trúc nhiễm sắc thể (hình 18.2). Những khác biệt nhiễm sắc thể này xuất hiện chủ yếu do chuyển đoạn hoán đổi thuận nghịch giữa các vai của nhiễm sắc thể hình que.



Hình 18.2. Bộ nhiễm sắc thể của các loài *Drosophila* gần nhau nhưng không lai với nhau

Hiện tượng tương tự cũng phổ biến ở nhiều loài khác.

Ngày nay, nhờ kĩ thuật nhuộm màu nhiễm sắc thể tiên tiến (chương IV), có thể theo dõi các **đoạn tương đồng** trong các dòng tiến hóa khác nhau. Hơn 120 trong số 200 loài của bộ *Primates* đã được nghiên cứu các đoạn nhiễm sắc thể tương đồng để xác định mối quan hệ họ hàng. Các nghiên cứu đã xác nhận nhiễm sắc thể thứ hai ở người được tạo ra do **chuyển đoạn Robertson** (chương IX) gắn hai loại nhiễm sắc thể lại với nhau (hình 18.3).



Hình 18.3. So sánh kiểu nhân của người và hắc tinh tinh (chimpanze) căn cứ vào các đoạn tương đồng.

Bên trái là của người (H) và bên phải của chimpanze (C).

Chú ý : Nhiễm sắc thể thứ 2 của người bắt nguồn từ 2 nhiễm sắc thể.

Sự xuất hiện các dạng **đa bội thể** cũng tạo ra cơ chế cách li. Nhiều loài trong tự nhiên hình thành dây đa bội thể như ở lúa mì, giống *Solanum* (khoai tây),... Các dạng đa bội thể chiếm tỉ lệ cao ở những vùng có điều kiện sống khắc nghiệt.

4. Tái tổ hợp

Trong di truyền học người ta có nói đến *biến dị tổ hợp* bao gồm sự tổ hợp tự do các gen theo kiểu Mendel và tái tổ hợp theo nghĩa hẹp khi có trao đổi chéo giữa 2 nhiễm sắc thể tương đồng. Ở cả hai trường hợp đều có sự sắp xếp lại các gen nên có người dùng chữ *tái tổ hợp* (recombination) theo nghĩa rộng chỉ quá trình sắp xếp lại gen do giao phối nói chung.

a) Tái tổ hợp là nguồn biến dị quan trọng nhất

Sự sắp xếp lại các gen do tái tổ hợp và sự phân li ngẫu nhiên của các nhiễm sắc thể *không làm thay đổi tần số gen*. Điều này tạo cảm giác dường như không gây hiệu quả tiến hóa. Tuy nhiên, *hiệu quả của tái tổ hợp* trong tiến hóa được coi là *quan trọng hơn quá trình đột biến* vì nó *làm phát sinh vô số các kiểu gen mới*. Nguồn biến dị di truyền căn bản của quần thể không do các đột biến mới xuất hiện ở mỗi thế hệ, mà do sự *tổ chức lại* các đột biến đã có từ trước bằng quá trình tái tổ hợp. Điều này là một bước tiến so với quan niệm của Darwin trước đây.

Chọn lọc tự nhiên *dựa vào* không phải "một gen trần trụi" mà là *kiểu hình* tức là sự biểu hiện của toàn bộ kiểu gen. Kiểu gen, đó là một tập hợp nhiều gen, còn *số tổ hợp* có thể có được từ một số ít gen là một con số khổng lồ. Loài (hay quần thể) với 1000 locus (gen), mỗi locus có 4 allele có thể tạo ra 4^{1000} kiểu giao tử, cho ra 10^{1000} kiểu gen lưỡng bội. Sự tạo thành một số lượng lớn các kiểu gen mới có ý nghĩa 2 mặt.

– Sự thay đổi các tổ hợp giữa các allele khác nhau có trong quần thể làm *thay đổi giá trị của allele này so với cái khác* và các tổ hợp khác nhau của các allele được chọn lọc thử thách.

– Điều quan trọng hơn là mỗi gen có *mối quan hệ tương hỗ* với các gen khác trong kiểu gen, hay nói cách khác mỗi gen đều *phụ thuộc vào nền di truyền* mà nó nằm trong đó. Các kiểu gen khác nhau có thể ảnh hưởng lên sự biểu hiện của một gen, ảnh hưởng này có thể rất khác nhau như từ chỗ có thể gây chết đến đảm bảo cho sự thích nghi cao độ. Do đó số lượng lớn của biến dị kiểu gen có ý nghĩa quyết định đối với tiến hóa.

Các *đột biến* là những sự kiện *hiếm hoi* và chỉ đóng góp *một số ít allele mới* vào dự trữ biến dị di truyền to lớn đã có sẵn. Chỉ có quá trình *tái tổ hợp duy trì* qua nhiều thế hệ trong một quần thể một đột biến nào đó bất kể nó có ích hay không. Có thể kết luận rằng một số lượng lớn các allele đã *được duy trì* trong một quần thể ngay cả khi chúng không liên quan với sự thích nghi tốt nhất.

Trong một quần thể sự xuất hiện các *allele có hại* ở một thời điểm nhất định chỉ có thể giải thích được khi giả thuyết rằng có những cơ chế đặc biệt đã can thiệp để duy trì sự đa dạng dù áp lực chọn lọc có xu hướng loại bỏ chúng.

Từ những điểm nêu trên, *tái tổ hợp* rõ ràng là nguồn quan trọng nhất của biến dị di truyền tức *nguồn cung cấp nguyên liệu quan trọng nhất cho chọn lọc*.

b) Ưu thế của sinh sản hữu tính

Những khả năng tạo ra nhiều kiểu gen khác nhau có thể được tăng lên một cách đáng kể nhờ *sinh sản hữu tính*.

Ví dụ : người có 46 nhiễm sắc thể tức 23 cặp. Qua phân bào giảm nhiễm tạo nên một số kiểu giao tử khác nhau bằng 2^{23} . Các giao tử được tạo thành có thể gặp nhau một cách ngẫu nhiên để thụ tinh tạo nên một số lượng hợp tử khác nhau lớn hơn 4^{23} ($4^{20} = 1.099.511.627.776$). Nếu kể cả tái tổ hợp do các gen dị hợp tử thì con số là 10^{2017} như phía trước đã nêu.

Sinh sản hữu tính tạo nên một *sự đa dạng di truyền quan trọng*, nó làm tăng đáng kể các khả năng tiến hóa trong tương lai của quần thể và cho phép một sự thích nghi đối với các biến động của môi trường cao hơn so với các loài sinh sản vô tính. Đó là lí do vì sao sinh sản hữu tính có tính phổ biến rộng trong thế giới sinh vật, chỉ trừ các sinh vật tiên nhân như vi khuẩn là những sinh vật có tốc độ sinh sản rất nhanh với số lượng cá thể lớn và các đột biến mới nhanh chóng được biểu hiện.

Sinh sản hữu tính giữ vai trò chủ yếu trong quá trình tiến hóa đối với các sinh vật có *thời gian thế hệ dài* như người, các cây cổ thụ,...

c) Sự duy trì biến dị trong quần thể

Tác động của chọn lọc tự nhiên hướng vào kiểu hình. Yếu tố nào làm giảm sự biểu hiện kiểu hình của các gen, sẽ tương ứng làm chúng khỏi bị tác động của chọn lọc. Tính *lưỡng bội* và *tái tổ hợp* của vật chất di truyền đảm bảo khả năng đa dạng để làm nhỏ độ biểu hiện của các gen ra trước tác động của chọn lọc. Do các cơ chế này, các *đột biến lặn* có hại không mất đi mà vẫn được duy trì trong quần thể. Chúng là nguồn *dự trữ biến dị* của quần thể và sẽ được huy động khi gặp điều kiện thuận lợi.

5. Tổng biến dị di truyền

Kiến thức về "số lượng" các biến dị hay *tổng biến dị di truyền* trong quần thể rất cần thiết cho việc nghiên cứu tiến hóa. Bởi vì sự mềm dẻo tiến

hóa của một loài phụ thuộc vào tổng biến dị di truyền. Thí nghiệm đã chứng minh rằng biến dị di truyền của quần thể càng lớn, tốc độ tiến hóa của nó càng nhanh. Tuy nhiên đánh giá biến dị di truyền (variability) là một công việc khó khăn đối với di truyền học cổ điển do **nhiều gen lặn** không có biểu hiện kiểu hình rõ ràng. Phân tích di truyền cổ điển bằng phương pháp lai là một công việc tốn nhiều công phu nhưng chỉ phát hiện được các allele khác nhau có biểu hiện kiểu hình. Hiện nay, chưa có khả năng phát hiện các allele không có biểu hiện kiểu hình và như vậy không có được mẫu phân tích đại diện thật sự cho tập hợp các gen.

Nhờ các tiến bộ của sinh học phân tử, khó khăn trong đánh giá tổng biến dị di truyền đã được giải quyết.

a) Sự đa hình (Polimorphism) sinh hóa

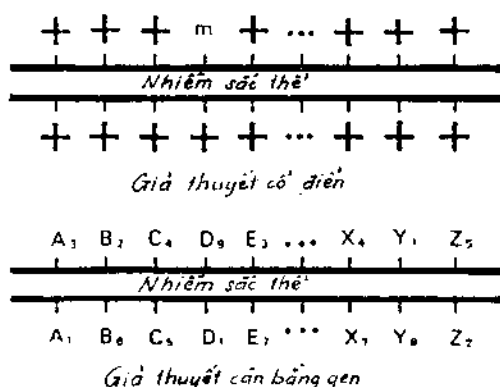
Sự đa hình có thể liên quan đến hình thái (ví dụ màu sắc) hoặc cấu trúc. Sự đa hình sinh hóa dễ gây nhầm lẫn bởi vì mọi sự đa hình đều có cơ sở sinh hóa và nó phụ thuộc vào kĩ thuật phát hiện. Ở đây không đề cập đến sự đa hình về tính miễn nhiễm hoặc hệ thống không dung hợp mà chỉ đề cập đến sự đa hình phát hiện do kĩ thuật điện di trên gen.

Kĩ thuật điện di do sự di động của phân tử protein trong một khoảng thời gian nhất định trên điện trường đồng nhất. Các protein đột biến khác nhau ở điện tích sẽ có sự di động khác nhau nên có thể phát hiện sự khác nhau giữa chúng bằng kĩ thuật điện di. Sự khác nhau này, trong một chừng mức nào đó phản ánh sự khác nhau trong kích thước và cấu trúc của phân tử protein. Người ta gọi **isozyme** là các dạng protein có cùng phản ứng enzyme, nhưng có sự khác nhau khi điện di. Sự khác nhau này trong nhiều trường hợp liên quan với sự thay thế bởi chỉ một amino acid trong phân tử protein do đột biến từ allele này sang allele khác.

Kĩ thuật điện di quan trọng ở chỗ nó cho phép phát hiện sự khác nhau ở kiểu hình của một protein (có nghĩa là trong một hệ thống có 2 allele gồm các dạng đồng hợp tử và dị hợp tử đều phát hiện được). Nhờ đó, cùng lúc có thể phân tích nhiều cá thể của một quần thể nào đó để đánh giá chính xác số phần trăm dị hợp tử của một gen nhất định. Nó cho biết **sự đa dạng sinh hóa** giữa các nhóm sinh vật theo các protein được quan sát.

b) Hai giả thuyết về cấu trúc di truyền của quần thể

Việc phát hiện ra tầm quan trọng của sự đa hình sinh hóa cho phép chọn lọc giữa **2 quan điểm đối kháng** nhau về cấu trúc di truyền của các quần thể (hình 18.4).



Hình 18.4. Sơ đồ hai giả thuyết về cấu trúc di truyền của quần thể
Giả thuyết cổ điển : m - allele đột biến

Theo **giả thuyết "cổ điển"** các cá thể của một quần thể đều **đồng hợp tử** ở phần lớn các gen, một **số ít dị hợp tử** và một số ít hơn nữa là các đồng hợp tử mang biến dị hình thái quan sát được.

Giả thuyết "cân bằng" thì ngược lại, cho rằng các cá thể của một quần thể **dị hợp tử ở nhiều gen** và nó tồn tại ở nhiều tổ hợp gen khác nhau.

Theo giả thuyết "cổ điển", phần lớn gen "bình thường" là đồng hợp tử và nguồn biến dị chủ yếu là đột biến. Còn theo giả thuyết cân bằng thì không có allele "bình thường" trong quần thể, và biến dị di truyền được duy trì ở thể **cân bằng** giữa các allele do tái tổ hợp.

Kết quả phân tích sinh hóa bằng điện di cho thấy sự đúng đắn của giả thuyết "cân bằng".

c) Tổng biến dị di truyền

Tổng biến dị di truyền được đánh giá dựa theo 3 chỉ số : **P** là **tổng của sự đa hình** dựa vào tỉ lệ các **gen đa hình** trên tổng số gen phân tích. **A** là **số allele trung bình** của một gen, tức tổng của allele so với tổng các gen được phân tích và **H** là **tổng trung bình của dị hợp tử** ở mỗi cá thể.

Sau đây là bản đánh giá tổng biến dị di truyền nhờ phương pháp điện di:

Loài hay nhóm	Số loài được khảo sát	Số gen được nghiên cứu của 1 loài	Tổng đa hình (P)	Tổng dị hợp tử (H)
Người	1	71	0.28	0.06
Gặm nhấm	26	26	0.20	0.05
Chim	4	19	0.14	0.04
Bò sát	9	21	0.23	0.04
Lưỡng cư	11	22	0.33	0.08
Cá	14	21	0.30	0.07

Các số liệu cho thấy tổng biến dị di truyền khá lớn. Ở động vật có xương sống gần 30% protein lớn có biến dị, 6% gen dị hợp tử. Ở động vật không xương sống độ biến dị còn lớn hơn : từ 10 đến 25% dị hợp tử, trung bình khoảng 15%. Số biến dị này vượt xa mức đánh giá trước đây.

III. CHỌN LỌC

Quan điểm chọn lọc tự nhiên là *hòn đá tảng* của học thuyết tiến hóa Darwin và ngày nay khi nói đến học thuyết Darwin hay thuyết Tân Darwin đều có nghĩa là nói tới học thuyết tiến hóa, trong đó *chọn lọc tự nhiên đóng một vai trò quyết định*. Chọn lọc là nhân tố tiến hóa có *định hướng*, quan trọng và có ý nghĩa nhất.

1. Sự sinh sản phân hóa

Có thể định nghĩa chọn lọc là quá trình làm *tăng xác suất để lại nhiều hậu thế* của dạng sinh vật này hay dạng sinh vật khác. Đối với sinh vật sinh sản hữu tính, thì còn đòi hỏi phải đạt tuổi sinh sản. Nên có thể định nghĩa chung là *quá trình xác định xác suất đạt đến tuổi sinh sản* của một số cá thể nhất định.

Chọn lọc tự nhiên tác động bằng một nhân tố bất kì nào đó có ảnh hưởng lên sự khác nhau trong *việc sinh sản*. Những nhân tố này bao gồm tất cả những nhân tố quyết định *sự tử vong* trước khi sinh sản, và những nhân tố quyết định *sự khác nhau trong sinh sản* nhưng không có liên quan tới sự tử vong. Như Darwin đã chỉ ra một cách rất đúng là sự đánh giá cần được thực hiện dựa theo *"kết quả của việc để lại con cháu"*.

Cần nhận thức rằng chọn lọc tự nhiên tạo thuận lợi (hay gây trở ngại) cho các gen hay các kiểu gen chỉ bằng cách *gián tiếp thông qua các kiểu hình* (các cá thể) mà các kiểu gen sản sinh ra. Khi những khác biệt về kiểu gen không thể hiện ra ở kiểu hình (chẳng hạn, trong trường hợp các gen lặn ẩn) thì những khác biệt đó không bị chọn lọc với tới, và do đó không bị rơi vào chọn lọc. Phần lớn biến dị kiểu hình mà chọn lọc tự nhiên tác động vào (ở các loài có sinh sản hữu tính) là kết quả của tái tổ hợp chứ không phải do những đột biến mới. Thực tế là *sự thích nghi* được quyết định *theo kiểu hình* là nguyên nhân về tầm quan trọng của các quá trình phát triển tạo ra kiểu hình.

Trong khi đó người ta đã coi nhẹ một thực tế là tổng số các cá thể còn sót lại (và dù chúng là 50% hay 0,01% của quần thể đi nữa) thì *kết quả của sinh sản* chủ yếu vẫn là do những nhân tố *chọn lọc quyết định*.

Không ai quyết đoán rằng chọn lọc tự nhiên đem lại sự bất tử, chọn lọc tự nhiên chỉ quyết định *khả năng sống sót và thành quả tương đối* của sinh sản ra các thành viên thuộc một quần thể này hay quần thể khác. Tất cả những gì làm gia tăng cho khả năng này thì sẽ được chọn lọc tự nhiên tạo thuận lợi không kể những nhân tố còn lại quyết định sự tử vong.

2. Áp lực chọn lọc

Chọn lọc tác dụng trước hết trong giới hạn quần thể, chọn kiểu gen này hay nọ. Đối tượng chọn lọc là các cá thể hay nhóm cá thể mang những dấu hiệu hay những tính trạng nhất định. Quá trình chọn lọc có thể xảy ra giữa các quần thể.

Chọn lọc luôn tạo một *áp lực* nhất định lên quần thể nên được gọi là *áp lực chọn lọc* và kí hiệu bằng chữ S . S được đánh giá theo *tỉ lệ sống sót* của các kiểu gen khác nhau. Ví dụ: có 1000 cá thể kiểu gen AA và Aa sống sót, nhưng chỉ có 999 cá thể aa sống sót thì $S = 0,001$ tức 1 phần nghìn. Nếu $S = 0$ thì sức sống của các cá thể như nhau, tức không có chọn lọc, còn $S = 1$ thì một kiểu gen không có cá thể nào sống sót, ví dụ: số cá thể aa là 0.

Chọn lọc làm *thay đổi nhanh tần số các gen* ở sinh vật đơn bội vô tính, nhưng làm thay đổi tần số gen ở sinh vật hữu tính chậm hơn. Ở các sinh vật sinh sản hữu tính, các allele trội bị loại bỏ nhanh hơn nhiều so với các allele lặn.

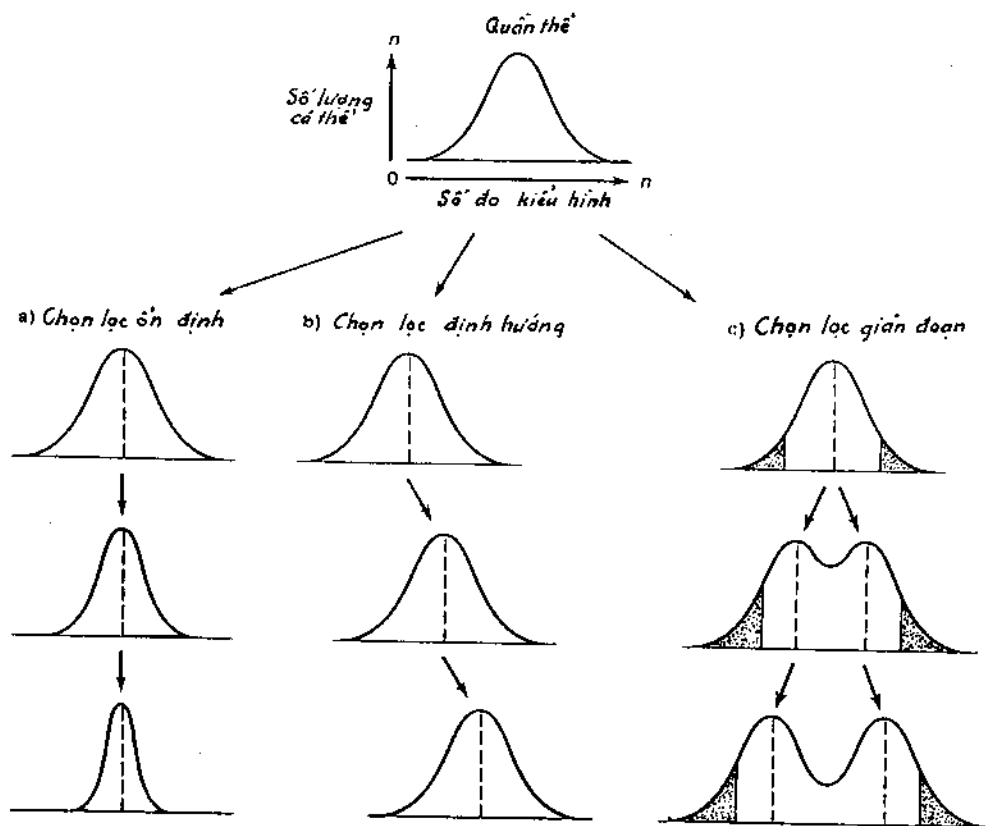
Một ví dụ về áp lực chọn lọc làm thay đổi nhanh tần số allele trong quần thể là trường hợp các *vi khuẩn kháng thuốc*. Không lâu sau khi phát minh ra penicillin, vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và nhiều vi khuẩn khác nhanh chóng trở nên kháng thuốc nên phải tăng liều thuốc lên dần. Như vậy dưới tác dụng của thuốc kháng sinh các vi khuẩn đã có biến đổi tiến hóa. Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng trong quần thể vi khuẩn có những tế bào đột biến có sẵn khả năng kháng thuốc ngay trước khi tiếp xúc với thuốc. Dưới tác động thường xuyên của thuốc phần lớn tế bào vi khuẩn bị diệt, nhưng số ít kháng thuốc còn sống sót sẽ sinh sản nhanh tạo ra quần thể vi khuẩn kháng thuốc. Nếu thuốc được sử dụng thường xuyên tức tác nhân chọn lọc được duy trì thì quần thể sẽ có kiểu gen kháng thuốc.

3. Các kiểu chọn lọc

a) Chọn lọc định hướng (Directional selection)

Dưới *tác động định hướng* của một tác nhân chọn lọc nhất định, các kiểu gen thích nghi hơn sẽ chiếm ưu thế. Nói cách khác tần số kiểu gen sẽ biến đổi theo hướng *thích nghi* với tác động của *nhân tố chọn lọc định hướng*. Đây là

kiểu chọn lọc thường gặp và đa số các ví dụ về chọn lọc mà Darwin nêu ra đều thuộc loại này. Màu sắc tự vệ, các côn trùng cánh ngắn ở các đảo của đại dương có gió mạnh đều thích nghi do kiểu chọn lọc định hướng.



Hình 18.5. Sơ đồ các kiểu chọn lọc

b) Chọn lọc ổn định (Stabilizing selection)

Đây là dạng chọn lọc chỉ giữ lại những cá thể có các chỉ số trung bình hay nói cách khác là dạng chọn lọc loại bỏ các cá thể ở hai cực (cực đại và cực tiểu).

Năm 1899, Bumpus đã thu nhặt những chim sẻ bị chết sau cơn bão và nhận thấy kích thước của chúng sai lệch khỏi dạng bình thường, ví dụ sải cánh quá dài hay quá ngắn. Ở chó, người ta cũng nhận thấy các lứa đẻ có số lượng trung bình cho chó con có sức sống cao hơn các lứa đẻ có số lượng nhiều quá hay ít quá. Ở thực vật cây cao quá dễ bị gió làm gãy, cây thấp quá thiếu ánh sáng nên đa số cây trung bình sẽ được chọn lọc giữ lại.

Chọn lọc ổn định tác động liên tục trên một phạm vi rộng lớn hơn nhiều so với các ví dụ nêu trên, nó giữ vai trò bảo tồn rất quan trọng. Trong quá trình tiến hóa, mỗi loài tiến đến một *tổ hợp các gen hợp lý* để tương tác một cách tối ưu trong việc điều khiển các quá trình sinh hóa, sinh lý và phát triển theo những đòi hỏi của sự tồn tại liên tục của loài. Bất kì một sai lệch nào khỏi sự tương tác hài hòa của các gen thường dẫn đến những bất lợi cho cá thể. Tuy nhiên trong một quần thể sinh sản hữu tính, các allele thuận lợi có xu hướng được tăng cường và các nhóm mới được tạo nên do *tái tổ hợp* sẽ xuất hiện khi mỗi thế hệ sinh sản tiếp. Phần lớn các nhóm mới đó sẽ kém thích nghi hơn các nhóm ban đầu (mặc dù một ít có thể thích nghi tốt hơn). Ngoài ra, phần lớn các biến dị di truyền mới có xu hướng phá vỡ hơn là tăng cường mối quan hệ hài hòa đã được thiết lập giữa các gen. Nếu các lực sai lệch kiểu tái tổ hợp và đột biến ngẫu nhiên sẽ có xu hướng phá vỡ các nhóm di truyền thích hợp, thì chọn lọc sẽ thường xuyên *tác động ngược lại* nhằm loại bỏ các tác động làm mất hài hòa mà chỉ giữ lại một số ít các tổ hợp có ưu thế. Như vậy chọn lọc là tác nhân chính *duy trì sự ổn định* hơn là sự hỗn loạn.

Kiểu chọn lọc ổn định này cũng giúp *giải thích sự hài hòa* trong biến đổi của các dạng sinh vật. Ví dụ : Ở thú, 4 chi đều có chiều dài như nhau, mà nếu có biến dị ngắn chân chẳng hạn thì cả 4 chân cùng ngắn hài hòa đều nhau.

c) Chọn lọc gián đoạn (Disruptive selection)

Đôi khi các *tính trạng đa gen* của quần thể chịu tác động định hướng của hai hay nhiều hơn các áp lực chọn lọc định hướng sẽ tạo thuận lợi cho các dạng ở hai cực của các loại kiểu hình.

Ví dụ : Trong một quần thể chim nào đó có thể có hai dạng theo chiều dài của mỏ: một dạng mỏ ngắn hơn bình thường, dạng kia dài hơn bình thường. Cả hai dạng mỏ đều thích nghi hơn dạng bình thường nên được chọn lọc giữ lại. Sự tác động kết hợp của các *áp lực chọn lọc định hướng đối ngược nhau* làm xuất hiện sự gián đoạn kiểu hình trong quần thể được gọi là *chọn lọc gián đoạn*.

4. Sự thích nghi ở mức quần thể

Kết quả của sự tiến hóa là tạo nên *loài*, nó thích nghi với sự sống trong một *hệ sinh môi* (ecosystem) nhất định, tức vừa với điều kiện *ngoại cảnh vô sinh* : gió, ánh sáng, độ ẩm..., vừa với điều kiện *ngoại cảnh hữu sinh* bao gồm tất cả các động vật và thực vật cùng sống với chúng.

Dưới tác động của chọn lọc tự nhiên *phức hợp các gen cùng thích nghi* được hình thành. Đây là một tổ hợp của nhiều gen tác động lên cùng một tính trạng và chức năng.

Tất cả các côn trùng xã hội (ong, kiến ...) trừ mối, đều thuộc bộ Hymenoptera, chúng có đặc điểm sống hợp tác, chuyên hóa xây tổ và xả thân cá nhân. Có thể lấy tổ ong làm ví dụ. Trứng được thụ tinh nở ra *ong cái* và *ong thợ* có 2n nhiễm sắc thể. *Ong đực* phát triển từ trứng không thụ tinh nên chỉ có n nhiễm sắc thể.

Việc *sinh sản* của đàn ong chỉ do *một ong chúa* (ong cái) đảm nhận. Các ong thợ lấy phấn hoa, xả thân bảo vệ đàn, nhưng không sinh đẻ. Làm sao các tính trạng có lợi của ong thợ được truyền cho thế hệ sau ? Điều này chỉ có thể giải thích bằng *sự thích nghi nhờ vốn gen* của quần thể. Chính ong chúa mang các *phức hợp gen tương ứng* và sinh sản ra các ong thợ mang những tổ hợp gen đó. Đây cũng là một ví dụ cho thấy sự tiến hóa diễn ra ở mức quần thể.

5. Đại tiến hóa và tiểu tiến hóa

Học thuyết tiến hóa cổ điển của Darwin được xây dựng trên cơ sở các ngành sinh học khác nhau, chủ yếu nhờ các phương pháp so sánh và mô tả. Hướng này được gọi là *đại tiến hóa* (macroevolution). Nó bao gồm những khoảng *thời gian dài, lãnh thổ rộng, tất cả các đơn vị phân loại* và những *hiện tượng chung* hoặc riêng của tiến hóa.

Học thuyết tiểu tiến hóa (microevolution) được xây dựng trên cơ sở kết hợp học thuyết tiến hóa với *di truyền học*. Nó nghiên cứu các quá trình *tiến hóa* xảy ra trong các *quần thể*, trong khoảng *thời gian ngắn* và *lãnh thổ giới hạn*.

Học thuyết tiến hóa tổng hợp hiện đại xây dựng trên cơ sở *học thuyết tiến hóa cổ điển* của Darwin có tính đến các cơ chế di truyền nhiễm sắc thể, các dữ kiện của *di truyền học quần thể*, sự định nghĩa sinh học của loài và nhiều khái niệm khác, thực chất là *sự kết hợp giữa đại và tiểu tiến hóa*.

IV. SỰ TIẾN HÓA PHÂN TỬ

1. Về nguồn gốc sự sống

a) Giả thuyết về gen xuất hiện trước tiên

Năm 1929, G. Muller - một nhà di truyền học nổi tiếng nêu giả thuyết cho rằng *sự sống bắt đầu* từ một hoặc vài *gen* được tạo thành không do các sinh vật. Trong một thời gian dài giả thuyết này không được chú ý. Các số liệu được tích lũy do sinh học phân tử đã cho thấy giả thuyết trên ngày càng có lí. Có ba nhóm chứng cứ củng cố cho giả thuyết trên :

– *Thứ nhất* : Cấu trúc phân tử và sự tái sinh của virus . Chúng ta biết rằng khi virus xâm nhập vào vi khuẩn chỉ có DNA hoặc RNA được bơm vào vì tự nó sao chép rồi tạo ra hạt virus mới .

– *Thứ hai* : Trong quá trình tổng hợp protein, ngoài DNA và mRNA thông tin, còn có sự tham gia của tRNA vận chuyển và rRNA của ribosome. Điều này cho thấy nucleic acid có trước.

– *Thứ ba* : Nhiều nucleotide giữ vai trò đa dạng và quan trọng của tế bào ở tất cả các sinh vật. Ví dụ: ATP (adenosin- triphosphaste) có gốc adenine là "tiền tệ năng lượng" của tế bào, hầu như có ở tất cả các sinh vật. Các coenzyme như NAD, NADP đều có gốc nucleotide trong thành phần cấu tạo .

Hiện nay chưa có mô hình cụ thể nào cho thấy quá trình xuất hiện sự sống từ nucleic acid được chứng minh bằng thực nghiệm. Những người theo thuyết này cho rằng các "vật sống" đầu tiên là các đại phân tử có khả năng tự sao chép (tự tái sinh) tức "các gen trần trụi". Các tế bào đầu tiên tích lũy một cách chậm chạp vỏ bao bên ngoài bởi các chất khác (tế bào chất sơ khai). Một chứng cứ minh họa rõ cho cơ chế này là các hạt virus chứa RNA, hoặc DNA có cấu tạo rất đơn giản.

b) Giả thuyết RNA xuất hiện trước

Vào năm 1981, ông Cech người Mỹ phát minh ra RNA có khả năng xúc tác và các RNA này được gọi là các *ribozyme* (ch.VI). Như vậy phân tử RNA có thể mang cùng một lúc *hai chức năng: chứa thông tin* như DNA và khả năng *xúc tác* như protein. Việc tạo các polynucleotide một mạch đơn như RNA sẽ dễ thực hiện hơn và đơn giản hơn so với DNA mạch kép. Do đó vào cuối những năm 80, khi bàn về nguồn gốc sự sống có quan điểm cho rằng trong một thời gian dài các *tiền sinh vật* (prebioton) ở dạng RNA. Sự tiến hóa dần dần đưa đến chỗ *thông tin được chuyển hóa cho DNA* ở dạng mạch kép ổn định hơn và *khả năng xúc tác được chuyển cho protein* làm chức năng chuyên hóa hữu hiệu hơn.

2. Thuyết tiến hóa trung tính

Từ năm 1967, Motoo Kimura dựa trên cơ sở các số liệu sinh học phân tử nêu ra thuyết tiến hóa trung tính : thứ nhất, phần lớn các thay thế nucleotide trong phân tử DNA xảy ra một cách ngẫu nhiên tạo ra phần lớn các *đột biến trung tính*, không có ý nghĩa chọn lọc; thứ hai, sự đa dạng được duy trì trong quần thể ở thế cân bằng giữa tổng đột biến và sự loại trừ ngẫu nhiên.

Ví dụ sau đây cho thấy có thể xuất hiện *những đột biến ngẫu nhiên trung tính* : codon AUA của isoleucine có thể được thay thế bởi một nucleotide để biến thành các codon khác nhau (xem bảng mã di truyền, ch.VI). Ở đây, nếu thay thế nucleotide thứ ba bằng U để có AUU hoặc bằng C để có AUC. Cả 3 codon AUA, AUU và AUC đều mã hóa cho isoleucine. Hai thay thế này rõ ràng không có ý nghĩa chọn lọc.

Khi nghiên cứu phát sinh chủng loài, các nhà sinh học phân tử phát hiện một số đột biến ở một số gen có tốc độ đột biến không đổi theo thời gian tương tự như *đồng hồ tiến hóa* (evolutionary clock), chúng không có giá trị thích nghi hay chọn lọc. Một ví dụ rất rõ củng cố cho quan điểm đồng hồ tiến hóa là số lượng ổn định của những khác biệt trong trình tự amino acid trong cùng một mạch hemoglobin bắt nguồn từ các động vật có xương sống khác nhau. Đặc biệt khi so sánh trình tự mạch α - globin, các động vật có xương sống khác nhau với một số lượng thay thế amino acid trên mạch tương tự nhau : cá chép có 85, kì nhông 84, gà 83, chuột 79 và người 79. Điều đó cho thấy mặc dù có những biến đổi hình thái rất lớn diễn ra ở các dòng khác nhau trong thời kì hơn 400 triệu năm, tốc độ đột biến ổn định có thể xảy ra đối với một số protein.

Những người theo thuyết "trung tính" cho rằng một số đột biến không có giá trị chọn lọc vẫn có thể tự nhân rộng trong quần thể và do các sự kiện ngẫu nhiên, tần số của chúng có thể tăng hay giảm và có thể chiếm mật độ cao trong quần thể.

Giữa những người nghiên cứu tiến hóa phân tử và những nhà tiến hóa nghiên cứu trong thiên nhiên đã diễn ra nhiều cuộc tranh cãi và hiện vẫn còn đang tiếp diễn.

3. Sự tiến hóa của gen

Sự hiểu biết chi tiết về các cơ chế di truyền ở mức phân tử dẫn đến các giả thuyết về sự tiến hóa của gen.

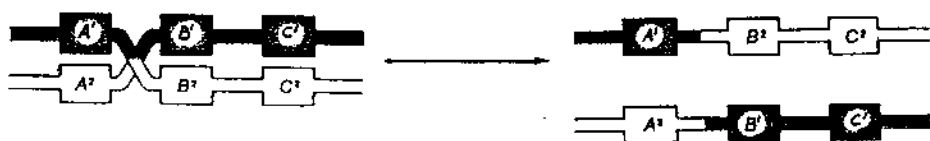
a) Sự nhân đôi và dung hợp gen

Một trong những cơ chế quan trọng dẫn đến xuất hiện gen mới là *trao đổi chéo do bất cặp so le* (unequal pairing) dẫn đến *nhân đôi gen* (gene duplication) và *dung hợp gen* (gene fusion) như mô tả trên hình 18.6.

Xét trường hợp 3 cặp gen, nếu bất cặp bình thường và trao đổi chéo xảy ra thì hai nhiễm sắc thể $A_1B_1C_1 / A_2B_2C_2$ sẽ tạo ra hai nhiễm sắc thể $A_1B_2C_2$ và $A_2B_1C_1$. Khi có sự bất cặp so le $A_1B_1C_1 / A_2B_2C_2$ sẽ tạo ra :

- Nhiễm sắc thể có nhân đôi gen B : $A_1B_1B_2C_2$
- Nhiễm sắc thể thứ hai có dung hợp gen A_2C_1 .

a) Trao đổi chéo và bất cặp bình thường



b) Trao đổi chéo và bất cặp so le



Hình 18.6. Kết quả trao đổi chéo đều và so le của 3 đoạn gen trên nhiễm sắc thể

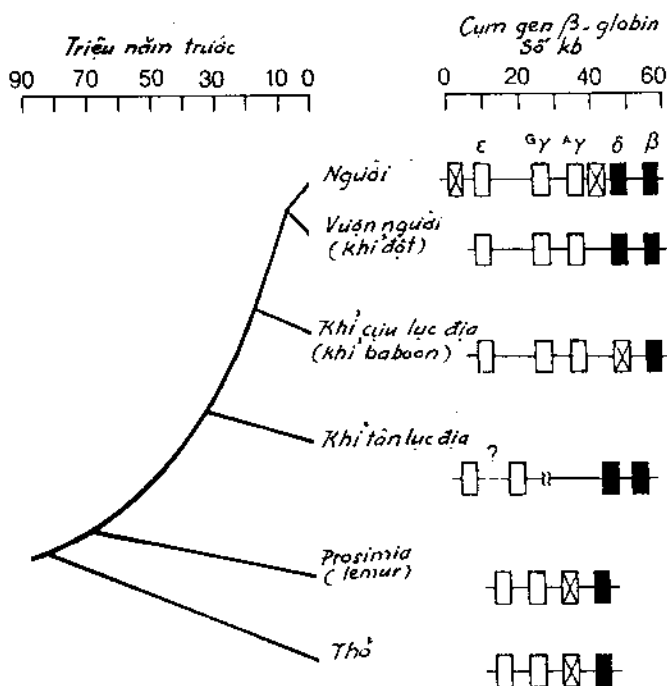
- a) Sự **bất cặp bình thường** và trao đổi chéo không làm thay đổi số lượng chất di truyền
b) Sự **bất cặp so le** và trao đổi chéo dẫn đến nhân đôi gen (gen B₁, và gen B₂) và dung hợp gen.

Do kết quả các nhân đôi của một gen nào đó sẽ xuất hiện khả năng **phân hóa** của enzyme do nó mã hóa để thích ứng với cơ chất đặc hiệu. Sự phân hóa này diễn ra qua nhiều giai đoạn. Trước tiên, có sự thay thế amino acid trong thành phần của trung tâm hoạt động enzyme, hoặc không ở trung tâm nhưng thay đổi cấu hình (conformation). Tác động của chọn lọc tự nhiên tiếp theo hướng đến chỗ giữ lại các thể đột biến có các enzyme thích ứng với cơ chất mới.

Sự tiến hóa của các gen tương đồng minh họa rõ cho cơ chế nhân đôi gen và sự phân hóa tiếp theo. Ví dụ rất rõ là trường hợp tổ chức theo cụm của các gen kiểu β - globin, còn gọi là họ gen (gene family) ở 5 loài *Primates* và thỏ (hình 18.7) của mỗi cụm liên kết với nhau trên cùng một nhiễm sắc thể. Dựa vào nghiên cứu các gen này có thể xây dựng các nhánh tiến hóa theo thời gian.

Sự hiện diện của nhiều **gen giả** trong các bộ gen cũng là một chứng cứ về sự nhân đôi trong tiến hóa. Các gen giả này vì một lí do nào đó không có hoạt động chức năng.

Sự **dung hợp** (gene fusion) các bản sao nhân đôi của cùng một gen sẽ tạo nên các **lập đoạn** trong cấu trúc gen mới và tương ứng sẽ biểu hiện ra các lập đoạn của một mạch polypeptide albumin của bò là ví dụ về các lập đoạn trên mạch polypeptide. Protein này có 580 gốc amino acid, sự phân tích cấu trúc bậc một cho thấy có 9 lập đoạn.



Hình 18.7. Tổ chức của các họ gen β globin ở 5 loài Primates và thỏ.

Mỗi gen được kí hiệu bằng hình chữ nhật nhỏ, được phiên mã từ trái sang phải.
 Các gen β globin tô đen, các gen khác biểu hiện trong phát triển phôi và ô gạch chéo là gen giả (pseudogene).

Ngược lại với sự dung hợp là sự **tách gen** (gene disjunction), tức một gen có thể tách ra các phần riêng có hoạt tính. Ví dụ, khi các **protein đa năng** (multifunctional protein) được xử lí nhẹ bởi protease, có thể nhận được các đoạn polypeptide thực hiện phản ứng gen riêng lẻ. Sự tách các đoạn của gen và tổ hợp lại của chúng có thể tạo các gen khác nhau ở các loài khác nhau.

b) Sự tiến hóa của hệ thống điều hòa

Sự so sánh các con đường sinh tổng hợp các chất phân tử nhỏ của tế bào và so sánh các con đường sử dụng các nguồn C và N cho thấy có sự **giống nhau** ở phần lớn các sinh vật. Các quá trình tổng hợp theo khuôn mẫu như sao chép, phiên mã và dịch mã cũng giống nhau. Điều đó cho thấy có sự thay đổi tiến hóa không những ở các gen cấu trúc, mà có lẽ chủ yếu ở các **gen điều hòa** tạo sự khác biệt lớn giữa các nhóm sinh vật. Sự tiến hóa phát triển theo hướng **tăng cường các cơ chế điều hòa**.

Tuy các **cơ chế điều hòa** ở *Eukaryotae* còn biết rất ít, nhưng có thể ghi nhận một số điểm khác nhau căn bản của chúng giữa *Prokaryotae* và *Eukaryotae*. Một vài xu hướng chung trong sự tiến hóa của gen là :

– Sự **tự trị hóa** (Autonomisation) của các gen ở *Eukaryotae* so với *Prokaryotae*.

– Sự tiến hóa của các cơ chế điều hòa.

Sự xuất hiện cấu trúc nhiễm sắc thể phức tạp của *Eukaryotae* mở ra khả năng mới trong điều hòa hoạt động của gen. Ngoài ra, có sự xuất hiện của các phần tử điều hòa như enhancer, promoter. Các phần tử di động (transposon) làm thay đổi hoạt tính gen có thể góp phần hình thành nên các cơ chế điều hòa.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Theo quan điểm tiến hóa hiện đại, quần thể là **đơn vị tiến hóa cơ sở**. Sự di truyền trong quần thể được đánh giá theo **phương trình Hardy-Weinberg**. Các **đột biến gen** là nguồn cung cấp nguyên liệu mới cho tiến hóa. Các **đột biến cấu trúc** và **số lượng nhiễm sắc thể** có vai trò quan trọng trong hình thành loài. **Biến dị tổ hợp** có vai trò quan trọng nhất trong tiến hóa là tạo sự **đa dạng di truyền** đến mức không có hai cá thể giống nhau. Do đó, sự tiến hóa phát triển theo hướng tăng cường và hoàn thiện cơ chế **sinh sản hữu tính**.

Chọn lọc là nhân tố tiến hóa có **định hướng** : duy trì có phân hóa các kiểu gen có lợi và luôn tạo một áp lực nhất định trong quần thể. Có 3 kiểu chọn lọc : **định hướng, ổn định và gián đoạn**.

Các thành tựu của sinh học phân tử soi sáng và đặt ra nhiều vấn đề mới cho học thuyết tiến hóa : sự sống bắt đầu từ RNA, thuyết **tiến hóa trung tính** và sự **tiến hóa của gen** có thể do **nhân đôi, dung hợp** hoặc **tách gen**.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Chứng minh quần thể là đơn vị tiến hóa cơ sở.
2. Di truyền học nghiên cứu quần thể như thế nào ?
3. Phương trình Hardy - Weinberg có ý nghĩa như thế nào trong nghiên cứu tiến hóa ?
4. Đột biến gen có vai trò như thế nào trong tiến hóa ?
5. Vì sao đột biến cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể có vai trò quan trọng trong hình thành loài ?

- Các kiểu chọn lọc có vai trò với quá trình tiến hóa như thế nào ?
- Vì sao nói sự thích nghi là kết quả biến đổi tiến hóa ở quần thể ?
- Vì sao cho rằng RNA là chất quan trọng đầu tiên trong quá trình xuất hiện sự sống ?
- Thuyết tiến hóa trung tính dựa vào những cơ sở nào và vì sao gây nhiều tranh cãi ?
- Sự tiến hóa ở mức độ gen được biểu hiện như thế nào ?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Nhóm máu ABO ở người có 3 allele là I^A, I^B và i (hay I^O) có mối quan hệ trội lặn : ($I^A = I^B$) > i .

- Xác định các tỉ lệ kiểu gen và kiểu hình của các locus nhóm máu từ quần thể cân bằng di truyền.
- Xây dựng công thức cho việc xác định tần số các allele của các locus nhóm máu ABO.
- Ở một quần thể người, tần số của nhóm máu ABO được xác định gồm 49% kiểu O, 36% kiểu A, 12% kiểu B và 3% kiểu AB. Tần số các allele trong quần thể này là bao nhiêu ?
- Trong quần thể vừa nêu ở mục c, bao nhiêu phần trăm các cá thể nhóm máu A là đồng hợp tử.

Lời giải

a) Quy ước p = tần số của I^A , q = tần số của I^B và r = tần số của i . Khi quần thể cân bằng sẽ có phương trình $(p+q+r)^2 = 1$.

Tần số kiểu gen	Kiểu gen	Kiểu hình (nhóm máu)
p^2	$I^A I^A$	A
$2pr$	$I^A i$	
q^2	$I^B I^B$	B
$2qr$	$I^B i$	
$2pq$	$I^A I^B$	AB
r^2	ii	O

b) Quy ước $\bar{A}$, $\bar{B}$ và $\bar{O}$ biểu thị tần số kiểu hình tương ứng của nhóm máu A, B và O. Trước hết xác định tần số của allele lặn i .

$$r = \sqrt{r^2} = \sqrt{\bar{O}}$$

Xác định tần số của I^A :

$$p^2 + 2pr + r^2 = \bar{A} + \bar{O}$$

$$(p + r)^2 = \bar{A} + \bar{O}$$

$$\begin{aligned} \rightarrow p &= \sqrt{\bar{A} + \bar{O}} - r \\ &= \sqrt{\bar{A} + \bar{O}} - \sqrt{\bar{O}} \end{aligned}$$

Tần số của I^B là $q = 1 - p - r$, hoặc có thể theo cách xác định tần số I^A vừa giải ở trên :

$$q = \sqrt{\bar{B} + \bar{O}} - \sqrt{\bar{O}}$$

Trình bày các lời giải ở dạng khác :

$$\underbrace{\sqrt{\bar{A} + \bar{O}} - \sqrt{\bar{O}}}_p + \underbrace{\sqrt{\bar{B} + \bar{O}} - \sqrt{\bar{O}}}_q + \underbrace{\sqrt{\bar{O}}}_r = 1,0$$

$$p = 1 - \sqrt{\bar{B} + \bar{O}}$$

$$q = 1 - \sqrt{\bar{A} + \bar{O}}$$

$$r = \sqrt{\bar{O}}$$

$$c) \text{ Tần số của allele } i = \sqrt{\bar{O}} = \sqrt{0,49} = 0,7 = r$$

$$\text{Tần số của } I^B = 1 - \sqrt{\bar{A} + \bar{O}} = 1 - \sqrt{0,36 + 0,49} = 0,08 = q$$

$$\text{Tần số của } I^A = 1 - \sqrt{\bar{B} + \bar{O}} = 1 - \sqrt{0,12 + 0,49} = 0,22 = p$$

$$\text{Kiểm tra lại : } p + q + r = 0,22 + 0,08 + 0,7 = 1.$$

$$d) p^2 = I^A \cdot I^A = (0,22)^2 = 0,048$$

$$2pr = I^A \cdot i = 2 (0,22) (0,7) = 0,308$$

$$\text{Tổng các cá thể nhóm máu A} = 0,048 + 0,308 = 0,356$$

Như vậy $48/356 = 0,135$ hay 13,5% của tổng cá thể có nhóm máu A là đồng hợp tử.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Một protein huyết tương của người có tên gọi là haptoglobin. Nó có 2 kiểu điện di chủ yếu được tạo ra do cặp allele tương đương Hp^1 và Hp^2 . Mẫu thu được từ 100 cá thể có 10 Hp^1/Hp^1 , 35 Hp^1/Hp^2 , và 55 Hp^2/Hp^2 . Các kiểu gen thu mẫu này có xác nhận tần số allele tuân theo phương trình Hardy-Weinberg của quần thể cân bằng không? Số liệu có thể chấp nhận được về mặt thống kê không?

2. Cho gen A có tần số 0,2 và gen B ở tần số 0,6. Hãy tìm tần số cân bằng của các giao tử AB, Ab, aB và ab.

3. Ở một cánh đồng bắp cô lập, người ta thấy có sự phân li ra dạng nội nhũ vàng và trắng. Màu vàng được xác định do allele trội và màu trắng do allele lặn tương ứng. Trong mẫu lấy ngẫu nhiên từ 1000 hạt có 910 hạt vàng. Tìm tần số các allele của quần thể này.

4. Một gen trội ở thỏ giúp phân cắt sắc tố vàng xanthophyll có trong thức ăn thực vật nên tạo ra mỡ trắng. Kiểu gen lặn *ii* không có khả năng thực hiện sự chuyển hóa đó, nên tạo mỡ vàng. Nếu con thỏ đực dị hợp tử giao phối với nhóm thỏ cái mỡ trắng từ một quần thể, với tần số I là $2/3$, thì có bao nhiêu thỏ con có mỡ vàng trong tổng số 32 thỏ con?

5. Màu của chim cú mèo chịu sự kiểm tra của một dãy đa allele: G^r (red:đỏ) $> g^i$ (intermediate = trung gian) $> g$ (gray = xám). Sự phân tích mẫu từ một quần thể cho thấy 38 đỏ, 144 trung gian và 18 xám. Hãy tính tần số của các allele?

PHẦN VI

ỨNG DỤNG CỦA DI TRUYỀN HỌC

CHƯƠNG XIX

CHỌN VÀ CẢI THIẾN GIỐNG

Di truyền học cung cấp các *cơ sở khoa học* để xây dựng nên các phương pháp *chọn* và *cải thiện* các giống vi sinh vật, vật nuôi và cây trồng. Nó góp phần hoàn hảo công tác chọn và cải thiện giống trong tất cả các khâu từ *sưu tập* và *tạo vật liệu ban đầu*, xây dựng các phương pháp *đánh giá* và *chọn lọc*, xác định *kiểu giao phối* đến phục tráng các giống.

Kỹ thuật di truyền đã cung cấp phương tiện cho con người *vượt giới hạn tiến hóa* trong chọn giống : tạo các vi sinh vật, động vật và thực vật mang các gen lạ từ bất kì một sinh vật nào khác, kể cả các gen của người. Công nghệ sinh học đã tận dụng không những *nguồn gen* của tất cả các sinh vật mà còn cải biến gen có định hướng để thay đổi chất lượng protein.

Chọn giống, được coi là "*sự tiến hóa do con người điều khiển*", đã hình thành trong thực tiễn sản xuất trồng trọt và chăn nuôi. Ban đầu nó được tiến hành một cách *tự phát* theo kinh nghiệm, về sau có chủ động hơn, nhưng từ khi di truyền học ra đời, nó mới có *cơ sở khoa học vững chắc*. Với sự phát triển của di truyền học, công tác chọn và cải thiện giống ngày càng hoàn thiện hơn và có nhiều đóng góp nhằm thỏa mãn nhu cầu của xã hội loài người mà cuộc "*Cách mạng xanh*" vào những năm 60 là một ví dụ.

Chọn và cải thiện giống là một quá trình phức tạp, tốn nhiều công sức và trải qua nhiều khâu.

I. CÁC NGUỒN VẬT LIỆU

Muốn chọn lọc tốt cần có sự **đa dạng** của vật liệu ban đầu, thu thập từ các dạng hoang dại trong thiên nhiên và sau đó được con người làm tăng thêm bằng lai, gây đột biến và nhân ra.

1. Bộ sưu tập giống

Bước đầu tiên trong chọn giống là thu thập các vật liệu ban đầu từ thiên nhiên để xây dựng **bộ sưu tập các dạng tự nhiên** về một sinh vật nuôi hay cây trồng nào đó, gọi ngắn là **bộ sưu tập giống**. Đối với thực vật, đối tượng sưu tầm thường là các **chủng địa phương** hoặc các dạng ở **trung tâm phát sinh giống cây trồng**. Các chủng địa phương có tổ hợp nhiều gen thích nghi tốt với điều kiện môi trường nơi chúng sống.

N.I. Vavilov (Nga), trên cơ sở các mẫu thu thập từ nhiều nơi trên thế giới, đã nêu ra **học thuyết về các trung tâm phát sinh cây trồng** trên thế giới (11 trung tâm). Ông cho rằng các trung tâm vì điều kiện ban đầu thích hợp nên có sự **đa dạng lớn, vốn gen phong phú**. Càng đi xa khỏi trung tâm thì cây trồng càng gặp nhiều điều kiện khó khăn hơn, chỉ số ít dạng thích nghi được mới phát triển, nên sự đa dạng giảm dần.

Quan điểm của Vavilov được nhiều người công nhận và nó giúp các nhà chọn giống định hướng đúng nơi nào trên thế giới có thể thu thập được nhiều vật liệu tự nhiên cho việc tạo giống của mình. Ví dụ, muốn thu thập nhiều dạng bắp và khoai tây hoang dại thì đến trung tâm phát sinh của chúng là Mexico và một phần Bắc Mỹ. Hay như các nhà chọn giống Mì đã tìm được dạng lúa mì hoang dại kháng bệnh rỉ sắt ở Ethiopia, nằm trong trung tâm phát sinh của lúa mì *Triticum aestivum*.

2. Lai tạo giống

Phương pháp lai trước đây, hiện nay và sau này vẫn là phương pháp căn bản để tạo sự **đa dạng các vật liệu** trong chọn giống. Các vật liệu tự nhiên được thu thập ban đầu khó có thể chỉ một bước chuyển thành giống ổn định và hoàn chỉnh. Biến dị tổ hợp do lai tạo cung cấp một số lượng lớn các kiểu gen khác nhau thể hiện qua vô số kiểu hình để cho nhà chọn giống theo yêu cầu của mình mà lựa chọn.

Quá trình lai tạo ra rất nhiều tổ hợp gen khác nhau. Ví dụ, ở Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI - International Rice Research Institut) ở Phillipines hàng năm nhận được hơn 60.000 tổ hợp mới. **Ngân hàng gen** được xây dựng để giữ gìn các dạng khác nhau đó và để có thể trao đổi với nhau, tiết kiệm công sức thu thập và tạo vật liệu ban đầu.

Lai xa giữa các loài, các chi, kết hợp với đa bội hóa, như lai lúa mì *Triticum* với mạch đen *Secale* tạo các thể lai *Triticale* cũng được tiến hành cho mục đích này.

3. Đột biến nhân tạo

Đối với các vi sinh vật và cây trồng có thể gây đột biến nhân tạo bằng các tác nhân vật lí như các bức xạ ion hóa, tia tử ngoại và các hóa chất gây đột biến. Bằng gây đột biến nhân tạo có thể thu được nhiều dạng khác nhau và qua lai tạo có thể góp phần tạo ra vật liệu mới.

Đột biến nhân tạo có thể làm thay đổi một vài nhược điểm của giống, như xuất hiện dạng đột biến để kháng với các tác nhân bất lợi.

Các thể *đột biến cấu trúc* và *số lượng nhiễm sắc thể* cũng được sử dụng rộng rãi trong chọn giống thực vật.

4. Bảo tồn sự đa dạng của nguồn gen thiên nhiên

Trong nhiều thập niên qua, sự thâm canh của nông nghiệp đã dẫn đến chỗ *làm đồng nhất hóa* (homogenisation) các sản phẩm của chăn nuôi và trồng trọt. Các *giống địa phương* bị thay thế nhanh chóng trên diện rộng bởi các *giống lai*, giống mới thuần chủng có năng suất cao hơn. Điều đó dẫn tới nhiều hậu quả như :

- Sự *suy giảm* hoặc *mất hẳn* nhiều giống địa phương, mà chúng là kết quả của một quá trình tiến hóa lâu dài.

- Sự *đa dạng* của các chủng trong loài cũng *giảm* do bị xâm lấn của các dạng có giá trị kinh tế cao.

- Sự tập trung nghiên cứu chỉ nhằm vào một số ít loài có giá trị kinh tế.

Đó là chưa kể nhiều dạng thực vật hoặc côn trùng bị hủy diệt do việc sử dụng rộng rãi các chất diệt cỏ và trừ sâu. Nói chung trên thế giới, sự đa dạng di truyền bị giảm sút nghiêm trọng do sự khai thác chưa hợp lí của con người.

Hiện nay, vấn đề *nông nghiệp bền vững* được đặt ra, trong đó sự *cân bằng sinh thái* được quan tâm đúng mức nhằm sản xuất nhiều hơn nhưng ít phá hủy thiên nhiên hơn. Từ đó nảy sinh vấn đề là làm thế nào để *bảo vệ* và *duy trì sự đa dạng sinh học* cho nền nông nghiệp bền vững và cho môi sinh của loài người.

Các chương trình bảo tồn sự đa dạng di truyền được thực hiện theo hai phương pháp bổ sung cho nhau là:

— *In situ* : Sự bảo tồn quần thể thực vật và động vật ở môi trường tự nhiên của chúng. Đối với các loài hoang dại, cần tính đến việc duy trì không phải một cá thể mà nhiều quần thể hay kiểu sinh thái (ecotype).

— *Ex situ* : Sự bảo tồn các mẫu (hạt, phấn hoa, các giao tử, các phôi, các cơ quan khác nhau) trong các điều kiện nhân tạo như nhiệt độ thấp, nuôi cấy mô tế bào và xây dựng các ngân hàng gen.

Tầm quan trọng của vấn đề được thể hiện rõ ở Thỏa ước Rio de Janeiro về sự đa dạng sinh học, được thông qua vào năm 1992 tại hội nghị thượng đỉnh về môi trường ở Rio de Janeiro. Hiện nay, các tổ chức quốc tế như FAO (Food and Agriculture Organisation), ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) tập hợp các nước để xây dựng hệ thống mạng lưới đa phương tạo thuận lợi cho việc trao đổi các nguồn tài nguyên di truyền.

5. Nguồn gen và kĩ thuật di truyền

Kĩ thuật di truyền đã tạo nên cuộc cách mạng trong phương pháp luận về việc sử dụng nguồn gen. Bất kì một gen tốt nào không kể nó ở sinh vật nào đều có thể được sử dụng. Ví dụ, tơ của loài nhện là một loại protein có độ dẻo gấp 4 - 5 lần so với chất dẻo (như nylon) và độ chắc gấp 2 lần so với sợi thép cùng đường kính. Gen của protein tơ nhện này được tạo dòng ở vi khuẩn để sản xuất ra protein tơ nhện. Kĩ thuật đột biến điểm định hướng được sử dụng để hoàn thiện chất lượng loại protein này nhằm đáp ứng tốt hơn cho mục đích sử dụng của con người. •

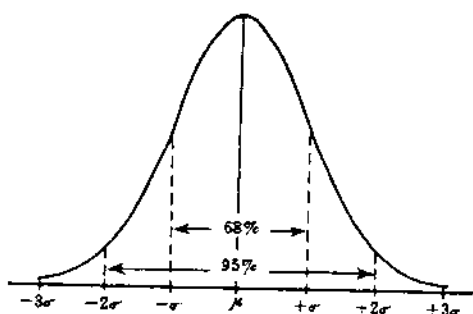
Như vậy, việc xây dựng ngân hàng gen hiện nay không chỉ giới hạn ở các gen của vi sinh vật công nghiệp, của các cây trồng và động vật chăn nuôi, mà của tất cả các sinh vật, miễn các gen đó có lợi về một mặt nào đó.

II. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHỌN GIỐNG

Quá trình chọn giống trải qua nhiều khâu phức tạp, cần có các phương pháp đánh giá chính xác, phương pháp chọn lọc thích hợp và tùy đối tượng mà sử dụng các phương pháp giao phối hợp lí.

1. Các phương pháp đánh giá sự di truyền số lượng

Phần lớn các *tính trạng có ý nghĩa hình tế* ở các cây trồng và động vật nuôi, như khối lượng cơ thể và hạt, số lượng trứng và sữa được tạo ra, năng suất hạt đều có sự *di truyền số lượng* do nhiều gen xác định.



Hình 19.1. Sự phân bố bình thường

Sự nghiên cứu về các tính trạng số lượng (quantitative trait) trong một quần thể lớn thường cho thấy các cá thể có sự phân bố đối xứng theo đường cong hình chuông được gọi là sự *phân bố bình thường* (hình 19.1). Sự phân bố này gần với sự *phân bố kép* (binomial distribution) của phương trình $(p + q)^n$. Phần lớn các cá thể nằm tập trung ở các *trị số trung bình*.

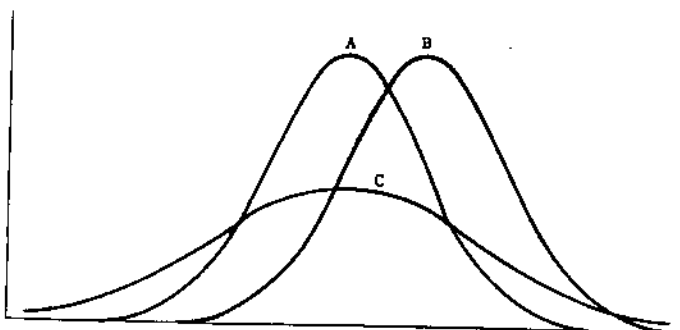
a) Các số đo trung bình

Giá trị trung bình của kiểu hình được biểu thị bằng *trung bình số học* (arithmetic mean), kí hiệu $\bar{X}$, tính theo công thức :

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{N}$$

Σ = Tổng các trị số $X_1, X_2 \dots$ = Các số đo cụ thể.

N = Tổng các cá thể được đo. •



Hình 19.2. So sánh 3 quần thể A, B, C với các số trung bình và phương sai

b) Đo sự biến dị

Xét 3 quần thể được phân bố theo kiểu bình thường như trên hình 19.2. Các quần thể A và C có cùng trị số trung bình, nhưng C có mức biến đổi nhiều hơn A. A và B có trị số trung bình khác nhau nhưng có dạng như nhau.

Như vậy, để xác định sự phân bố bình thường, rõ ràng là phải biết không chỉ trị số trung bình mà còn phải biết *mức biến đổi* hay *biến số* (variability) của quần thể. Một trong những số đo căn bản dùng để đánh giá biến số của quần thể là *độ lệch chuẩn* (standard deviation), được kí hiệu là σ (sigma). Một mẫu lấy từ quần thể một cách ngẫu nhiên sẽ có *độ lệch chuẩn của mẫu* (s) và s được tính theo công thức :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Trong đó : $\bar{X}$ = Giá trị trung bình.

X_i = Số đo của từng mẫu.

$X_i - \bar{X}$ = Độ lệch của một mẫu so với trung bình.

$(X_i - \bar{X})^2$ = Độ lệch bình phương.

n = Số lượng mẫu.

Để tính σ , thay tổng số lượng quần thể (N) cho n của công thức trên. Ví dụ : nếu số mẫu ít hơn 30, thì mẫu số là n - 1; nếu số lượng mẫu lớn hơn, để tính s thì sự khác nhau giữa n và n - 1 là không đáng kể. Nếu các chỉ số khác về căn bản như nhau thì số lượng mẫu càng lớn, s sẽ chính xác hơn và tương ứng σ sẽ xác định tốt hơn.

Khi sử dụng máy tính điện tử có thể dùng công thức đơn giản sau :

$$s = \sqrt{\frac{\sum X^2 - [(\sum X)^2/n]}{n-1}}$$

Một tính chất quan trọng của bất kì sự phân bố bình thường nào là khoảng 2 / 3 các số đo (68%) sẽ nằm trong khoảng giữa độ lệch chuẩn cộng và trừ xung quanh trị số trung bình, tức nếu $\bar{X} = \mu$ thì trong khoảng $\mu \pm \sigma$. Khoảng 95% các số đo sẽ nằm trong khoảng $\mu \pm 2\sigma$ và 99% sẽ ở trong khoảng $\mu \pm 3\sigma$ (xem lại hình 19.1).

Các tính trạng với những số đo trung bình lớn thường tương ứng với độ lệch chuẩn lớn hơn là các tính trạng với số đo trung bình tương đối nhỏ. Như vậy, các tính trạng có số đo khác nhau, nên các *hệ số biến dị* (coefficients of

variation) được sử dụng để so sánh mức biến dị tương đối giữa chúng. Khi chia độ lệch chuẩn với trị số trung bình sẽ nhận được hệ số biến dị độc lập với các đơn vị đo.

Hệ số biến dị = σ / μ đối với một *quần thể*.

Hệ số biến dị = $s / \bar{X}$ đối với một *mẫu*.

c) Phương sai

Bình phương của độ lệch chuẩn được gọi là **phương sai** (variance - σ^2). Phương sai được dùng để biểu hiện biến số (variability). Bằng phương pháp được gọi là "**phân tích phương sai**", **tổng phương sai kiểu hình** có thể chia thành các cấu phần như :

$$\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E = \sigma^2_{GE}$$

Trong đó σ^2_P là tổng phương sai kiểu hình bằng phương sai kiểu gen (σ^2_G) cộng với phương sai môi trường σ^2_E và bằng phương sai của các tương tác giữa kiểu gen với môi trường (genotype - environment interaction) σ^2_{GE} .

Dựa vào công thức trên, bằng cách phân nhỏ tiếp theo, có thể đánh giá các tác động của các nhân tố khác nhau lên sự biểu hiện của kiểu hình. Có thể dùng phương sai để xác định số lượng gen tác động đến tính trạng.

2. Mức di truyền (Heritability)

Thuật ngữ "Heritability" được dịch ra tiếng Việt với 3 thuật ngữ đồng nghĩa : mức di truyền, hiệu suất di truyền và chỉ số di truyền. Các hiểu biết về phần đóng góp tương đối của gen vào sự biến đổi của tính trạng là một trong những nhân tố quan trọng nhất trong việc xây dựng các kế hoạch chọn giống hợp lý nhằm cải thiện các giống vật nuôi và cây trồng. **Biến số** (variability) của các số đo kiểu hình đối với các tính trạng số lượng có thể phân ra thành cấu phần di truyền và không di truyền (do môi trường) :

$$\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E = \sigma^2_{GE}$$

Mức di truyền (kí hiệu h^2 hoặc H) là **tỉ số** giữa phương sai kiểu gen so với tổng phương sai kiểu hình.

$$h^2 = \frac{\sigma^2_G}{\sigma^2_P}$$

Mức di truyền của một tính trạng có các giá trị số từ 0 đến 1. Ví dụ, sự xác định di truyền nhóm máu chỉ do các gen, không chịu tác động của môi trường, nên $\sigma^2_P = \sigma^2_G$ và $h^2 = 1$.

Nếu biến số kiểu hình chỉ do các nhân tố môi trường thì $\sigma^2_P = \sigma^2_E$, $\sigma^2_G = 0$ và $h^2 = 0$.

Có vài phương pháp dùng đánh giá mức di truyền của tính trạng số lượng :

– Mức di truyền có thể được tính ra từ các cấu phần của phương sai. Ví dụ, nghiên cứu các cấu phần phương sai (variance components) của sinh đôi cùng trứng so với sinh đôi khác trứng. Phương sai môi trường (σ^2_E) của sinh đôi khác trứng (như giữa anh chị em) có xu hướng lớn hơn so với phương sai môi trường của sinh đôi cùng trứng.

– Căn cứ vào sự giống nhau về mặt di truyền giữa các cá thể có họ hàng. Ví dụ, các tính trạng có kiểu hình của thế hệ con luôn luôn biểu hiện chính xác giữa các giá trị của cha mẹ bất chấp môi trường, thì các tính trạng đó có mức di truyền hẹp bằng 1. Mặt khác, nếu các tính trạng có kiểu hình, mà kiểu hình của cha mẹ không dùng để dự đoán được kiểu hình của thế hệ con, thì các tính trạng đó có mức di truyền thấp gần bằng 0.

3. Các phương pháp chọn lọc

Sau khi đã có các vật liệu ban đầu, bước tiếp theo là chọn lọc được thực hiện với nhiều phương pháp khác nhau.

a) Chọn lọc hàng loạt (Mass selection)

Trong trường hợp này, *hiều cá thể được gộp chung* lại để làm nguồn khởi đầu cho chọn giống mới. Phương pháp này chỉ áp dụng rộng rãi được khi còn nhiều giống địa phương, vì nó loại bỏ bớt nhiều kiểu gen không tốt. Nếu mức di truyền cao, thì phần lớn biến đổi kiểu hình liên quan đến biến đổi di truyền. Các nhà chọn giống có thể đạt kết quả nhanh căn cứ theo kiểu hình. Thường khi chọn lọc cần có *sự dung hòa trong đánh giá* cùng lúc nhiều tính trạng có lợi khác nhau.

Khi công tác giống đã vào nề nếp thì chọn lọc hàng loạt sẽ được dùng để *phục tráng giống*.

b) Chọn lọc theo họ (Family selection)

Chọn một số lớn cá thể và trồng hạt mỗi cây riêng vào đời tiếp theo thành họ để so sánh với nhau. Từ đó, lựa chọn họ tốt nhất để tạo thành giống mới. Kết quả phụ thuộc vào thành phần di truyền giàu hay nghèo của giống địa phương ban đầu.

Chọn lọc theo họ có giá trị hơn cả khi mức di truyền của tính trạng thấp và các họ có sự giống nhau nhiều do họ hàng gần. Sự tự phối trong từng họ sẽ làm rõ các khác biệt giữa các họ.

c) Thử nghiệm thế hệ (Progeny test)

Thử nghiệm thế hệ là phương pháp đánh giá giá trị chọn lọc căn cứ vào kiểu hình của hậu thế ở động vật. Phương pháp này có giá trị hơn cả đối với các tính trạng :

- Chỉ biểu hiện ở *một giới tính* (ví dụ, đánh giá các gen tạo sữa ở bò đực).
- Chỉ có thể đo được sau khi giết thịt (ví dụ, các đặc tính của bộ xương động vật nuôi).
- Có mức di truyền thấp.

Thử nghiệm thế hệ chỉ có thể thực hiện khi cá thể trưởng thành. Để đánh giá con đực, nó cần được giao phối với vài con cái. Con đực càng có nhiều thế hệ con thì sự đánh giá càng chính xác.

d) Chọn lọc trong dòng thuần

Từ năm 1902 đến 1907, W. Johannsen đã tiến hành thí nghiệm ở đậu tây *Phaseolus vulgaris* để theo dõi tác động của chọn lọc đối với khối lượng hạt.

Hạt giống mua ở thị trường về không đồng đều. Đậu tây là cây tự thụ phấn nên mỗi hạt được chọn lựa tạo một dòng ở thế hệ sau. Ông đã tạo 19 dòng từ các hạt mua về và tiếp tục trồng *so sánh khối lượng hạt* ở đời sau.

Johannsen đã phân hạt trong mỗi dòng ra nặng, trung bình và nhẹ và theo dõi khối lượng hạt của từng cây mọc lên từ 3 loại hạt trên. Sau sáu đời chọn lọc trong dòng hạt lớn, hạt trung bình cũng như trong dòng hạt bé, tuy khối lượng hạt mẹ ban đầu có thể lớn hay bé, nhưng khối lượng trung bình các hạt ở cây con trong các đời sau vẫn đặc trưng cho dòng thuần và khá ổn định. Ví dụ, các hạt ban đầu của một dòng được đem gieo có khối lượng 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 gr đều cho các cây mà khối lượng hạt trung bình tương ứng là 0,475; 0,450; 0,451 và 0,458 gr. Điều này cho thấy sự khác nhau về khối lượng hạt mẹ ban đầu là *do kiểu hình*, nhưng *kiểu gen giống nhau* nên ở đời sau tính trạng khối lượng hạt trung bình vẫn giống nhau.

Thí nghiệm của Johannsen có ý nghĩa quan trọng đối với di truyền học và chọn giống vì :

- *Chọn lọc trong dòng thuần không có hiệu quả* do các cá thể ở đời sau không có phân li về mặt di truyền, độ biến thiên chỉ phụ thuộc vào môi trường.
- *Quần thể tự nhiên gồm nhiều dòng thuần* (khi mua từ chợ về), cho nên lần chọn ban đầu có hiệu quả tạo ra được các dòng thuần khác nhau.

4. Các phương pháp giao phối (*Mating methods*)

Trong chọn giống, tùy các đối tượng cụ thể có thể sử dụng các kiểu giao phối khác nhau.

a) Giao phối ngẫu nhiên (Random mating hay Panmixis)

Các cây thụ phấn chéo được giao phối ngẫu nhiên nhờ gió hay côn trùng mang phấn hoa đến. Trong chăn nuôi, có thể xảy ra giao phối ngẫu nhiên trong đàn. Kiểu giao phối này tạo ra sự đa dạng lớn ở hậu thế.

b) Giao phối đồng huyết (Inbreeding)

Đây là sự giao phối giữa các cá thể có *họ hàng rất gần*. Trong chăn nuôi, sự giao phối nhân tạo từng đôi anh chị em từ một đôi bố mẹ gọi là *nội giao phối* hay *giao phối đồng huyết*. Kiểu giao phối này có thể tạo ra các dòng thuần đồng huyết.

c) Sự tự phối và ưu thế lai

Trong tác phẩm "Nguồn gốc các loài", Darwin đã nhận xét rằng lai tạo làm cho hậu thế có sức sống tốt hơn. Hiện tượng ưu thế lai được phát hiện rõ nhất ở bắp từ năm 1935. Bắp là *cây thụ phấn chéo*, nhưng nếu cho *tự thụ phấn bắt buộc* liên tiếp nhiều đời (7đời) sẽ nhận được các *dòng tự phối* (inbred line) có các cá thể tương đối đồng nhất, nhưng sức sống và chiều cao giảm rõ rệt so với các dạng khởi đầu đem tự thụ. Nếu lai các dòng tương đối thuần này với nhau, một số tổ hợp lai cho đời lai F_1 tiếp ngay sau có biểu hiện *ưu thế lai*: chúng có sức sống rõ ràng mạnh hơn các bố mẹ khỏe nhất và thường tốt hơn so với các cá thể của giống bình thường nuôi trồng đại trà.

Ưu thế lai không chỉ biểu hiện ở các thế lai giữa các dòng thuần mà còn có thể biểu hiện giữa các dạng khác nhau ít nhiều về mặt di truyền.

Trong thực tế, một số cá thể của giống bình thường có thể tốt hơn thế lai về mặt này hay khác, nhưng tính hơn hẳn của giống lai F_1 là ở chỗ chúng có *mật độ đồng đều* về năng suất cũng như về phẩm chất mà các giống bình thường khác thường không bì kịp. Tuy nhiên, việc nhận được các dòng ban đầu mà con lai F_1 của chúng có năng suất vượt trội không dễ dàng. Chính nhờ điều này mà các công ti giống mới kinh doanh được hạt lai F_1 và doanh số kinh doanh hạt lai trên thế giới khoảng 34 tỉ USD mỗi năm. Nhà sản xuất hạt lai giữ giống các dòng ban đầu, dùng chúng tạo hạt lai F_1 và bán ra thị trường với số lượng lớn mà không sợ mất giống. Người sử dụng hạt lai tuy phải mua giống với giá cao hơn, nhưng thu được lợi nhuận cao hơn so với dùng giống thường và vì chỉ F_1 có năng suất cao nên họ phải mua hạt lai thường xuyên.

Để giảm công sức tạo hạt lai, các nhà chọn giống sử dụng các dòng *cây mẹ bất thụ đực* và hạt của các cây này chính là F_1 lai vì nhận phần hoa từ dòng thứ hai.

Các đặc điểm của động vật làm cho việc chọn giống dựa vào các *dòng đồng huyết* tốn nhiều công phu và tiến hành chậm vì không có mẫu mực ổn định. Các con giống có tiếng giá rất đắt, thường là kết quả của giao phối cận huyết kèm theo sự chọn lọc khắc nghiệt và có tính toán kĩ của nhà chọn giống.

Trong chăn nuôi, người ta sử dụng phổ biến *lai hình tế*, là dạng lai phối hợp bố mẹ thuộc các giống khác nhau, con lai F_1 chỉ dùng để thu sản phẩm, không làm giống. Vấn đề cốt lõi là phải chọn được cặp bố mẹ ban đầu thích hợp, chỉ chuyên nuôi để sinh ra con lai F_1 làm hàng hóa, không dùng đến đời F_2 . Để đạt hiệu quả cao nhất, bố mẹ phải thuộc *giống thuần* có tính trạng ổn định để đảm bảo nhiều khả năng tạo *con lai đồng nhất*.

Nhiều kiểu giao phối khác nhau được sử dụng để tăng năng suất vật nuôi và cây trồng.

III. CHỌN GIỐNG VI SINH VẬT

Các thành tựu của công nghiệp vi sinh vật không thể tách rời với những tiến bộ nhảy vọt trong chọn các chủng vi sinh vật có năng suất cao. Các phương pháp di truyền học được ứng dụng vào chọn giống làm tăng năng suất các sản phẩm, làm biến đổi bản chất hóa học các chất và khắc phục một số nhược điểm của chủng được dùng trong sản xuất công nghiệp.

1. Chọn giống đột biến

Phương pháp chọn giống, không sử dụng kĩ thuật di truyền, chủ yếu ở các vi sinh vật là gây các đột biến cảm ứng bằng các tác nhân vật lí (tia X, tia UV) và các tác nhân hóa học. Phương pháp chọn giống này có các đặc điểm :

— Thu nhận kết quả rất nhanh.

— Chỉ đánh giá sản phẩm thu được, không cần biết các biến đổi sinh lí - sinh hóa.

Quá trình chọn giống các chủng *Penicillium chrysogenum* ở Mĩ có thể lấy làm ví dụ điển hình cho phương pháp này (bảng 19.1).

BẢNG 19.1. Quá trình chọn giống các chủng *Penicillium chrysogenum* trong sản xuất penicilline.

Sản lượng mg/l	Kí hiệu chủng	Tác nhân và các bước chọn	Nơi thực hiện
60 mg/l	NRRL - 1951	Đột biến ngẫu nhiên	Northern regional research Lab.
	↓		
150 mg/l	NRRL-1951-B 25	Tia X	Carnegie institute
	↓		
300 mg/l	X - 1612	Tia UV	University of Wisconsin
	↓		
500 mg/l	Wis - Q - 176↓	Tia UV	
	↓	(6 bước)	
	↓		
	↓		
	↓		
	↓		
	↓	Tia UV	
	↓	(12 bước)	
	↓		
	↓		
	↓		
7.000mg/l	E.15.1		Eli-Lilly Ltd.

Dòng ban đầu có sản lượng 60 mg/l, chọn các đột biến ngẫu nhiên được dòng 150 mg/l và sau đó sử dụng các đột biến nhận được do tác động tia X và UV. Việc chọn lọc theo nguyên tắc : lấy dòng có sản lượng cao nhất gây đột biến rồi chọn chủng có năng suất cao hơn. Qua nhiều bước trung gian cuối cùng nhận được dòng E.15.1 có sản lượng 7000 mg/l. Trong bảng 19.1 trên không nêu một thành tựu quan trọng là tạo chủng không sản sinh ra sắc tố độc và đỡ phải tốn kém nhiều cho việc loại bỏ sắc tố. Việc nhận các **đột biến không tổng hợp sắc tố** đã làm giảm đáng kể chi phí sản xuất và các dòng này được sử dụng để nâng cao năng suất trong quá trình chọn giống tiếp theo.

Phương pháp chọn giống đột biến được sử dụng để tạo các chủng sản sinh ra nhiều amino acid (như glutamic acid) hay các nucleotide. Ngoài ra còn có thể nhận các đột biến liên quan đến cơ chế điều hòa trao đổi chất :

– Các *đột biến cơ cấu* (Constitutive mutants) : tạo sản phẩm không cần chất cảm ứng (inducer).

– Các *đột biến kháng ức chế ngược* là các đột biến tạo sản phẩm nhiều mà không bị ức chế bởi sản phẩm cuối (end product repression).

2. Tạo các giống vi sinh vật nhờ kỹ thuật di truyền

Các vi sinh vật như *E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae* là những đối tượng đầu tiên được sử dụng trong kỹ thuật di truyền để sản xuất các protein của người (bảng 19.2). Về sau nhiều vi khuẩn khác cũng được sử dụng cho mục đích này.

BẢNG 19.2. Một số sản phẩm protein do các vi sinh vật chuyển gen tạo ra

Sản phẩm protein	Vi sinh vật mang gen	Sử dụng
Insulin người	<i>E.coli</i>	Chữa bệnh tiểu đường.
Hormone tăng trưởng của người (GH)	<i>E.coli</i>	Chữa bệnh lùn.
Nhân tố tăng trưởng biểu bì (EGF - Epidermal growth factor)	<i>E.coli</i>	Chữa bỏng và loét.
Nhân tố hoại tử khối u (Tumor necrosis factor - TNF)	<i>E.coli</i>	Diệt một số tế bào ung thư.
Interleukin - 2 (IL - 2)	<i>E.coli</i>	Kích thích chống ung thư.
Prourokinase	<i>E.coli</i>	Trị bệnh tim.
Hormone tăng trưởng của heo	<i>E.coli</i>	Làm tăng trọng heo thiếu.
Hormone tăng trưởng của bò	<i>E.coli</i>	Tăng trọng bò.
Cellulase	<i>E.coli</i>	Phân hủy cellulose trong thức ăn chăn nuôi.
Snomax (R)	<i>Pseudomonas</i>	Làm tuyết nhân tạo.
α và β - Interferon	<i>E.coli</i> và <i>S. cerevisiae</i>	Trị ung thư và nhiễm bệnh virus.
Vaccin viêm gan siêu vi B.	<i>S. cerevisiae</i>	Phòng bệnh nhiễm viêm gan B.

Kĩ thuật đột biến điểm định hướng được sử dụng để làm thay đổi trao đổi chất trong sản xuất các phân tử nhỏ (chương XIV).

IV. CHỌN GIỐNG Ở THỰC VẬT

Theo Borlaug (1983), trong khoảng 3000 loài thực vật nuôi sống con người từ 10.000 năm nay, chỉ có khoảng 30 loài làm nguồn lương thực và thực phẩm chủ yếu. Sự cải thiện các giống cây trồng được thực hiện từ xa xưa và phát triển mạnh sau thế chiến thứ II nhờ những thành tựu của di truyền học. Các giống mới được tạo ra ngày càng nhiều đã làm tăng đáng kể sản lượng nông nghiệp, chủ yếu là ngũ cốc. Người ta đánh giá rằng chỉ riêng các *giống mới đã góp phần một nửa* vào sự tiến bộ của nông nghiệp sau thế chiến thứ II. Ví dụ, lúa mì có sản lượng 20 tạ / ha năm 1945, đã đạt 55 tạ / ha vào đầu những năm 1980. *Nửa phần còn lại* của sự tiến bộ nông nghiệp do các *thay đổi trong kĩ thuật* canh tác (cơ giới hóa, phân bón...). Cuộc "Cách mạng xanh" đã làm tăng vọt sản lượng của 2 cây ngũ cốc chính là lúa mì và lúa nước giúp cho nhiều nước tự thỏa mãn được nhu cầu lương thực.

Các nhà chọn giống phải thỏa mãn nhiều mục tiêu trong cải thiện giống cây trồng :

- Thích nghi với các điều kiện khí hậu địa phương.
- Kháng sâu bệnh.
- Năng suất cao.
- Mùi, vị, màu sắc hấp dẫn người tiêu thụ.
- Đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng và vệ sinh.
- Thuận tiện cho bảo quản lâu (như đông lạnh).
- Không bị dập khi vận chuyển.

Các ứng dụng của kĩ thuật di truyền vào chọn giống đã tạo nên bước phát triển mới làm thay đổi nội dung của ngành trồng trọt.

1. Chọn giống cổ điển và cải thiện giống cây trồng

a) Chọn giống cổ điển

Chọn giống là một quá trình lâu dài hàng chục năm. Hình 19.3 mô tả sơ đồ chọn một giống lúa mì từ khi bắt đầu lai đến lúc được công nhận giống.

1984 Đồng chame	F_0	A bông dài, hữu thụ kém × B bông ngắn, hữu thụ	Số cây hoặc dòng được trồng	Số cây hoặc dòng được giữ lại
1985 Các cây	F_1		50	50
1986 Các cây	F_2		5 000	250
1987 Đồng tử bông	F_3		250	50
1988 Đồng tử bông	F_4		100	25
1989 Thử	F_5		25	5
1990 Thử lại	F_6		3	3
1991 1992 1993 Các dòng song song	$F_7 - F_8$		3	1
1994 Ghi vào danh mục giống	F_{10}		1	1

Hình 19.3. Sơ đồ chọn một giống lúa mì

Các chấm đen chỉ cây, gạch đen chỉ dòng, đường có mũi tên chỉ cây được chọn trồng tiếp.

Hai dòng ban đầu : — A có bông dài độ hữu thụ thấp

— B có bông ngắn độ hữu thụ cao

Quá trình chọn giống lúa mì này bắt đầu từ lai dòng A có **bông dài** nhưng **độ hữu thụ kém** với dòng B có **bông ngắn** nhưng **độ hữu thụ cao**, nhằm tạo giống có bông dài có độ hữu thụ cao. Các cây F_1 được tự thụ phấn

tạo F_2 . Ở F_2 các cây mang cả hai đặc trưng tốt được lựa chọn gieo thành họ ở F_3 . Hạt của các cá thể tốt của F_3 được gieo tiếp thành F_4 , quá trình thực hiện đến F_{10} , trong đó các cá thể F_7, F_8, F_9 được thử nghiệm đại trà và F_{10} được công nhận giống.

Nhà chọn giống đã thực hiện nhiều tổ hợp lai, có cả lai ngược để cuối cùng chọn một dòng tốt nhất và chỉ quan tâm đến một ít gen có lợi. Quá trình chọn giống này được thực hiện trong một thời gian dài và phổ biến hiện nay.

b) Cải thiện giống cây trồng

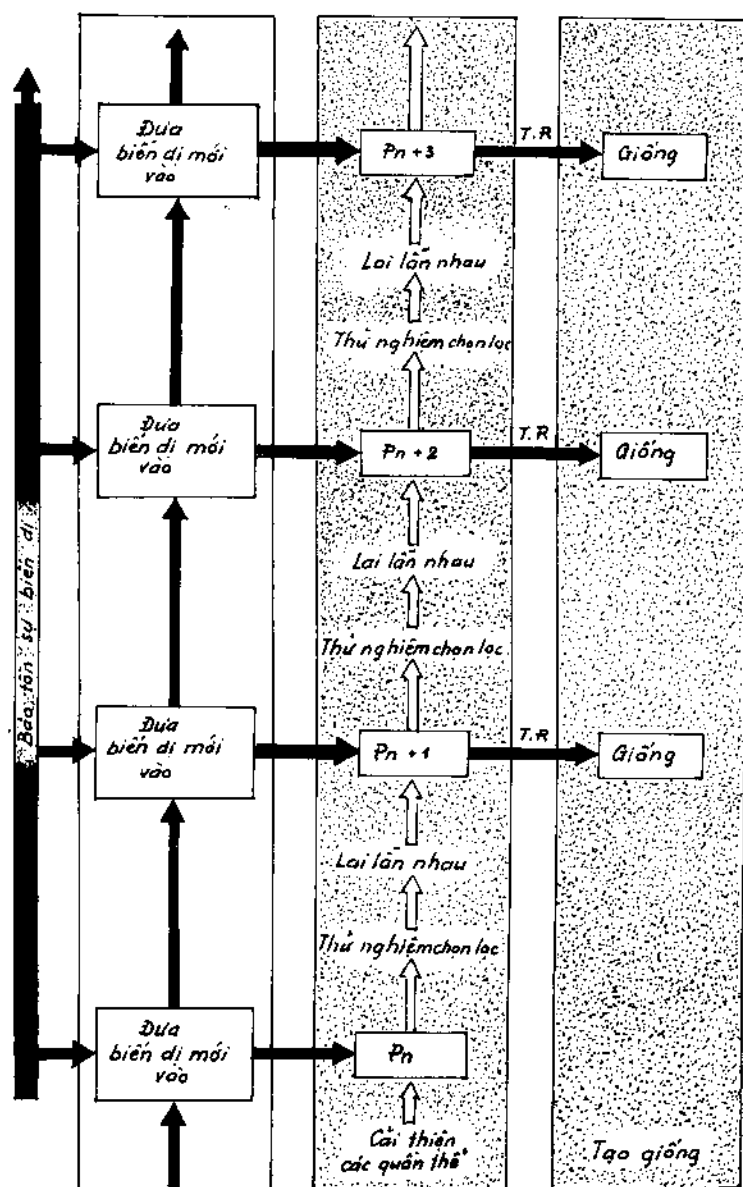
Từ năm 1935, các dạng bắp lai ở Mỹ đã đem lại nguồn lợi nhuận rất lớn. Tuy nhiên đến những năm 1960, các nhà chọn giống đã chạm phải "*trần*" trong nâng cao sản xuất. Nguyên do là *nhiều gen có lợi khác* không "lọt vào mắt" nhà chọn giống và vì thế các giống mới được tạo theo kiểu cổ điển, nghèo vốn gen và có lợi chung cho sự phát triển của thực vật. Phương pháp *chọn lọc lặp lại* (recurrent selection) ra đời. Nó dựa trên quan điểm rằng muốn có tiến bộ lâu dài trong nâng cao năng suất thì phải *cải thiện chính các quần thể* mà từ đó lựa ra các dòng tốt nhất.

Hình 19.4 mô tả phương pháp *chọn lọc lặp lại*. Xuất phát điểm là một quần thể không đồng nhất (P_n) qua nhiều thế hệ lai ngẫu nhiên. Từ quần thể đó, chọn những cá thể có triển vọng hơn cả lai với nhau một cách ngẫu nhiên để tạo quần thể mới P_{n+1} . Quần thể mới P_{n+1} được cải thiện này là điểm xuất phát để lặp lại chu trình với các cá thể tốt nhất, tạo các quần thể P_{n+2} và tiếp tục. Trong mỗi loài, có thể chọn các dòng có lợi theo phương pháp cổ điển và cố định chúng bằng tự thụ hay đơn bội hóa.

Ưu điểm căn bản của phương pháp mới là tách thành hai quá trình khác nhau: *cải thiện* (improvement) và *chọn lọc* (selection). Sự cải thiện thường xuyên các quần thể làm nâng cao giá trị trung bình của các giống. Các hiệu quả được duy trì ở tất cả các giai đoạn làm cho sự đa dạng di truyền ban đầu được duy trì càng nhiều càng tốt, tránh đi sự loại bỏ các tính trạng có lợi khác và tránh sự đồng huyết. Có thể bổ sung thường xuyên nhiều tính trạng có lợi vào quần thể mới.

Phương pháp mới này đã nâng cao đáng kể năng suất của bắp sau những năm 60, nó có thể áp dụng cho nhiều loại cây trồng khác.

Quan điểm mới trong chọn giống hiện nay là phải *cải thiện giống thường xuyên* để duy trì *quần thể tốt*.



Hình 19.4. Chọn lọc lặp lại

$P_n, P_{n+1}, P_{n+2}, P_{n+3}$ là các quần thể được thực hiện lại

T = chọn lọc theo phương pháp cổ điển . R = cố định dòng

2. Chọn giống tế bào thực vật *in vitro*

Tế bào thực vật có **tính toàn thể** (totipotence) : có thể lấy mô ở đỉnh tăng trưởng hay chóp rễ nuôi cấy để tạo cây ra hoa và có hạt. **Kỹ thuật nuôi cấy mô** góp phần quan trọng trong nhân và chọn giống cây trồng có năng suất cao và đồng nhất. Ngoài ra, có thể **nuôi các tế bào sinh dục** (túi phôi) để nhận được **cây đơn bội** (nếu không thì cũng hình thành các dòng tế bào mô sẹo gọi là callus).

a) Biến dị dòng soma (Somaclonal variation)

Nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật, có thể thu nhận các vật liệu cho **chọn giống ở mức tế bào (*in vitro*)**. Khi nuôi cấy mô tế bào thực vật trên môi trường nhân tạo chúng sinh sản thành nhiều dòng với biến dị cao hơn mức bình thường, được gọi là **biến dị dòng soma**. Tế bào ban đầu được nuôi có $2n$ nhiễm sắc thể, chúng chia nguyên phân nhưng thường tạo các dòng tế bào có số lượng nhiễm sắc thể thay đổi.

b) Chọn giống từ các dòng giao tử

Các hạt phấn riêng lẻ có thể mọc trên môi trường nhân tạo thành **dòng tế bào đơn bội**. Các dòng này mang các kiểu gen khác nhau, biểu hiện sự **đa dạng của các giao tử**, sản phẩm của giảm phân. Chúng có bộ gen **đơn bội** nên các allele lặn có sự biểu hiện bình thường. Trong mỗi hộp Petri có thể nuôi hàng trăm dòng tế bào giao tử và tiến hành chọn lọc *in vitro* ở mức độ tế bào. Phương pháp này đặc biệt có hiệu quả cao khi mục tiêu chọn là các **dạng đề kháng** với các tác nhân bất lợi của môi trường như kháng thuốc diệt cỏ, chịu lạnh, kháng bệnh, kháng phèn, mặn ... Cách tiến hành tương tự như chọn lọc các vi sinh vật vì mỗi hạt phấn mọc lên thành một cụm như một khuẩn lạc vi sinh vật.

Ví dụ : Muốn chọn dòng lúa chiêm chịu lạnh, các nhà chọn giống lấy hạt phấn của lúa chiêm cấy trên môi trường nhân tạo trong các hộp Petri (thường dùng để nuôi vi sinh vật) và đưa vào điều kiện lạnh $8 - 10^{\circ}\text{C}$. Các dòng chịu lạnh sẽ mọc, còn các dòng khác không mọc. Như vậy, từ một số lượng lớn các giao tử có kiểu gen khác nhau sẽ chọn được các dòng chịu lạnh.

Các dòng đơn bội qua chọn lọc được **lưỡng bội hóa** bằng hai cách :

- Gây lưỡng bội hóa dòng tế bào thành $2n$ và cho mọc thành cây lưỡng bội.

- Cho mọc thành cây đơn bội rồi sau đó lưỡng bội hóa thành cây lưỡng bội $2n$.

Ưu điểm thứ hai của phương pháp chọn giống *in vitro* này là các dòng nhận được đều **thuần chủng**, vì chúng là kết quả của sự lưỡng bội hóa từ bộ gen đơn bội ban đầu.

c) Dung hợp tế bào trần

Nếu những tế bào mô sẹo (callus) cho xử lí các enzyme làm tan vỏ tế bào, tế bào sẽ mất vách trở thành **tế bào trần** (protoplast). Những tế bào trần có thể lai hay dung hợp với nhau. **Sự dung hợp tế bào trần** có thể được thực hiện **giữa các loài** khác nhau để tạo giống. Lúc đầu, nhiều người hi vọng có thể tạo được giống mới do sự kết hợp những tính trạng tốt của hai loài. Tuy nhiên, các dung hợp này thường có sự loại bỏ nhiễm sắc thể trong phân bào và không ổn định. Cho đến nay, người ta chỉ nhận được cây *pomato* là cây lai giữa cà chua và khoai tây và phải giữ giống khó khăn trong điều kiện thí nghiệm.

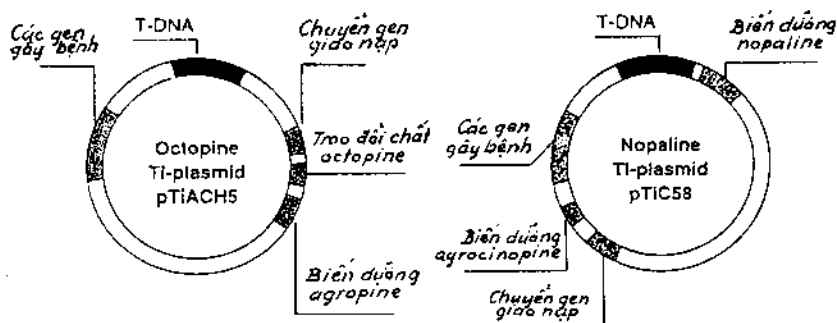
3. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

Từ sau 1980, nhờ phát hiện vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* gây khối u ở thực vật, việc chuyển gen ở thực vật có bước phát triển nhảy vọt. Việc **tạo giống bằng kĩ thuật di truyền** đã mở ra nhiều ứng dụng mới cho trồng trọt: không chỉ sản xuất các chất bột đường với năng suất cao, mà còn có thể sản xuất các protein trị liệu, máu, các kháng thể và chất dẻo. Các thực vật chuyển gen mới đã đạt đến **thế hệ thứ ba** (xem chương XIV). Ngoài ra, thời gian chọn giống được rút ngắn đáng kể.

Do tế bào thực vật có vách cứng nên các nhà nghiên cứu đã tìm nhiều phương pháp khác nhau để đưa gen vào bên trong tế bào.

a) Chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*

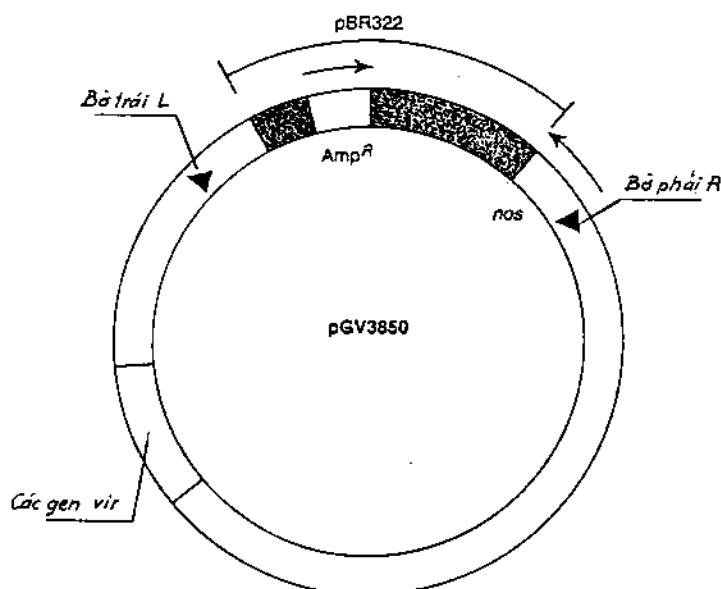
Phương pháp chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* được thực hiện chủ yếu qua **Ti-plasmid** (hình 19.5).



Hình 19.5. Sơ đồ các gen của Ti-plasmid

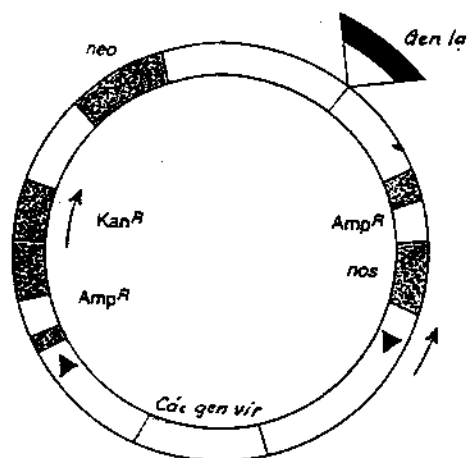
DNA nguyên vẹn của Ti-plasmid không tìm thấy ở các tế bào thực vật bị khối u, nhưng thấy đoạn gọi là T-DNA (khoảng 23kb) được gắn vào DNA của nhân tế bào thực vật. T-DNA chứa các gen mã hóa cho sinh tổng hợp auxine, cytokinine, opine và các oncogene gây khối u.

Ti-plasmid được cải biến cho phù hợp với việc chuyển gen vào thực vật (hình 19.6). Các plasmid cải biến gồm hai dạng : *vector đồng nhập* (cointegrated vector) (hình 19.7) và *vector kép* (binary vector).



Hình 19.6. Cấu trúc của Ti-plasmid pGV 3850

T-DNA có hai bờ : phải R và trái L. Nhiều gen có hại đã bị cắt bỏ (như các oncogene), một đoạn của plasmid pBR322 được ráp vào các gen vir và nos



Hình 19.7. Ti-plasmid đồng nhập có hai bờ

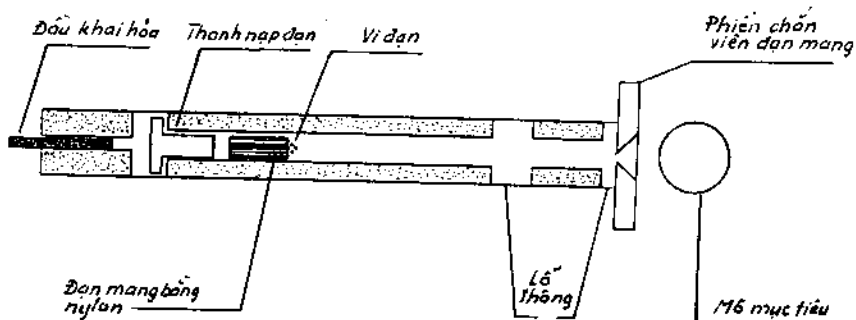
b) Các virus

Nhiều virus như *CaMV* (Cauliflower mosaic virus), *geminivirus*, *virus đốm thuốc lá* được dùng làm *vector chuyển gen ở thực vật*.

c) Chuyển gen trực tiếp

Có nhiều phương pháp *chuyển gen trực tiếp* (direct transfer) như : sử dụng liposome, điện biến nạp (electroporation), qua ống phần, vi tiêm, bắn gen, dùng silicon carbide.

Một trong những phương pháp mới để đưa gen vào tế bào thực vật là sử dụng *tốc độ cao của vi đạn đạo (microprojectile)* mang RNA hay DNA xuyên vào trong tế bào. Hình 19.8 mô tả súng bắn vi đạn đạo được bao bởi DNA và mô thực vật. Các hạt tungsten hay vàng (hình cầu có đường kính 1 - 4 μ m) được bao bởi DNA và bắn với tốc độ cao vào tế bào.



Hình 19.8. Súng bắn vi đạn đạo

Quá trình *bắn vi đạn đạo* được gọi là *biolistics*.

Hai phương pháp vật lý được dùng để chuyển gen vào thực vật là *vi tiêm* (microinjection) và *biến nạp qua trung gian các sợi silicon carbide* (silicon carbide whisker - mediated transformation). Vi tiêm có thể được thực hiện dễ dàng đối với tế bào trần cố định trên alginate. Hiệu quả có thể đạt 20% đối với tế bào cây thuốc lá.

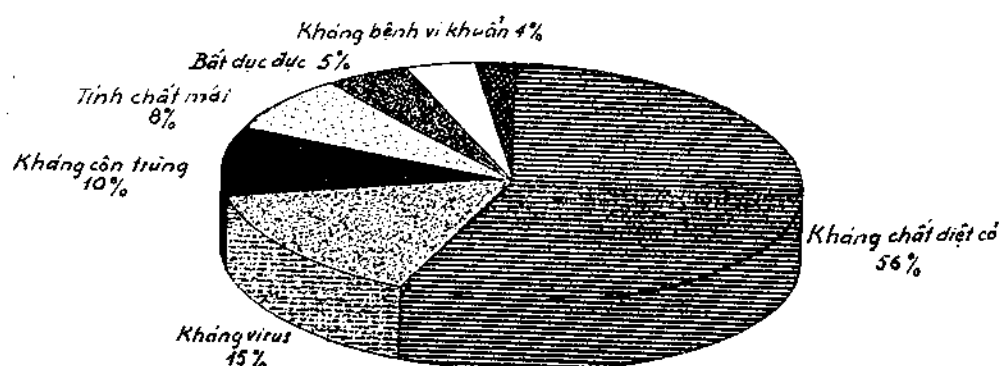
Việc trộn chung các plasmid DNA với tế bào của bắp, lúa trong sự hiện diện của các *sợi silicon carbide* là phương pháp đơn giản và ít tốn kém để tạo các thực vật nhiễm gen lạ. Trong quá trình lắc của dung dịch, các sợi mảnh của silicon carbide tương tự như những cây kim làm thủng vách tế bào để plasmid DNA xâm nhập vào trong.

Ở thực vật, ngoài vài chục *gen đánh dấu* (gene marker), nhiều *gen thông báo* (reporter gene) được sử dụng để theo dõi sự xâm nhập của các gen vào trong tế bào. Ví dụ : Gen *gusA* (*uidA*) mã hóa cho β -glucuronidase (GUS)

có khả năng thực hiện phản ứng màu xanh dưới ánh sáng huỳnh quang khi biến đổi cơ chất X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide). Gen *gusA* được sử dụng để **nhận biết promoter** nằm trước gen mã hóa tính trạng. Gen đánh dấu **kháng kanamycin** có trong khoảng 80% các thực vật chuyển gen được thử nghiệm trên đồng ruộng.

4. Các tính trạng đã được chuyển gen ở thực vật

Hình 19.9 cho thấy rõ các tính trạng được chuyển gen và tỉ lệ thực hiện việc chuyển gen qua các **thực vật chuyển gen** được thử nghiệm trên đồng ruộng từ năm 1987 đến 1992 (theo OECD).



Hình 19.9. Các tính trạng của các thực vật chuyển gen được thử nghiệm trên đồng ruộng từ năm 1987 đến 1992 (theo OECD)

a) Tính đề kháng thuốc diệt cỏ

Tính đề kháng thuốc diệt cỏ, côn trùng và bệnh có **sự di truyền đơn gen**. Đa phần các thực vật chuyển gen được nhận các **gen để kháng thuốc diệt cỏ** (56%). Cho đến cuối năm 1992, có 489 trường hợp được thử nghiệm ra đồng ruộng, gồm các cây cải dầu, bắp, củ cải đường và đậu nành. Điều đặc biệt là kĩ thuật di truyền đã chuyển các gen để kháng căn cứ vào **phương thức tác động** của các chất diệt cỏ (bảng 19.3), chứ không phải chỉ căn cứ kiểu hình như trước đây. Như vậy, kĩ thuật di truyền cho phép can thiệp vào trao đổi chất của thực vật để tạo nên tính chất mới cho giống.

BẢNG 19.3. Phương thức tác động của các chất diệt cỏ và phương pháp tạo thực vật để kháng bằng kĩ thuật di truyền

Chất diệt cỏ	Con đường bị kìm hãm	Enzyme mục tiêu	Cơ sở của tính để kháng được thiết kế (engineered).
Glyphosate	Sinh tổng hợp amino acid mạch vòng (Aromatic amino biosynthesis).	5-enol-pyruvyl shikimate - 3 - phosphate (EPSP) synthase	Sự biểu hiện dư (Over-expression) của gen thực vật EPSP hay đưa gen <i>aro A</i> của vi khuẩn kháng glyphosate.
Sulphonylurea	Sinh tổng hợp amino acid mạch nhánh (Branched-chain amino acid biosynthesis).	Acetolactate synthase (ALS)	Đưa gen kháng ALS.
Imidazolinones	Sinh tổng hợp amino acid mạch nhánh.	Acetolactate synthase (ALS)	Đưa gen ALS đột biến.
Phosphinothricin	Sinh tổng hợp glutamine (Glutamine biosynthesis).	Glutamine synthetase	Biểu hiện dư của glutamine synthetase hay đưa gen <i>bar</i> làm mất độc tính của chất diệt cỏ.
Atrazine	Hệ thống quang II (Photosystem II).	Q _B	Đưa gen đột biến ở protein Q _B hay đưa gen mã hóa glutathione-S-transferase có khả năng làm mất độc tính của atrazine.
Bromoxynil	Quang hợp (Photosynthesis).		Đưa gen nitrilase làm mất độc tính của bromoxynil.

Trong số các thực vật thử nghiệm, đa phần (75%) để kháng glyphosate hoặc glufosinate.

b) Kháng bệnh và côn trùng

Số lượng các thử nghiệm xếp thứ hai là các thực vật kháng bệnh và côn trùng như :

- Kháng virus (15%) : Sự đề kháng thông qua protein vỏ virus được thử nghiệm ở các cây : khoai tây, cà chua, củ cải đường, thuốc lá và một số cây khác.

- Kháng bệnh vi khuẩn (4%) chủ yếu thực hiện ở khoai tây.

- Kháng côn trùng (10%) : Được thực hiện nhờ *gen tạo δ-endotoxin* từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (gọi tắt là BT). Gen này được chuyển vào các cây trồng : khoai tây, bông vải, bắp, cà chua và thuốc lá.

c) Biến đổi các tính chất thực phẩm và protein

Ngoài các ví dụ đã nêu ở chương XIV, sau đây là vài ví dụ khác :

Ví dụ 1 : Cây *Thaumatococcus danielli* ở châu Phi có chất *thaumatin* là một peptide ngọt gấp 10.000 lần đường sucrose ở nồng độ 10^{-8} mole. Việc chuyển gen mã hóa chất này vào khoai tây đã có kết quả : củ, thân, lá đều ngọt. Xu hướng hiện nay là chuyển gen này vào dâu tây và dưa bở (melon) với hi vọng chúng sẽ rất ngọt nhưng giảm lượng đường trong trái.

Ví dụ 2 : Giống *cà chua chín chậm* đã được bán rộng rãi trên thị trường ở Mĩ. Giống này có ưu thế là không bị dập khi vận chuyển.

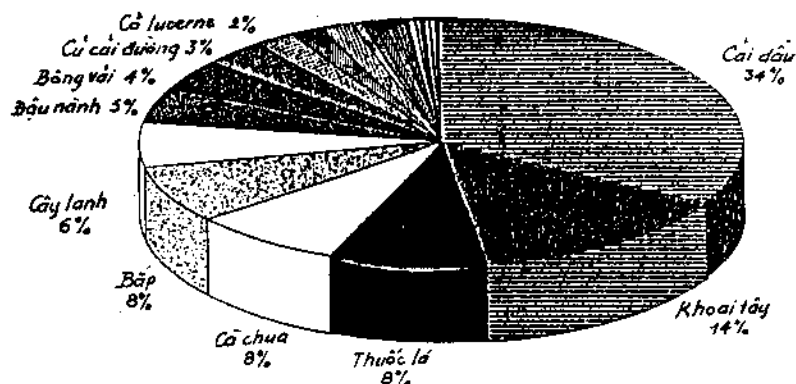
d) Các mục tiêu khác

Có thể tạo các thực vật chuyển gen với nhiều mục tiêu khác như :

- Tạo bất dục đực (5%).
- Sản xuất protein kháng thể : Đã thành công trong việc đưa gen tạo kháng thể vào cây thuốc lá và năng suất đạt được là 1,3 % khối lượng khô.
- Chuyển gen mã hóa cho PHB của vi khuẩn vào thực vật để sản xuất chất dẻo.
- Tạo những sắc tố mới ở cây cảnh. Ví dụ : Chuyển các gen tạo các sắc tố khác nhau vào các loại cây cảnh để có hoa với màu sắc theo ý muốn.

5. Các thực vật đã được chuyển gen

Trong khoảng 1987 - 1992, 1200 thực vật đã chuyển gen được thử nghiệm trên đồng ruộng. Đáng kể trong số đó là 290 (34%) loại cây cải dầu *Brassica napus* (rape canola), 133 loại cây khoai tây (14%) và nhiều loại cây khác như thuốc lá (8%), cà chua (8%), bắp (8%), lanh (6%), đậu nành (5%), cây bông cải (4%), củ cải đường (3%) và cỏ lucerne (2%) đã được thử nghiệm đến cuối năm 1992 (hình 19.10).



Hình 19.10. Các thực vật được thử nghiệm từ năm 1987 đến 1992

Cây cải dầu được thực hiện chuyển gen để kháng thuốc diệt cỏ, côn trùng và biến đổi dầu của hạt. Nó được chú ý nhiều trong việc chuyển gen có lẽ vì :

- Dầu tách ra từ hạt không mang sản phẩm của gen được chuyển vào, nên có độ an toàn về thực phẩm.

- Biến đổi các acid béo để có thể sử dụng vào mục đích công nghiệp. Thành công trong tạo giống mới theo hướng này sẽ đem lại hiệu quả kinh tế lớn.

Ngoài ra, gần đây việc đưa các gen của người vào cải dầu và cho biểu hiện ở mô tạo dầu làm cho việc chiết tách các protein này được dễ dàng và rất thuận tiện. Hiện nay, trong xu hướng tăng cường chuyển gen người vào thực vật để tránh virus động vật thì cải dầu là đối tượng đầy hứa hẹn.

Số lượng các thực vật chuyển gen được thử nghiệm trên đồng ruộng trên thế giới hiện nay **tăng gần gấp đôi** sau mỗi năm. Năm 1993, khoảng 540 thử nghiệm mới đã được thực hiện ở Mĩ. Có thông báo rằng năm 1993, ở Trung Quốc các thực vật chuyển gen được thử nghiệm trên đồng ruộng với diện tích 2.000 ha.

Ngoài ra, việc xác định trình tự nucleotide của các bộ gen của nhiều thực vật như *Arabidopsis thaliana*, lúa nước (*Oryza*),... sẽ thúc đẩy nhanh quá trình chọn giống thực vật.

V. CHỌN GIỐNG Ở ĐỘNG VẬT

Trước đây, chọn giống động vật gặp rất nhiều khó khăn do số lượng cá thể ít, giá trị cao và giao phối không đơn giản như thực vật. Hơn 10 năm sau khi ra đời, kĩ thuật tái tổ hợp DNA được sử dụng để đưa các gen lạ vào động vật, tạo ra các **động vật chuyển gen** (transgenic animals) và gen được chuyển gọi là **gen chuyển** (transgene). Việc chuyển gen này góp phần đáng kể vào việc chọn giống động vật vì :

- Giúp đưa nhiều tính trạng mới vào động vật mà trước đó chưa hề có.

- Đưa tính trạng có sẵn vào động vật nhanh hơn các phương pháp chọn giống thông thường (lai và chọn lọc).

Một đóng góp quan trọng của chuyển gen ở động vật là tạo các động vật mang gen bệnh của người làm **mô hình nghiên cứu**.

1. Các phương pháp chuyển gen

Có nhiều phương pháp đưa các gen vào tế bào động vật :

– **Vi tiêm** (Microinjection) là phương pháp thông dụng hơn cả. DNA được bơm thẳng vào hợp tử ở giai đoạn nhân non (pronucleus).

– Sử dụng các **vector là virus** như : SV40, BPV (bovine papillomavirus, retrovirus).

– Phương pháp dùng **tế bào cuống phôi** (stem embryonic cells hay stem cell insertion) : Trong phôi có những tế bào căn bản có khả năng phân chia mạnh, người ta lấy tế bào này ra, thực hiện biến nạp rồi cấy trở lại vào phôi.

– Phương pháp dùng **tinh trùng** như vector mang gen : Nếu bơm DNA vào tinh trùng thì tinh trùng có thể đưa DNA vào tế bào trứng dễ dàng khi thụ tinh.

2. Các tính trạng được chuyển gen

a) Các tính trạng năng suất

Người ta có thể chuyển gen để tăng cường các tính trạng năng suất như khả năng chuyển đổi thức ăn cao; tăng chất lượng của thịt, sữa, lông và giảm mỡ.

Nhưng các **tính trạng kinh tế** hầu như đều có sự di truyền đa gen, nên việc chuyển gen rất khó. Người ta hi vọng trong tương lai khi xác định trình tự nucleotide các bộ gen của động vật, lúc đó mới có thể cải thiện những tính trạng này.

b) Gen hormone tăng trưởng

Nhiều gen mã hóa cho hormone tăng trưởng được chuyển vào các động vật nuôi với hi vọng giúp tăng trọng nhanh. Hiệu quả đã thấy rõ ở chuột : chuột được mang gen hormone tăng trưởng của người lớn gấp đôi chuột bình thường. Ở heo, người ta đã tạo được dòng heo mang gen mã hóa **hormone tăng trưởng của bò** mà cuối năm 1989 đã nhận được thế hệ thứ hai. Heo này có tốc độ tăng trưởng nhanh hơn, mỡ ít hơn nhưng mang rất nhiều bệnh.

c) Kích thích sự tăng trưởng cơ

Ở gà có gen cSKI kích thích sự tạo cơ tăng mạnh hơn (hypertrophy) bình thường, giảm mỡ. Việc đưa gen này vào heo sẽ tạo nên giống có nhiều thịt và ít mỡ hơn. Trên thực tế, đã tạo được 5 con heo với mức tăng trưởng cơ cao hơn bình thường ở 3 tháng tuổi : 3 con có vai và đùi to hơn, còn 2 con kia thì sự tăng trưởng cơ quá mức bình thường nên chỉ có vai to hơn. Những heo này có chân yếu và cơ trơn yếu nên cần tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện.

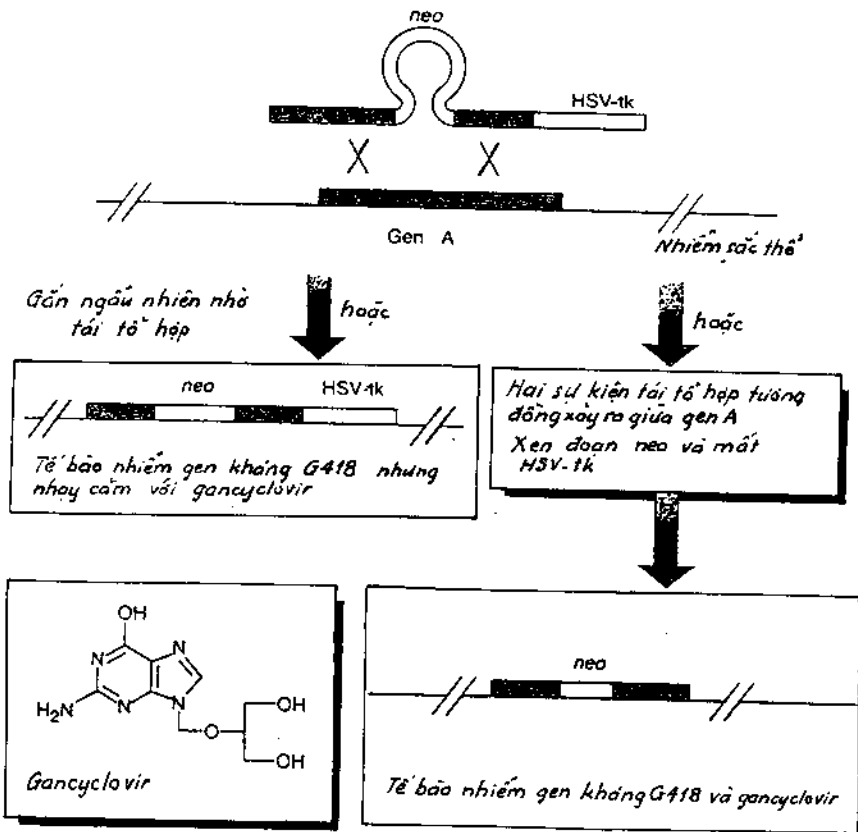
d) Tăng năng suất tạo lông (ở cừu)

Trong thành phần của lông có nhiều amino acid, chủ yếu là *cystein* chứa S tạo nhiều cầu disulfite nên protein của lông có độ chắc cao. Nếu cho vào thức ăn nhiều cystein thì năng suất lông cũng không tăng, vì khi thức ăn vào cơ thể qua đường ruột bị các vi sinh vật tiêu thụ hết nên lông không hấp thụ được. Khi tiêm cystein vào dưới da thì lượng lông tăng lên rất nhiều (vì không bị các vi sinh vật hấp thụ). Hi vọng trong tương lai tạo được những con cừu mang gen hấp thụ cystein từ các vi khuẩn như *E.coli*, *Salmonella typhimurium*.

e) Sản xuất các protein trị liệu và cơ quan để ghép

Từ năm 1990, nhiều nơi trên thế giới đã thành công trong chuyển gen người vào cừu, dê, bò và cho biểu hiện ở sữa. Đã thu được các chế phẩm như : t-pA (tissue plasmonogen activator), α - 1 - antitrypsin.

Thay gen A bằng cách xen gen neo



Hình 19.11. Thay gen A bằng gen neo

Gen neo : — để kháng, HSV - tk — một loại gen đánh dấu.

Hai trường hợp xảy ra : — còn gen HSV - tk ; — mất gen HSV - tk.

Hiệu quả của việc chuyển gen cho đến nay còn rất thấp , thường chỉ khoảng 1/1000 hợp tử được bơm DNA.

3. Thay gen đúng mục tiêu (*Gene targeting*)

Một trong những thành tựu đáng kể trong chuyển gen ở động vật là sử dụng **tái tổ hợp tương đồng để thay gen đúng mục tiêu** (*gene targeting*) trong tế bào. Kỹ thuật này cho phép thay gen hoặc allele đúng vị trí mong muốn trên nhiễm sắc thể của tế bào và được thực hiện ở phôi chuột vào giai đoạn túi phôi (*blastocyst*).

Hình 19.11 mô tả một kiểu thay gen đúng mục tiêu do tái tổ hợp tương đồng. Trường hợp thay gen A bằng gen *neo* (một gen đánh dấu biểu hiện tính đề kháng với chất G418 và gancyclovir) thì vector được cấu tạo để 2 bên gen có hai đoạn A₁ và A₂ (mà A₁ và A₂ giống các đoạn của A). Hai đoạn A₁ và A₂ sẽ bắt cặp tương đồng với A và xảy ra trao đổi chéo để xen đoạn *neo* vào giữa A.

4. Tạo giống từ phôi

Phương pháp tạo giống đại gia súc chuyển gen như bò, dê, cừu từ phôi đã cho nhiều kết quả và hiện được sử dụng rộng rãi.

Có hai cách đưa gen lạ vào hợp tử : vi tiêm và dùng tái tổ hợp tương đồng (hình 19.12).

a) Vi tiêm

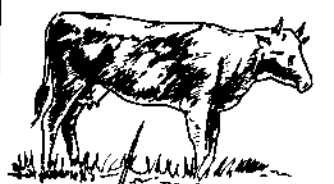
Tế bào trứng của bò được **thụ tinh in vitro**. Ở giai đoạn 2 nhân non (*pronucleus*), thực hiện **vi tiêm** đưa DNA mang gen lạ vào. Phôi tạo ra được cấy vào ống dẫn trứng của bò mẹ mang thai.

b) Phương pháp dùng tái tổ hợp tương đồng

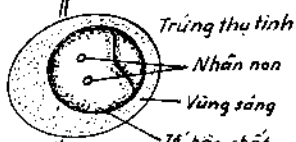
Các tế bào được nuôi và đưa DNA mang gen dùng thay đổi mục tiêu vào dịch nuôi tế bào. Sau đó, tiến hành chọn lọc các tế bào được thay thế gen và cho **dùng hợp** với tế bào trứng đã bị loại mất nhân tế bào. Tế bào dùng hợp được cấy vào bò mẹ.

TẠO ĐỒNG và CHUYỂN GEN

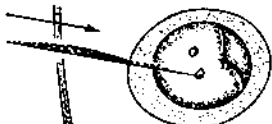
Bằng vi tiêm



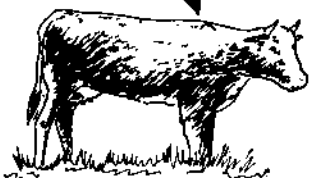
Thu tinh in vitro



Dung dịch chứa DNA

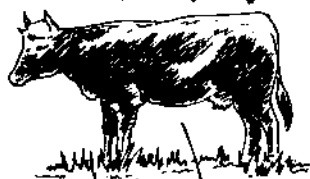


Cấy vào ống dẫn trứng của bò mẹ



BÒ CHUYỂN GEN

Bằng tái tổ hợp tương đồng



Nuôi tế bào



Gen cải biến

Cấu tạo gen cải biến

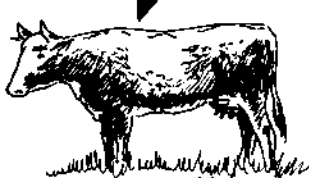
Nhân



Gen cải biến bằng tái tổ hợp tương đồng trong các tế bào nuôi



Dung hợp với tế bào trứng bị loại nhân và cấy vào bò mẹ



BÒ CHUYỂN GEN

Hình 19.12. Hai phương pháp tạo bò chuyển gen

Bên trái : Phương pháp vi tiêm.

Bên phải : Dùng tái tổ hợp tương đồng.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Chọn giống là một quá trình phức tạp trải qua nhiều khâu, mà tất cả được xây dựng hoàn hảo nhờ cơ sở lí luận của di truyền học. Các *vật liệu khởi đầu* cho chọn giống có thể thu nhận từ thiên nhiên và nhân tạo như lai, gây đột biến. *Nguồn gen đa dạng* của thiên nhiên cần được bảo tồn. Nhiều phương pháp khác nhau được sử dụng trong chọn giống : phương pháp *đánh giá, chọn lọc* và sử dụng các *kiểu giao phối*. Quan điểm mới hiện nay trong chọn giống thực vật là *cải thiện giống* thường xuyên làm cho quần thể ngày càng tốt hơn. Phương pháp *chọn giống in vitro* và *kĩ thuật di truyền* đã tạo cho thực vật bước phát triển mới làm thay đổi nội dung của trồng trọt. Kĩ thuật di truyền làm cho *chọn giống động vật* được *nhANH* và có *hiệu quả* hơn.

Tuy nhiên, còn nhiều vấn đề được đặt ra khi sử dụng các thực vật và động vật chuyển gen.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trong chọn giống thực vật, nguồn vật liệu khởi đầu có thể thu nhận từ những nơi nào trên thế giới ? Vì sao ?
2. Vì sao cần sử dụng các giống địa phương ?
3. Các nguồn vật liệu nhân tạo có ý nghĩa như thế nào trong chọn giống ? (Tham khảo thêm ở chương VIII, IX).
4. Vì sao phải bảo tồn sự đa dạng di truyền ?
5. Mức di truyền được đánh giá như thế nào ?
6. Dạng chọn lọc nào là căn bản và sử dụng lâu dài ?
7. Vì sao chọn lọc trong dòng thuần không có hiệu quả ?
8. Phân tích sự khác nhau trong chọn giống cổ điển và cải thiện giống cây trồng.
9. Chọn giống *in vitro* có những ưu điểm nào ?
10. Kĩ thuật di truyền góp phần như thế nào trong chọn giống thực vật và động vật ?
11. Loài thực vật nào có số loại cây được thử nghiệm nhiều nhất ở đồng ruộng ? Vì sao ?
12. Thay gen đúng mục tiêu có ý nghĩa như thế nào ?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Chiều cao trung bình của hai dòng thuốc lá tự phối và các cây con lai đo được tương ứng như sau: dòng cha (P_1) = 119,50cm, dòng mẹ (P_2) = 71,75cm, F_1 lai ($P_1 \times P_2$) = 108 cm.

a) Tính sự gia tăng chiều cao do ưu thế lai biểu hiện ở F_1 .

b) Dự kiến chiều cao trung bình ở F_2 (nếu F_2 chỉ biểu hiện ưu thế lai bằng 1/2 của F_1).

Lời giải

a) Sự gia tăng chiều cao do ưu thế lai được biểu hiện ở sự vượt trội của trung bình F_1 hơn điểm giữa trung bình của hai dòng cha mẹ.

Ưu thế lai của $F_1 = X_{F_1} - 1/2 (X_{P_1} + X_{P_2}) = 108 - 1/2(119,5 + 71,75) = 108 - 95,62 = 12,38\text{cm}$.

b) Theo quy luật chung, thường ở F_2 ưu thế lai chỉ biểu hiện bằng 1/2 của F_1 . Sự vượt trội của F_2 tức 1/2 của 12,38 = 6,19. Chiều cao các cây $F_2 = 95,62 + 6,19 = 101,81\text{ cm}$.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Khối lượng trung bình của bộ lông cừu ở một đàn lớn với độ lệch chuẩn bằng 10,3 + 1,5 pound (0,450 gr). Số liệu thống kê theo thứ hạng chất lượng lông (thang đánh giá từ 0 đến 10) là $5,1 \pm 0,7$ đơn vị. Tình trạng nào biến động nhiều hơn ?

2. Một quần thể có trung bình kiểu hình là 55 đơn vị, tổng phương sai di truyền đối với tính trạng bằng $(35 \text{ đơn vị})^2$, và phương sai môi trường bằng $(14 \text{ đơn vị})^2$. Giữa các giá trị kiểu hình nào sẽ tìm thấy 68% các cá thể của quần thể.

3. Hai giống thuốc lá *Nicotiana longiflora* đồng hợp tử được lai với nhau cho con lai F_1 . Phương sai trung bình của chiều dài tràng hoa đối với ba quần thể là 8,76. Phương sai của F_2 là 40,96. Đánh giá mức di truyền của chiều dài tràng hoa ở quần thể F_2 .

4. 50 heo cái con ra đời trong một đàn có thể dùng thử nghiệm các heo đực. Lứa đẻ trung bình lúc sinh ra là 10% chết tính đến lúc trưởng thành. Chỉ có 5 con heo nọc với chỉ số đẻ cao nhất sẽ được giữ lại để dùng tiếp trong đàn. Nếu mỗi thử nghiệm cần 18 con trưởng thành, có bao nhiêu con đực lựa ra giết thịt trong số các heo đực được thử nghiệm, tức tỉ lệ các con không được lựa lại ?

DI TRUYỀN HỌC NGƯỜI

Di truyền học người là lĩnh vực được phát triển *nhANH, mạnh* và *Có nhiều thành tựu nhất* hiện nay. Nhiều kĩ thuật mới của sinh học phân tử đã giúp phân tích chi tiết bộ gen người. Y học dựa trên cơ sở hiểu biết bộ gen người sẽ có nhiều biện pháp hữu hiệu bảo vệ sức khỏe con người.

Ngoài ra, nhiều vấn đề mà nhân loại quan tâm sẽ được đề cập đến như: trí thông minh có được di truyền không và con người sẽ tiến hóa như thế nào ?

Tất cả các chương của sách đều cho thấy các cơ chế di truyền là chung cho cả sinh giới. Con người không phải là ngoại lệ trong lãnh vực di truyền, tuy nhiên ngoài các nhân tố sinh học, con người còn chịu tác động của *các nhân tố xã hội*, sự phát triển của *văn minh*. Tác động của *các nhân tố sinh học* đối với con người và xã hội nói chung không thể phủ định. Nhưng các tác động đó như thế nào, là những vấn đề hết sức phức tạp và còn nhiều tranh cãi.

I. CÁC ĐẶC ĐIỂM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Con người là đối tượng của di truyền học

Vật chất di truyền, cách mã hóa và giải mã, cách truyền thụ các tính trạng, về căn bản là thống nhất từ virus, vi khuẩn, nấm, thực vật, động vật cho đến con người.

Tính di truyền của loài người được quan tâm từ lâu, tuy nhiên việc nghiên cứu nó có nhiều khó khăn như:

- Thời gian thế hệ dài (trung bình 20 năm).
- Không thể tiến hành lai theo ý muốn.
- Không thể gây đột biến nhân tạo.
- Số lượng cá thể con ít.
- Không thể tiến hành thí nghiệm trên cơ thể người.
- Không thể tạo các điều kiện đồng nhất cho thí nghiệm.

– Số lượng nhiễm sắc thể tương đối lớn ($2n = 46$) và khó phân biệt giữa chúng với nhau.

– Sự không đồng đều trong phát triển cá thể do điều kiện xã hội không giống nhau.

Tuy không thể dùng con người làm vật thí nghiệm, nhưng một mặt nhờ các số liệu liên quan đến y học, nhân chủng học, sinh học được tích lũy theo thời gian càng ngày càng tăng; mặt khác nhiều tính trạng khó có thể theo dõi ở một sinh vật nào khác, nhiều kiểu hình rất tinh tế đã được nghiên cứu ở người và sẽ được phát hiện thêm nữa. Những khó khăn nêu trên được bù trừ nhờ các ưu thế sau :

– Mọi thành tựu khoa học cuối cùng nhằm phục vụ con người. Do đó, các vấn đề di truyền người không những thu hút được một số lượng lớn các nhà khoa học, các bác sĩ, mà còn hấp dẫn nhiều nhà sản xuất của các công ti dược phẩm lớn. Những thành tựu khoa học mới nhất được *ưu tiên cho con người*, nên chưa bao giờ có nhiều phương tiện để đi sâu giải quyết những vấn đề của di truyền người như hiện nay. Đồng thời sự đầu tư nghiên cứu chưa bao giờ được lớn như hiện tại và những năm sắp tới.

– Quần thể người rất lớn (hơn 6 tỉ người) và trong nhiều trường hợp được theo dõi chi tiết (ví dụ, các bệnh án) nên có thể khai thác được nhiều dữ kiện. Nhiều dòng người (ví dụ, các vua chúa) có phả hệ từ lâu đời.

– Có thể sử dụng nhiều dạng sinh vật khác nhau làm đối tượng mô hình để nghiên cứu về người.

2. Phương pháp phân tích phả hệ (*Genealogy*)

Phương pháp phân tích phả hệ người, do F.Galton nêu ra, nghiên cứu sự di truyền các tính trạng người theo *dòng họ*. Nó được sử dụng trong trường hợp biết được nhiều người có họ hàng trực tiếp như ông bà phía cha hay mẹ và con cháu qua nhiều thế hệ. Trong trường hợp có số nhiều cá thể của nhiều dòng với biểu hiện kiểu hình giống nhau có thể xử lý toán thống kê.

Các kí hiệu về phả hệ được nêu ra vào năm 1931, về sau đã được bổ sung nhiều lần. Các kí hiệu hiện nay được mô tả trên hình 20.1.

Dựa trên nhiều số liệu thu thập được từ phả hệ các gia đình có thể xác định được các dấu hiệu có sự di truyền đơn gen, trội lặn, liên kết với giới tính hay không. Tất cả sự phân tích này đều dựa theo các quy luật di truyền Mendel.

Nữ	(A)	③	(K) 3 con
Nam	(B)	③	(L) 3 con
Giới tính không xác định	(C)	I	Chết trước khi sanh
Nữ chết	(D)	II	(M)
Sinh đôi cùng trứng	(E)		(N) } Bị bệnh
Sinh đôi khác trứng	(F)		(O) }
Hôn nhân	(G)		(P) } Dị hợp tử gen
Li dị	(H)		(Q) } lần ở nhiễm sắc thể thường
Sống chung không cưới	(I)		(R) } Dị hợp tử gen bệnh liên kết giới tính
Hôn nhân cận huyết	(J)	[]	(S) Nhận nuôi
		[]	(T) Không nhận nuôi

Hình 20.1. Các kí hiệu trong phả hệ người

Mỗi tên chỉ cá thể chưa xác định rõ bệnh hoặc cần thu thập thêm thông tin. Nam được biểu hiện bằng hình vuông, nữ - vòng tròn, hình thoi - giới tính chưa biết. Các kí hiệu tô đen chỉ cá thể bị bệnh. Vòng tròn có chấm chỉ dị hợp tử (nữ) của gen liên kết với giới tính. Đen một nửa chỉ gen lặn ở nhiễm sắc thể thường. Các khung chỉ chấp nhận nuôi (ngược vào) hoặc không nuôi (ngược ra). Số bên trong khung chỉ vài cá thể đồng thời.

Các đường nối chỉ quan hệ gia đình. Mỗi hàng chỉ một thế hệ, và sự chung sống (không kết hôn) chấm chấm, gạch nối - kết hôn, gạch nối có gạch chéo - li hôn, đường đôi chỉ kết hôn đồng huyết, sinh đôi nối bằng đường chéo, sinh đôi cùng trứng nối thêm đường ngang. Số La Mã chỉ thế hệ, số Ả-rập chỉ các cá thể.

3. Phương pháp nghiên cứu trẻ sinh đôi

Phương pháp nghiên cứu trẻ sinh đôi thường được coi là do F. Galton nêu ra. Nó được triển khai rộng vào những năm 1920 và đem lại nhiều kết quả.

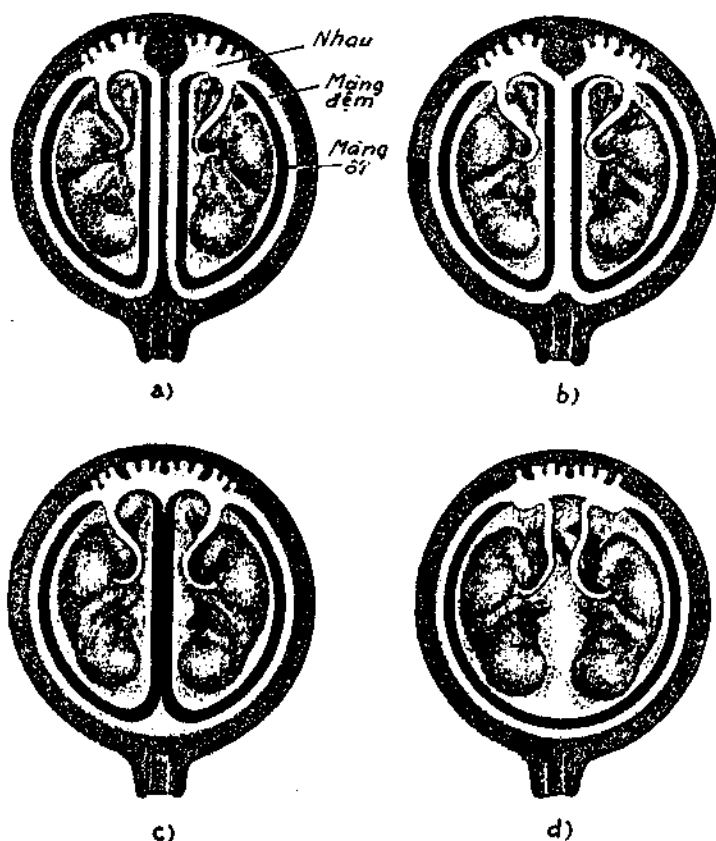
Tỉ lệ sinh đôi chiếm 1,1 - 1,2% số lần sinh, nhưng do số trẻ sinh đôi chết cao hơn, nên tỉ lệ người sinh đôi trong dân số chỉ chiếm khoảng 0,9% (một phần ba là sinh đôi cùng trứng).

Người sinh đôi cùng trứng sinh ra từ một trứng thụ tinh, hay từ một phôi còn non bị chia ra hai hay nhiều phần, mỗi phần phát triển thành một cơ thể riêng. Những người như thế có cùng một kiểu gen và luôn luôn cùng giới tính. Người sinh đôi khác trứng sinh ra từ hai hay nhiều trứng rụng cùng một lúc, được các tinh trùng khác nhau thụ tinh vào cùng một thời kì

nên về mặt di truyền học tương đương với các anh chị cùng bố mẹ nhưng sinh khác lứa, và có thể cùng giới tính hay khác giới tính.

Nghiên cứu trẻ sinh đôi để phân tích ảnh hưởng của từng yếu tố di truyền riêng, hoặc của môi trường riêng, hoặc ảnh hưởng tổng hợp của cả hai.

Các nghiên cứu sau này cho thấy, ở các cặp sinh đôi cùng trứng, có thể có 4 kiểu khác nhau trong giai đoạn mang thai, phụ thuộc vào thời điểm phân chia trứng (hình 20.2) :



Hình 20.2. Các kiểu phôi của sinh đôi cùng trứng trong thời kì thai.

- Hai màng đệm, hai màng ối và 2 nhau riêng.
- Hai màng đệm, hai màng ối và nhau dung hợp.
- Một màng đệm, hai màng ối và 1 nhau thai.
- Một màng đệm, một màng ối và 1 nhau thai.

– Nếu sự phân bào của trứng xảy ra rất sớm (4 ngày sau thụ tinh), thì mỗi phôi sẽ hình thành *màng đệm* (chorion) và *màng ối* (amnion) *riêng* giống như sinh đôi khác trứng.

– Nếu sự phân bào xảy ra hơi chậm (4 đến 8 ngày), *màng đệm* hình thành *chung* nhưng mỗi phôi có *màng ối riêng*.

– Sự phân bào chậm hơn nữa (8 đến 10 ngày sau thụ tinh), sự phát triển của cả hai phôi đều trong một *màng đệm chung* và *cùng màng ối*.

Khoảng 70% các cặp sinh đôi cùng trứng có chung màng ối, 30% có hai màng ối. Một số tác giả khi so sánh hệ số thông minh (intelligence quotient - IQ) giữa sinh đôi cùng trứng một màng ối, với sinh đôi khác trứng thì mức di truyền của nó (heritability) là 66%. Nhưng nếu sinh đôi cùng trứng hai màng ối với sinh đôi khác trứng, thì mức di truyền của trường hợp này hạ xuống còn 21%. Điều này cho thấy *cẩn thận trọng hơn* trong phương pháp này.

4. Phương pháp quần thể

Phương pháp này, dựa vào phương trình Hardy -Weinberg, đánh giá tần số các kiểu hình để tính mật độ các gen trong quần thể liên quan đến các bệnh di truyền. Nó còn cho phép đánh giá các hậu quả của giao phối cận huyết và theo dõi sự di chuyển của các quần thể người về mặt nguồn gốc.

Ngoài 3 phương pháp dựa vào kiểu hình nêu trên, nhiều phương pháp được sử dụng để nghiên cứu di truyền người như sinh hóa, nuôi cấy mô, nhuộm màu nhiễm sắc thể.

Những thành tựu lớn trong những năm gần đây có được nhờ sử dụng toàn bộ kho tàng các kĩ thuật sinh học phân tử như: di truyền ngược, antisense RNA, bioinformatics và các mô hình bệnh của người ở các động vật như *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, chuột.

II. PHÂN TÍCH BỘ GEN NGƯỜI

Trong chương IV (hình 4.8) và chương XVIII (hình 18.3), nhiễm sắc đồ của người đã được trình bày khái quát. Ở đây các phân tích mới ở cấp độ phân tử được nêu ra. Sự phân tích bộ gen người đã tiến những bước rất dài và con người đang tiến gần đến chỗ xác định chi tiết trình tự 3 tỉ nucleotide của bộ gen người.

1. Bản đồ liên kết gen

Mãi đến năm 1956, J.H.Tjio và A.Levan mới xác định được chính xác số lượng nhiễm sắc thể của người là $2n = 46$. Sau đó, vào những năm 1970,

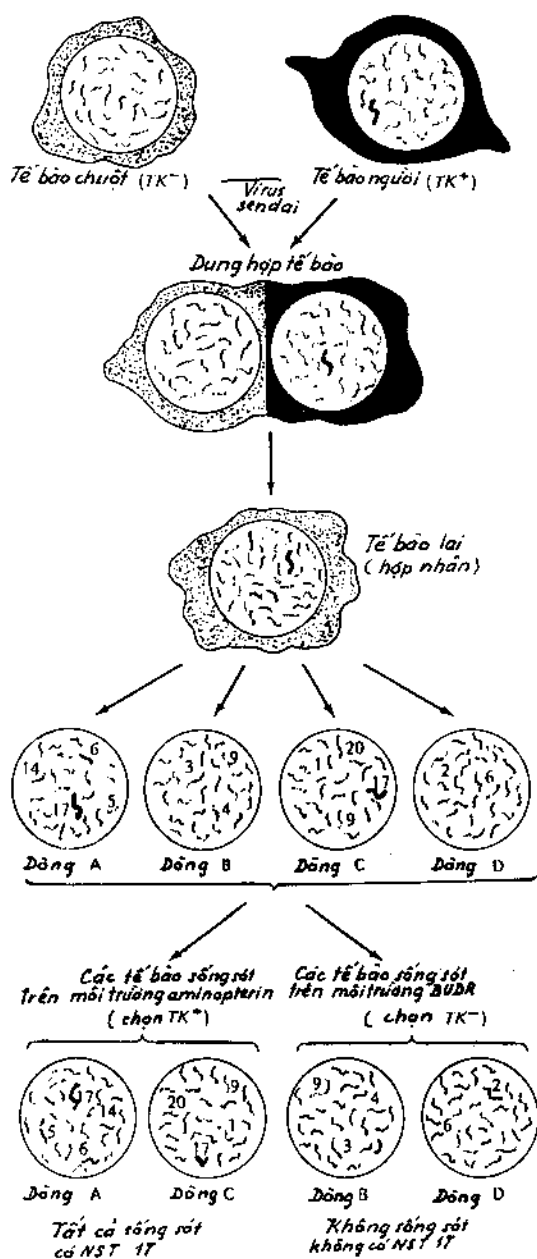
nhờ kĩ thuật *nhuộm màu bằng Giemsa* và quan sát *hiển vi huỳnh quang* mới phát hiện các vết đặc trưng để xây dựng nên *nhễm sắc đồ* đã được nêu ở chương IV (hình 4.8) và chương XVIII (hình 18.3). Vai ngắn của nhiễm sắc thể kí hiệu p và vai dài là q; Mỗi vùng đánh dấu bằng các số tương ứng 1,2,3,... tính từ tâm động trở ra.

a) Kĩ thuật lai tế bào soma

Đến giữa những năm 1960 chỉ mới xác định được một cách đáng tin cậy 3 nhóm liên kết gen (mỗi nhóm có 2 gen) trên nhiễm sắc thể thường và 4 gen trên nhiễm sắc thể X ở người, theo thống kê từ các phả hệ, nhưng chưa biết ở nhiễm sắc thể nào.

Vào những năm 1967, M.C.Weiss và H.Green sử dụng *kĩ thuật lai tế bào soma* (somatic cell hybridisation) đã lần đầu tiên xác định được gen TK (mã hóa cho enzyme thymidine kinase) nằm trên nhiễm sắc thể 17 (hình 20.3). Các dòng tế bào soma của người và các động vật có vú (được nuôi cấy mô), khi nuôi chung với sự hiện diện của *Sendai virus* có thể dung hợp (fusion) hay "lai" với nhau. Các tế bào dung hợp này trong quá trình phân bào tiếp theo sẽ *mất dần một số nhiễm sắc thể* của tế bào cha mẹ. Ví dụ, tế bào người dung hợp với tế bào chuột, thì khi các tế bào lai phân chia, các nhiễm sắc thể của người bị mất nhanh. Sự xác định vị trí của một gen trên một nhiễm sắc thể nhất định được căn cứ vào sự *tồn tại* hay *mất đi* của gen đó khi đối chiếu với sự *hiện diện* hay *vắng mặt* nhiễm sắc thể đó trong dòng tế bào. Kĩ thuật này đã giúp vượt qua khó khăn khi thống kê theo phả hệ và nhờ nó mà gần trăm gen được xác định vị trí trên 23 nhóm liên kết gen.

Trong trường hợp gen TK, dòng tế bào chuột TK⁻ được lai với tế bào người TK⁺. Sự dung hợp tạo tế bào lai chuột - người. Mặc dù phần lớn nhiễm sắc thể người bị loại mất nhanh trong các dòng tế bào lai, nhưng một số dòng còn một ít nhiễm sắc thể người. Khi các dòng tế bào này được nuôi trên các môi trường có chất *aminopterin*, các tế bào TK⁻ sai hỏng hoạt tính thymidine kinase không mọc được do mất khả năng chuyển hóa thymidine thành thymidylic acid cần cho tổng hợp DNA. Do vậy chỉ có tế bào lai *có nhiễm sắc thể 17* này của người mới tạo được dòng ổn định, chứng tỏ gen TK⁺ phải nằm trên nhiễm sắc thể này. Chứng cứ xác nhận thêm được thực hiện bằng cách chọn các dòng lai trên môi trường có thêm chất *bromodeoxyuridine riboside* (BUDR), là chất *đồng đẳng* với nitrogenous base được chuyển hóa bởi thymidine kinase (TK⁺) gắn vào DNA làm tế bào chết. Hậu quả nuôi trên môi trường có BUDR là các dòng tế bào sống được không có gen TK⁺ và tương ứng với điều đó, chúng *không có nhiễm sắc thể 17* của người (dòng cuối, bên phải của hình 20.3).



Hình 20.3. Sơ đồ phương pháp xác định vị trí gen TK trên nhiễm sắc thể 17 bằng lai tế bào soma. (xem giải thích trong bài)

Phần lớn các gen được xác định theo phương pháp trên liên quan đến các enzyme, mà việc phát hiện chúng căn cứ theo phản ứng do chúng xúc tác. Về sau, một số thủ thuật khác được sử dụng như dùng các "mắt đoạn" để xác định vị trí gen.

b) Xác định nhóm liên kết của các gen bệnh

Dựa vào các nhóm liên kết gen đã được xác định bằng lai tế bào soma, nhiều gen bệnh được gắn vào các nhiễm sắc thể. Việc xác định này căn cứ theo nhiều phả hệ của các gia đình có các bệnh di truyền.

Gần đây (1993), vài bệnh di truyền được xác định bằng cách sử dụng *gen dự tuyến* (candidate gene approach). Một trong các ví dụ là các đột biến của *gen fibrillin gây hội chứng Marfan*. Gen gây hội chứng Marfan được lập bản đồ ở *nhóm liên kết 15*, ngay giữa vai dài của nhiễm sắc thể. Gen mã hóa fibrillin cũng có vị trí tương tự khi sử dụng phương pháp FISH (fluorescent *in situ* hybridization - phát hiện bằng huỳnh quang khi lai tại chỗ).

Vị trí các gen trên bản đồ liên kết được đánh giá bằng centiMorgan (cM). Tính ra 1 centiMorgan bằng 1000 kb hay 10^6 bp.

2. Các phương pháp xây dựng bản đồ vật lí của bộ gen người

Nhiều phương pháp khác nhau được sử dụng để xác định chính xác hơn vị trí các gen trên nhiễm sắc thể.

a) Phương pháp FISH

Một phương pháp quan trọng để xác định vị trí gen là phát hiện bằng *huỳnh quang khi lai tại chỗ* (fluorescent *in situ* hybridization) gọi tắt là FISH. Nhiễm sắc thể được cố định trên lame và được lai với mẫu thử đánh dấu của gen (labelled gene probe). DNA được làm biến tính thành mạch đơn và mẫu sẽ lai với trình tự bổ sung trên các nhiễm sắc thể và vị trí được xác định khi quan sát dưới kính hiển vi. Nếu mẫu DNA được đánh dấu bằng biotin thì tín hiệu được phát hiện bằng ánh sáng huỳnh quang của các phân tử gắn với protein avidin, mà chất này gắn đặc hiệu vào biotin.

b) Lập bản đồ lai phóng xạ (Radiation hybrid mapping)

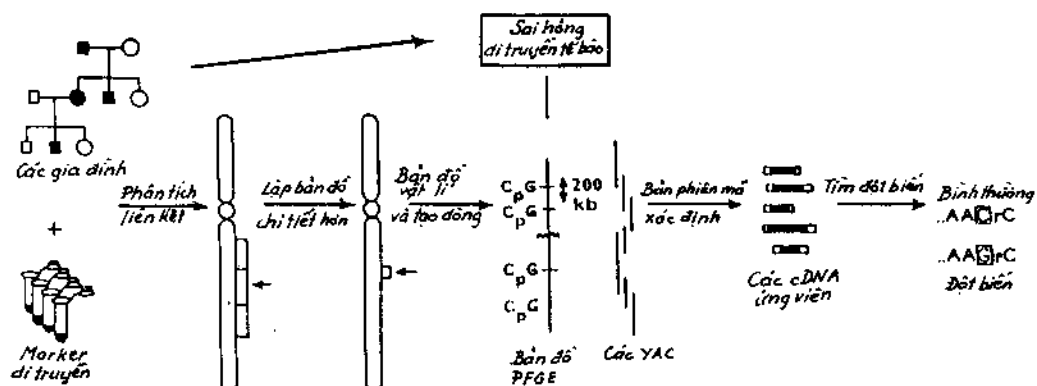
Bản đồ di truyền liên kết gen được thực hiện với khoảng cách gần 30 Mega ($M = 10^6$ bp) base, phản ánh tần số trao đổi chéo của nhiễm sắc thể người. *Bản đồ lai phóng xạ RH*, sử dụng các dòng tế bào lai mang nhiều đoạn nhiễm sắc thể lớn, là mức lập bản đồ chi tiết hơn. Thay vì theo dõi tần số tái tổ hợp giữa các gen hay marker (gen đánh dấu) liên kết, kĩ thuật mới này ngược lại dựa trên tần số mà các gen liên kết với nhau bị tách rời ra do chiếu

xạ tia X làm đứt gãy nhiễm sắc thể. Các đoạn DNA, bị làm gãy bởi phóng xạ, được khuếch đại nhờ PCR để xác định các thể lai vẫn còn giữ lại một locus nào đó không. Các locus kế nhau có xu hướng cùng đi với nhau.

Bằng hai phương pháp trên, có thể lập bản đồ 5000 - 7000 mẫu, tạo nên các mốc chuẩn với khoảng cách 1 triệu bp trên toàn bộ bộ gen người. Các dòng đặc hiệu của các mẫu này được phân cho nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới để xác định trình tự nucleotide.

c) Phương pháp tạo dòng định vị (Positional cloning)

Các phương pháp xác định vị trí gen nêu trên có giá trị định hướng tốt trên bộ gen nói chung, nhưng khoảng cách giữa các gen còn lớn. Một bệnh di truyền mà chưa biết được do gen nào thì khó cô lập để tạo dòng. Phương pháp *tạo dòng định vị* (hình 20.4) ra đời, dựa trên *cặp primer* của PCR để phát hiện các gen liên kết chặt khi nghiên cứu liên kết gen theo các dấu hiệu hình thái.



Hình 20.4. Sơ đồ về phương pháp tạo dòng định vị

— **Bước 1** : Phân tích liên kết gen.

— **Bước 2** : Lập bản đồ di truyền chi tiết hơn.

— **Bước 3** : Lập bản đồ vật lý và tạo dòng.

— **Bước 4** : Lập bản đồ dựa vào các đoạn được tách bằng kĩ thuật điện di trên điện trường dao động theo nhịp PFGE (Pulse field gel electrophoresis). Kĩ thuật điện di này cho phép tách các đoạn DNA khoảng 500 kb. Ở bước này có thể tìm thêm các đảo CpG (CpG island) thường có trên các gen cấu trúc.

— **Bước 5** : Gắn các đoạn DNA vừa tách trên vào YAC.

— **Bước 6** : Xác định YAC có mang gen.

— **Bước 7** : Tìm các ứng viên cDNA.

— **Bước 8** : Tìm đột biến.

Dựa vào kết quả phân tích liên kết gen, các đoạn DNA khác nhau được tạo hàng loạt dòng trên YAC (nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men). Trong số các YAC đó, xác định dòng có mang gen tạo phản ứng dương với cặp primer. Các trình tự primer này được gọi là *trình tự điểm dán nhãn STS* (sequence tagged site) và chúng là các tiêu điểm tốt cho lập bản đồ. Đoạn DNA trên YAC được chia nhỏ dần và được gắn trên các cosmid mang khoảng 40 kb nên sinh sản nhanh tạo nhiều bản sao. Bước tiếp theo là dựa vào các đoạn trùng lặp cDNA ở các cosmid để nối chúng lại. Các đoạn nối liên tục nhau gọi là *contig*. Cuối cùng là xác định vùng mã hóa trên DNA của cosmid. Phương pháp này còn gọi là STS.

3. Xây dựng bản đồ vật lí của bộ gen người

Từ đầu những năm 1980, một đội ngũ các nhà khoa học trên thế giới đã bắt đầu sử dụng các RFLP (Restriction fragment length polymorphism) của người, những biến đổi trong kích thước của các đoạn DNA người được tạo ra do các RE (restriction endonuclease) chuẩn, làm các mốc để lập bản đồ bộ gen người. Lối tiếp cận này được áp dụng cho các gia đình có nhiều họ hàng và gia đình có phả hệ được ghi chép tốt. Phòng thí nghiệm của *Trung tâm nghiên cứu sự đa dạng của người CEPH* (Centre d'Étude des Polymorphismes Humains) ở Paris làm trung tâm thu nhận các mẫu RFLP của DNA từ 40 gia đình ở Pháp, Venezuela và Mĩ. Các số liệu này được sử dụng để làm *điểm xuất phát* cho nỗ lực quốc tế trong lập bản đồ chi tiết bộ gen người đến mật độ centiMorgan (cM). Mỗi cM tương ứng khoảng 100 - 1000 kb của DNA.

Một bước phát triển khác trong lập bản đồ bộ gen người là phát minh về các *DNA nhỏ vệ tinh* (mini- và micro-satellite). Các DNA nhỏ này gồm một số lớn các trình tự lặp lại, với số lượng thay đổi khác nhau, là công cụ cung cấp nhiều thông tin mới về sự đa dạng di truyền của người. Nhờ sự phân bố của các trình tự micro-satellite tương đối đồng nhất, chúng giúp ích nhiều cho lập bản đồ bộ gen người khi dùng PCR để khuếch đại chúng. Sử dụng 4000 đoạn RFLP và 2000 đoạn micro-satellite có thể xây dựng bản đồ gen với mật độ trung bình 0,7 cM. Bản đồ này cho phép các nhà nghiên cứu xây dựng bản đồ vật lí các vùng của bộ gen với các contig được tạo dòng ở nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC).

Sự phát triển của các phương pháp tin học trong những năm 1980 cho phép đánh giá các marker liên kết gen, cũng như các marker DNA khác. Việc sử dụng các mini- và micro-satellite *VNTR* (variable number of tandem repeats - số lượng dao động của các lặp đoạn nối tiếp) đảm bảo nguồn cung cấp các marker phong phú rải khắp bộ gen cho xử lí tin học. Bản đồ liên kết đầu tiên thuộc loại này được nêu ra vào cuối những năm 1980, được xây dựng

sơ bộ từ 61 gia đình, mà dòng họ gen được lưu giữ ở CEPH tại Paris. Các bản đồ và marker này hiện được sử dụng rộng rãi ở nhiều nơi trên thế giới để làm điểm xuất phát cho sự tạo dòng định vị của các gen bệnh, ví dụ, nhờ nó tách được gen gây bệnh Huntington.

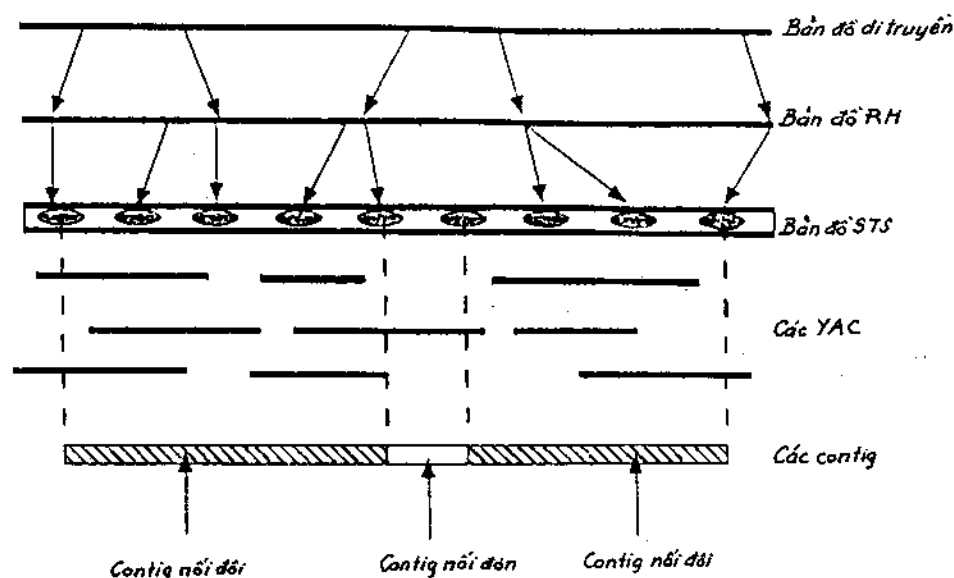
Hiện nay, trên thế giới có 3 nhóm chủ yếu phối hợp với nhau tham gia xây dựng bản đồ liên kết và các marker :

- Nhóm **Genethon** ở Paris tập trung vào các bản đồ dựa vào các marker chứa các lặp đoạn CA (CA repeat motif).

- Nhóm **CHLC** (Cooperative Human Linkage Center) ở Mỹ nhằm vào xây dựng các bản đồ dựa vào các lặp đoạn hai, ba và bốn nucleotide (di-, tri- and tetranucleotide repeats).

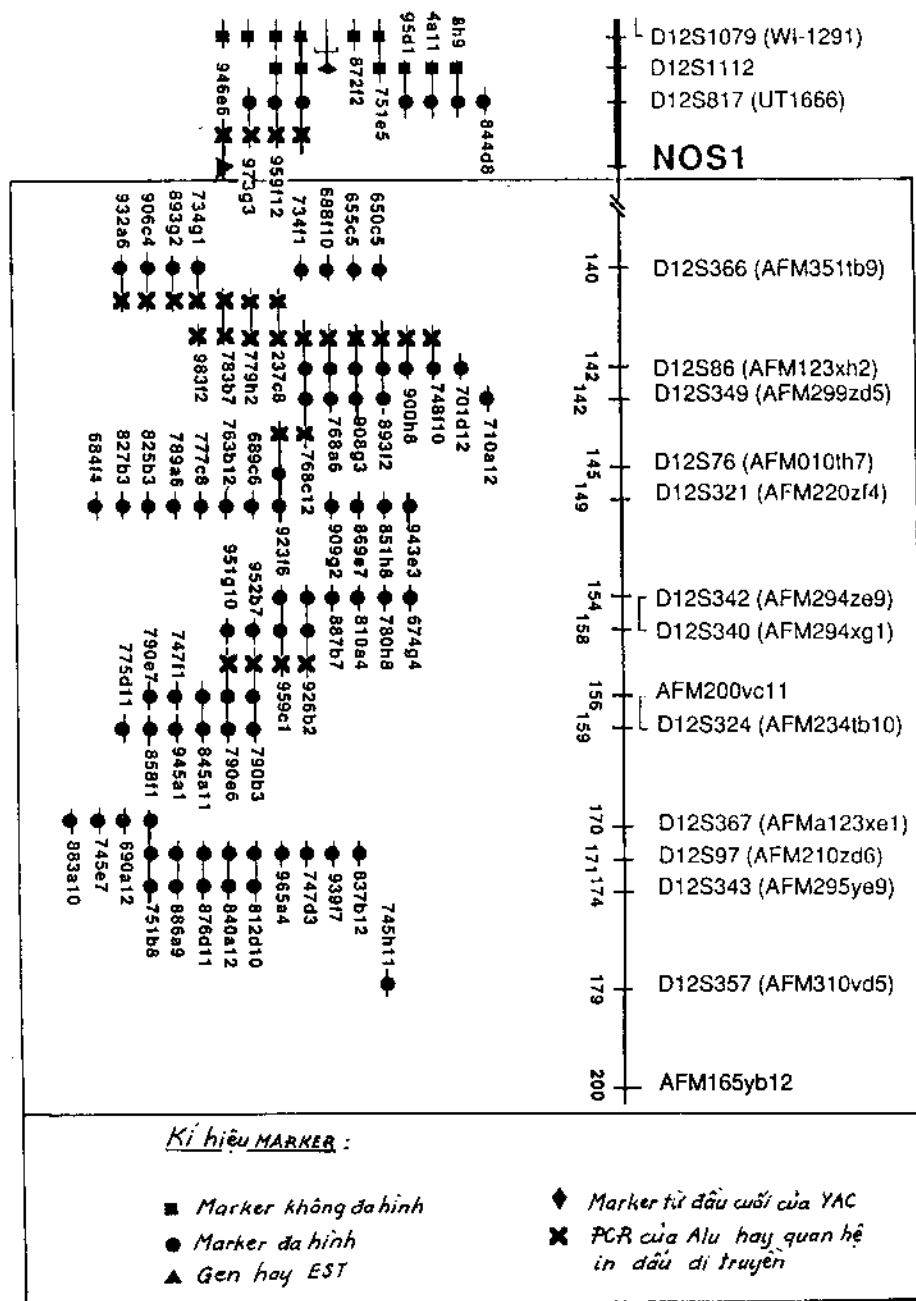
- Nhóm nghiên cứu nhiễm sắc thể đặc hiệu được điều khiển bởi liên hiệp các công ty **NIH** (National Institute of Health)/ **CEPH** và bởi **EUROGEM**.

Sự liên kết được phát hiện bằng RH có khoảng cách khoảng 10 Mb. Bản đồ chi tiết hơn được xây dựng nhờ sử dụng các STS, tức dựa vào các thư viện của nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men và bằng kĩ thuật PCR xác định sự hiện diện của locus.



Hình 20.5. Sơ đồ về các bước xây dựng bản đồ vật lý của bộ gen người

Bước đầu tiên là xây dựng bản đồ di truyền căn cứ vào liên kết gen. Tiếp theo xây dựng bản đồ RH (lai phóng xạ), tiếp theo là bản đồ STS (Sequence tagged sites) bằng tạo dòng định vị. Các đoạn DNA được gắn vào các YAC. Sự phân tích các DNA của YAC xác định các contig là các đoạn dài nối đầu nhau.



Hình 20.6. Bản đồ tích hợp 1 đoạn (1/9) của nhiễm sắc thể 12 của người

Sự liên kết phát hiện do STS có khoảng cách 1Mb. Hiện nay tốc độ xác định trình tự nucleotide của DNA người đạt đến 50 Mb / năm.

Các bước chủ yếu xây dựng bản đồ vật lí của bộ gen người được tóm tắt trên hình 20.5.

Trên thực tế, để phục vụ cho chương trình xác định trình tự nucleotide của bộ gen người, nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng. Từ kết quả của nhiều phương pháp khác nhau, bản đồ tích hợp của nhiễm sắc thể (chromosome integrated map) được xây dựng. Hình 20.6 mô tả một đoạn khoảng 1 / 9 của nhiễm sắc thể 12 của người.

Đến nay một số nhiễm sắc thể đã được xây dựng bản đồ vật lí toàn bộ. Có bản đồ kèm theo số liệu database dùng cho tin học.

4. Chương trình xác định trình tự nucleotide bộ gen người

Biết rõ chi tiết về bộ gen của người là mơ ước từ lâu của các nhà sinh học, đồng thời là công việc tưởng chừng khó thực hiện nổi. Nhờ sự ra đời của kĩ thuật di truyền cùng những thành tựu mới như tạo được **nhiễm sắc thể nhân tạo**, hay **điện di trong trường xung** (pulse field electrophoresis) cho phép tách các đoạn DNA dài cả triệu nucleotide. Cuối năm 1989 ở Mĩ, chương trình xác định trình tự nucleotide bộ gen người với kinh phí 3 tỉ USD được chấp nhận, gọi là **chương trình bộ gen người** (HGP = Human genome project).

Để xác định trình tự của hơn 3 tỉ nucleotide của bộ gen người, chương trình dự kiến thực hiện trong 15 năm. Theo ông C.Cantor, người chủ trì nhóm nghiên cứu lớn thứ hai ở Mĩ, các bước được tiến hành với tiến độ như sau :

- Năm năm đầu lập bản đồ gen trên nhiễm sắc thể được 50%, xác định trình tự nucleotide 1% bộ gen, cải tiến kĩ thuật từ 5 - 10 lần.
- Năm năm tiếp theo lập bản đồ gen 100%, xác định trình tự nucleotide 10% bộ gen và cải tiến kĩ thuật 5 - 10 lần nữa.
- Năm năm cuối cùng tức đến năm 2003 - 2004 xác định trình tự nucleotide toàn bộ bộ gen người.

Hiện nay trên thế giới có tổng cộng hơn 80 phòng thí nghiệm lớn tham gia chương trình bộ gen người. Tuy đã đạt được những kết quả quan trọng, như tạo dòng 2375 gen của bộ não người vào năm 1992, nhưng hãy còn **không ít khó khăn rất lớn**. Sự can thiệp của **Tin học** đã giúp rút ngắn đáng kể thời gian ở một số khâu quan trọng.

Một trong những bước tiến dài trong xác định trình tự nucleotide của bộ gen là việc *sử dụng các EST* (expressed sequence tags) để chuyển mRNA thành các đoạn cDNA bằng khuếch đại nhờ PCR. Nhờ kĩ thuật này, sự biểu hiện của gen ở các mô đặc hiệu được ghi nhận. Ưu thế của xác định trình tự nucleotide bằng EST là chỉ các gen biểu hiện ở một loại mô chuyên biệt được phát hiện (nhờ xác định mRNA trưởng thành và phiên mã ngược thành cDNA). Trình tự cDNA được gắn vào vector plasmid để tạo dòng. Sự lựa chọn các dòng để xác định trình tự nucleotide và sự so sánh tiếp theo cho phép đánh giá *mức độ biểu hiện* của gen ở các mô khác nhau. Sự dò theo các EST giúp xác định sự phân bố các gen mã hóa trên các nhiễm sắc thể, xây dựng bản đồ di truyền và vật lí của bộ gen người và định rõ được các gen gây bệnh.

Năm 1995, Adam và hơn 80 đồng tác giả đã thông báo kết quả về 174.472 EST được tạo nên từ 3000 thư viện cDNA trích từ 37 cơ quan và mô khác nhau. Các EST này được tổ hợp với 118.406 EST bổ sung từ (database) EST của dữ liệu tin học, tổng cộng gồm 83 triệu nucleotide.

Trong số 87.983 trình tự EST khác nhau, 10.214 khi đánh giá tiếp là những gen đã biết (căn cứ số liệu thống kê của database), số còn lại là các gen trước đó chưa biết chức năng. Gần 40% các gen được xác định ở người liên quan đến trao đổi chất căn bản, cấu trúc tế bào, nội cân bằng (homeostasis) và phân bào; 22% với RNA và sinh tổng hợp protein, và 12% liên quan với các tín hiệu và liên lạc giữa các tế bào.

Hiện nay, người ta đã giải mã được 99% bộ gen người và cho rằng số gen người chỉ nằm trong khoảng 30.000 - 40.000 (chứ không phải 100.000 như dự kiến trước đây).

Các dữ liệu về bộ gen người đã được đưa lên mạng Internet.

Nhưng theo đa số các đánh giá, *trình tự mã hóa cho gen* chỉ chiếm có 3% của hơn 3 tỉ nucleotide, nên phải tiếp tục giải mã những đoạn khác mới hiểu *hoạt động toàn vẹn của bộ gen* chứ không phải từng gen riêng lẻ.

Việc xác định trình tự nucleotide toàn bộ bộ gen người sẽ đem lại những ích lợi to lớn. Nó soi sáng và giúp chữa nhiều bệnh di truyền ở người, góp phần tìm hiểu cơ chế của *tri thông minh* và kéo dài *tuổi thọ*. Bây giờ đã có người đề cập đến vấn đề "những đứa bé theo đơn đặt hàng" (l'enfants à la carte) và sự *bất tử* của con người.

5. Phân tích chức năng bộ gen

Xác định trình tự nucleotide của bộ gen chỉ là bước đầu, bước thách thức tiếp theo là phải xác định xem mỗi gen tác động như thế nào. *Phân tích chức năng bộ gen* (functional genomic analysis) là mục tiêu sắp tới của các nhà khoa học.

Mặc dù có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng cho phân tích chức năng của bộ gen, nhưng các nhà khoa học cho rằng tốc độ hiện nay rất chậm vì số lượng thông tin hiện quá lớn. Theo các nhà khoa học, sự phân tích chức năng bộ gen cần được tăng cường theo hai hướng :

– Sử dụng **công cụ điện toán : bioinformatics** sẽ là chìa khóa để xử lý các số liệu phân tích bộ gen. Trước hết, điện toán sẽ tích hợp các thông tin về DNA, cấu trúc và trình tự amino acid của protein, sự tương đồng của cấu trúc protein trong tiến hóa, các cơ chế điều hòa biểu hiện protein ở các mô khác nhau trong các giai đoạn phát triển và trạng thái bệnh lý.

Bước tiếp theo là xây dựng các **mô hình** tương tác giữa các gen, gắn các gen vào chuỗi phản ứng sinh hóa, nghiên cứu các gen bị “*knock - out*” (làm hỏng) và nhiều vấn đề khác.

Lối tiếp cận bằng bioinformatics sẽ rút ngắn thời gian và làm giảm giá thành công trình nghiên cứu.

– Sử dụng các hệ thống mô hình động vật như : chuột, *Drosophila*, tuyến trùng và nấm men. Ví dụ, *Caenorhabditis elegans* có bộ gen đã được xác định trình tự nucleotide hơn 60% và khoảng 80% của tất cả các gen biết được gây bệnh ở người có tương đồng ở tuyến trùng này.

Việc xác định một gen bệnh chỉ có giá trị khi biết được sinh lý bệnh (pathophysiology) của nó. Mọi phương tiện và kỹ thuật phong phú sẽ được tập trung cho bước phát triển tiếp theo trong khai thác các dữ liệu của bộ gen người.

III. DI TRUYỀN Y HỌC

Vai trò của **di truyền học người** trong thực tiễn y học ngày càng to lớn hơn, nhất là trong những thập kỷ gần đây. Các thành tựu di truyền học có hiệu quả lớn trong tất cả các lĩnh vực y học. Các yếu tố di truyền trong các bệnh ung thư, tim mạch, tâm thần, rối loạn phát triển và các điều kiện trị bệnh ngày càng quan trọng hơn trong **chẩn đoán** và **điều khiển** các điều kiện đó. Những thành tựu của **di truyền học lâm sàng** đã dẫn tới sự **chẩn đoán** các bệnh di truyền hiếm gặp như các sai hỏng trao đổi chất bẩm sinh, mà phần lớn chúng hiện nay chỉ phát hiện được ở trẻ sơ sinh. Việc phát hiện các trạng thái dị hợp tử đối với nhiều bệnh di truyền do các gen lặn như bệnh Tay-Sachs và thiếu máu hình liềm đã giúp định hướng đúng trong hành động đối với những gia đình có nhiều khả năng sinh ra các trẻ bị bệnh di truyền. Việc sử dụng các kỹ thuật mới trên cơ sở các **mẫu thử gen** (gene probe), **rà dọc theo nhiễm sắc thể** (chromosome walking), và **DNA tái tổ hợp** đã làm cho sự chẩn đoán di truyền trở nên tinh tế hơn trong tất cả các lĩnh vực y học.

Các nghiên cứu hiện tại nhằm xây dựng những *phương pháp chuyển gen* hữu hiệu mở ra nhiều triển vọng mới cho *liệu pháp gen* (gene therapy) trong điều trị nhiều bệnh ung thư, bệnh lây nhiễm và bệnh di truyền.

Nhiều vấn đề đặt ra đối với di truyền y học :

– Một đứa con trai gần chết do nhiễm trùng nặng. Điều này có xảy ra đối với đứa trẻ khác không ? Các gia đình khác có bị đe dọa không ?

– Một số bệnh di truyền do gen lặn sẽ được chẩn đoán sớm để loại trừ không ?

– Nếu những vấn đề trên có cơ sở di truyền, thì có khả năng chữa trị trong tương lai không ?

Nhiều vấn đề khác nữa cho thấy tầm quan trọng của di truyền y học.

1. Các sự cố (Incidence)

Các sự cố do sai hỏng di truyền ở một gen đạt mức gần 1% số trẻ sơ sinh. Các sự cố trung bình do sai hỏng nhiễm sắc thể là 1/150 trẻ sơ sinh, với hội chứng Down (tam nhiễm 21) thường thấp hơn cả khoảng 1/800. Tam nhiễm 21 là nguyên nhân di truyền phổ biến nhất của sự kém phát triển trí tuệ. Cả các nhân tố di truyền và các nhân tố khác, nhất là của môi trường đóng vai trò trong sự phát triển hàng loạt các bệnh chung cả ở trẻ con và người lớn.

Tính chung các bệnh di truyền có ảnh hưởng đến 12 triệu người Mỹ và tính ra 30% thu nhận ở khoa nhi và 10% ở người lớn. Sự tăng đáng kể trong săn sóc sức khỏe ban đầu đòi hỏi phải giải đáp các vấn đề di truyền; một số vấn đề cần các nhà di truyền y học, số khác cần các bác sĩ nói chung. Việc sử dụng các công cụ di truyền sẽ đòi hỏi tăng cường sự hiểu biết nhiều hơn các kiến thức di truyền học và sẽ là vấn đề đáng lưu ý trong vài thập niên tới. Việc xác định các nguy hiểm do bệnh di truyền trong các gia đình sẽ có nhiều khả năng hơn.

a) Các bệnh di truyền do đột biến đơn gen

Nhiều bệnh do đột biến gen có tần số cao (bảng 20.1).

BẢNG 20.1 Các bệnh di truyền do đột biến 1 gen

Bệnh di truyền	Tần số xuất hiện
Bệnh cholesterol cao (Hypercholesteronemia)	1 trong 500
Thiếu máu hình liềm	1 trong 600 (tổ tiên châu Phi)

Đáng lưu ý là các nghiên cứu gần đây cho thấy một kiểu đột biến gen do các ***lặp đoạn ngắn 3 nucleotide*** (trinucleotide repeat). Các gen bình thường có thể có từ 30 - 40 lặp đoạn 3 nucleotide. Số lượng các lặp đoạn này có thể tăng lên trong giảm phân (hình 20.7). Số lặp đoạn 3N có thể đến vài nghìn (bảng 20.2).

BẢNG 20.2. Các ví dụ về hậu quả lặp đoạn 3N

Bệnh	Vị trí bản đồ	Số lặp đoạn	Hậu quả do sự gia tăng của các lặp đoạn
Thoái dưỡng cơ (Myotonic dystrophy)	19q 13.3	(CTG) ₃₀ Bình thường ≤ 30 Dao động = 50 → 200 Tiền đột biến = 50 - 100 Bệnh = 100 - 2000	Giảm thọ ở một nhóm và tăng triệu chứng bệnh nói chung.
Bệnh Huntington	4p	(CAG) _n Bình thường = 30 - 34. Bị bệnh : 42 - 100.	Giảm thọ ở một nhóm người.

Các đột biến có thể ảnh hưởng đến chức năng của protein như sau :

- Mất hoàn toàn protein.
- Mất chức năng của protein.
- Chức năng khác thường của protein.
- Các hậu quả số lượng : giảm chức năng hoặc mất cân bằng giữa các tiểu phần.

Sự hiểu biết về các cơ chế giúp cho việc chẩn đoán chính xác hơn.

b) Các biến đổi nhiễm sắc thể

Các thay đổi bất thường của nhiễm sắc thể (chromosomal anormalities) có tác động lớn nhất trong thời kì thai nhi, vì chúng có tần số cao nhất và là nguyên nhân chủ yếu gây sẩy thai. Đã tìm thấy 7 - 8% các đột biến nhiễm sắc thể ở các thai trước khi sinh 6 tuần và khoảng 50% các trường hợp sẩy thai do kiểu nhân khác thường. Số trẻ sinh ra có các sai hỏng nhiễm sắc thể lúc sinh ra được nêu trên bảng 20.3.

BẢNG 20.3. Tần số của các biến đổi nhiễm sắc thể ở trẻ sơ sinh

Các biến đổi nhiễm sắc thể	Tần số / 1000 trẻ sơ sinh
Biến đổi nhiễm sắc thể thường :	
Tam nhiễm 13.	0,05 - 0,27
Tam nhiễm 18.	0,10 - 0,27
Tam nhiễm 21.	0,69 - 1,44
Chuyển đoạn 14 / 21.	0,18 - 0,27
Số lượng nhiễm sắc thể giới tính :	
XXY	0,50 - 1,60
XXX	0,50 - 1,68
XXY	0,50 - 1,07

2. Thử nghiệm di truyền và chẩn đoán

Để có đủ cơ sở cho việc tư vấn, cần phải tiến hành các thử nghiệm di truyền (genetic testing) ở nhiều mức độ và bằng nhiều phương pháp khác nhau.

a) Phân tích nhiễm sắc thể (Chromosome analysis)

Các tế bào thường được sử dụng để phân tích nhiễm sắc thể là *lymphocyte* (bạch cầu), *fibroblast* (tế bào cơ nguyên sinh) và *tế bào màng ối* (amniocyte). Tế bào phải đang trong giai đoạn *nguyên phân* và được *nhuộm màu* để xác định các đặc tính cấu trúc và hình dáng của nhiễm sắc thể ở kì giữa. Đối với chẩn đoán lâm sàng, kiểu nhân được chuẩn bị ở giai đoạn sớm của kì giữa và *nhuộm màu Giemsa*. Sự quan sát dưới kính *hiển vi huỳnh quang* cho thấy các vệt (band) đặc trưng và qua đó xác định các biến đổi nhiễm sắc thể.

Có thể sử dụng kĩ thuật FISH (fluorescent in situ hybridization) để xác định vị trí tương đối của gen sai hỏng.

b) Thử nghiệm đối với các sai hỏng đơn gen

Các thử nghiệm này phức tạp hơn và phần lớn phương pháp phụ thuộc vào khả năng tách DNA, xác định các sai hỏng từ một ít mẫu của người bệnh từ tóc, máu hay mô.

Trước hết, cần phân tích sự *liên kết gen* để xác định sơ bộ vùng cần phân tích trên nhiễm sắc thể. Sau đó, phân tích RFLP để sơ bộ tìm các sai khác đặc biệt ở người bệnh. Nếu chưa ghi nhận sai khác thì tiếp tục phân

tích với nhiều phương pháp khác nhau như tạo dòng định vị, dùng mẫu lai hay PCR.

Việc xác định đúng gen bệnh và tạo dòng là một quá trình phức tạp. Có thể lấy trường hợp bệnh thoái dưỡng cơ Duchenne DMD (Duchenne's muscular dystrophy) làm ví dụ. Bệnh này liên kết với nhiễm sắc thể X làm thoái hóa cơ nhanh ở con trai còn nhỏ. Tuy nhiên, một số phụ nữ có biểu hiện triệu chứng DMD. Các nghiên cứu tiếp theo đi đến giả thuyết rằng bệnh do mất đoạn trên nhiễm sắc thể X. Sự phân tích tiếp theo ở nam nhỏ tuổi và nữ có triệu chứng bệnh cho phép tạo *mẫu thử* (probe) để cô lập gen DMD. Điểm đặc biệt là việc tìm thấy một vùng đã biết mã hóa cho rRNA và vùng này được làm điểm xuất phát để nghiên cứu chi tiết gen này. Nhờ kĩ thuật tạo dòng, mẫu thử được sản xuất để xác định chỗ mất đoạn.

Việc xác định các gen gây các bệnh khác như hóa xơ nang (cystic fibrosis), Huntington, Alzheimer đã cho phép sản xuất các mẫu thử tương ứng, tạo thuận lợi cho chẩn đoán các bệnh đơn gen.

3. Di truyền y học tư vấn

Di truyền học dựa trên những thành tựu đạt được đã hình thành một ngành chẩn đoán gọi là *di truyền y học tư vấn* (genetic counseling) để giúp những người tự nghi ngờ mình ở vào thể dị hợp đối với một số tật bệnh có thể giải đáp một số câu hỏi đại loại như : Lập gia đình nên chọn đối tượng như thế nào ? Có nên sinh đẻ thêm hay không ? Chạy chữa cho mình và cho con cái ra sao ?

Để di truyền y học tư vấn tiến hành có kết quả cần phải chẩn đoán đúng và theo dõi được phá hệ của người bệnh, phải xác minh đúng là bệnh di truyền hay chỉ là một kiểu sai hình. Nếu là bệnh di truyền thì đó là đột biến lặn hay trội, liên kết giới tính hay liên kết nhiễm sắc thể thường, tần số biểu hiện ra là bao nhiêu.

Nếu trong bố mẹ có một người mang đột biến trội ở nhiễm sắc thể thường thì khả năng mắc bệnh ở con sẽ tính theo công thức $0,5 \times P$ (P là độ thâm nhập tính bằng phần trăm). Nếu cả hai người cùng mắc thì tỉ lệ sẽ cao hơn : $0,75 \times P$.

Đối với các đột biến lặn ở nhiễm sắc thể thường thì con chỉ mắc tật trong trường hợp cả bố lẫn mẹ đều là những thể dị hợp (sẽ dễ gặp hơn trong điều kiện hôn phối đồng huyết). Nếu đứa con đầu mắc tật thì xác suất đứa thứ hai cũng mắc tật ấy sẽ là $0,25 \times P$.

Các bệnh do sai hình nhiễm sắc thể được xác định qua thử nghiệm di truyền bằng nhuộm màu nhiễm sắc thể.

Giá trị của di truyền y học tư vấn tăng lên khi đã tìm ra các biện pháp để xác định được bố mẹ dị hợp đối với những dị chứng hay gặp.

Thành công trong xác định trình tự nucleotide của bộ gen người sẽ đưa di truyền y học tư vấn lên *tầm cao mới*, vì y học thế kỉ tới sẽ là y học dự phòng : khi đứa bé sinh ra, căn cứ mẫu DNA có thể dự báo về các loại bệnh để phòng ngừa.

Các bác sĩ, chuyên gia tư vấn di truyền rất cần có công cụ này để thực hiện sự đánh giá các hậu quả di truyền và các thử nghiệm chuyên biệt. Trước đây, lối tiếp cận mô tả và suy luận giữ vai trò chủ yếu trong di truyền người. Ngày nay, kĩ thuật hiện đại cung cấp nhiều phương tiện mới (như các công cụ sinh học phân tử) trong đánh giá bệnh lí con người ở phòng thí nghiệm. Các chuyên gia tư vấn di truyền y học sẽ thực hiện các công việc :

- Thu thập lịch sử chi tiết của gia đình.
- Xây dựng sơ đồ phả hệ.
- Quan sát cẩn thận người bệnh và các thành viên khác của gia đình để nhằm xác định bệnh do yếu tố di truyền hay không.
- Hoàn thiện mô tả và làm các thử nghiệm đánh giá chuyên biệt đầy đủ hơn.
- Dự đoán và đánh giá hiểm họa đối với bệnh nhân và gia đình.
- Thông báo kết quả cho người bệnh và gia đình.

Hiện nay ở Mỹ, chuyên gia di truyền y học tư vấn có trong biên chế cơ hữu của nhiều bệnh viện.

IV. Y HỌC TRÊN CƠ SỞ HIỂU BIẾT VỀ BỘ GEN

Có thể nói, những nghiên cứu về bộ gen người đã tiến nhanh với tốc độ chóng mặt. Ngoài những hiểu biết chi tiết đến từng nucleotide của gen, chưa bao giờ con người có nhiều phương tiện và công cụ nghiên cứu và giải quyết các vấn đề y học như hiện nay. Đó là hàng loạt phương pháp mới và tinh vi của sinh học phân tử, sự kết hợp sinh học với tin học và với hóa tổ hợp (combinatorial chemistry). Chiến lược mới trong y dược học đang được hình thành.

1. Chiến lược chung

Hiện nay, con người hiểu biết về bệnh lí một cách chi tiết từ hai nguồn thông tin : cơ chế hoạt động của bộ gen và tế bào người và cơ chế phân tử

của các vi sinh vật gây bệnh. Từ đó chiến lược chung có những điểm chủ yếu như sau :

– **Chẩn đoán sớm**, thậm chí có thể đi xa hơn là **dự báo** (prognosis) sớm.

– **Điều chỉnh trao đổi chất** của tế bào người bằng thay thế đúng nhân tố bị sai hỏng.

– **Kìm hãm tác động** của các vi sinh vật bằng nhiều biện pháp khác nhau ở mức phân tử.

– Các chế phẩm dược mới sẽ đa dạng hơn và có cơ chế tác động chính xác hơn.

Một đứa bé mới ra đời, căn cứ mẫu DNA, có thể chẩn đoán biết trước sẽ có những bệnh nào. Các số liệu về hoạt động chức năng sẽ cung cấp thêm nhiều thông tin để có thể can thiệp có hiệu quả trước khi có biểu hiện bệnh lí.

Cần lưu ý là việc chữa trị sẽ mang **tính cá thể** cao. Sự phát triển nhanh chóng của kĩ thuật di truyền đã tạo nên sự bùng nổ các thông tin về bộ gen người, đặc biệt là số liệu về các gen liên quan đến nhiều bệnh đặc hiệu. Một lối tiếp cận mới trong săn sóc sức khỏe con người là tìm các biện pháp **dự báo** hơn là chẩn đoán. Nhiều gen có **tác động đa hiệu**, tức một gen có thể biểu hiện ra nhiều kiểu bệnh lí khác nhau. Có ít nhất 14 gen khác nhau được mô tả trong các sách báo khoa học có liên quan đến bệnh tim mạch. Nhiều bệnh thường gặp như đau nửa đầu (migraine), sự bồn chồn, u sầu, bệnh Alzheimer, huyết áp cao, tiểu đường, mập phì... là do **tác động đa gen**. Do nhiều tác động phức tạp khác nhau, sự biểu hiện bệnh mang nhiều **tính cá thể**, phụ thuộc thể trạng của từng người. Trong khi đó, y học hiện nay trong chữa trị chỉ tính đến **con người trung bình**, chung chung (ví dụ, liều thuốc tính theo khối lượng cơ thể) mà không nhằm vào từng cá thể.

Các số liệu phong phú về bộ gen, kết hợp với tin học, dựa vào các bệnh lí được ghi nhận ở các bệnh viện, có thể đi đến chỗ săn sóc sức khỏe theo từng cá thể.

Từ đó, có người nêu ra chiến lược y học thế kỉ 21 như sau :

– Những năm 1900 : bệnh → bác sĩ → liệu pháp → trị.

– Những năm 2000 :

Thử nghiệm chẩn đoán dựa vào DNA bộ gen.



Điều khiển trao đổi chất.



Xử lí giữa bệnh.

2. Các protein trị liệu

Một trong những ứng dụng sớm nhất của kĩ thuật di truyền là tạo dòng và cho biểu hiện hàng loạt các protein trị liệu (bảng 20.4).

BẢNG 20.4. Các chế phẩm trị liệu mới từ kĩ thuật di truyền

Năm	Tên chế phẩm	Bệnh	Công ti
1	2	3	4
1982	Humulin (synthetic insulin).	Tiểu đường kiểu I (Type I diabetes).	Genentech.Inc.
1985	Protropin (human growth hormone).	Thiếu năng hormone tăng trưởng.	Genentech.Inc.
1986	Intron A (interferon- α). Roferon A (interferon- α). Orthoclone OKT ₃ (monoclonal antibody) Recombivac AV (synthetic vaccine).	Ung thư bạch cầu (Hairy cell leukemia) Ung thư bạch cầu Loại thận ghép (Kidney transplant rejection). Viêm gan B (Hepatitis B)	Biogen. Inc. and Schering-Plough.Inc. Genentech.Inc.and Roche.Inc. Ortho Biotech.Inc (Johnson &Johnson.) Chiron Corp.and Merck and Co
1987	Humatrope (human growth hormone). Activase (tissue plasminogen activator).	Thiếu năng hormone tăng trưởng. Nhồi máu cơ tim	Biogen. Inc. and Eli Lilly. Inc. Genentech.Inc.
1988	Intron A Roferon A	Mụn cóc tuyến sinh dục (Genital warts). Mụn cóc tuyến sinh dục	Biogen. Inc. and Schering-Plough.Inc. Genentech.Inc. Genentech.Inc.and Roche.Inc.
1989	Epogen (erythropoetin) Engerix-B Alferon N	Thiếu máu thận Viêm gan B Mụn cóc tuyến sinh dục	Amgen.Inc. Smith Kline Beecham. Inc. Interferon Sciences, Inc
1990	Cytogam Activase AlphaNine ProCrit (erythropoietin alfa) Actimmune (interferon- γ) Adagen (adenosine deaminase)	Nhiễm Cytomegalovirus Pulmonary embolism Máu không đông B Thiếu máu khi trị AIDS/AZT (anemia) Chronic granulomatous disease. Severe combined immuno deficiency (SCID).	Genentech.Inc. Ortho Biotech.Inc Genentech.Inc. Enzon. Inc.

1	2	3	4
1991	Intron A Neupogen (colony stimulating factor). Leukine (GM-CSF)^u Credase (alglucerase). Provisc.	Viêm gan C. Giảm bạch cầu trung tính do hóa trị liệu Tạo Neutrophil khi ghép tủy xương Bệnh Gaucher Mổ mắt	Biogen, Inc. and Schering Plough, Inc. Amgen, Inc. Immunex, Inc. Genzyme Corp. Chiron Corp.
1992	Proleukin (interleukin-2) Alpha Nine SC Intron A Recombinant (factor VIII) OncoScint OV103 (monoclonal antibody complex) OncoScint CR103 (monoclonal antibody complex)	Ung thư thận Nhiễm virus nhân tố IX Viêm gan B Máu không đông A (Hemophilia A) Ovarian cancer imaging Colorectal cancer imaging	Chiron Corp. Biogen, Inc. and Schering-Plough, Inc. Genetics Inst. Inc. and Baxter Corp. Cytogen Corp. Cytogen Corp.
1993	KoGENate (antihemophilic factor) Procrit Orthoclone OKT3 Betaseron (interferon-beta) Neutropin Pulmozym	Hemophilia A Thiếu máu do hóa trị liệu Loại tim và thận ghép (Heart and liver transplant rejection) Multiple sclerosis Lùn do thiếu năng thận Hóa xơ nang (Cystic fibrosis)	Miles, Inc Ortho Biotech Ortho Biotech Johnson & Johnson Berlex Labs., Inc. and Chiron Corp Genentech, Inc Genentech, Inc
1994	Oncospar (pegaspargase) Neutropin Cerezyme (imiglucerase) Neupogen Albunex	Ung thư bạch cầu cấp tính Thiếu năng hormone tăng trưởng Bệnh Gaucher Ghép tủy xương (Bone-marrow transplants) Chẩn đoán bệnh xương (Diagnosis of heart disease)	Enzon, Inc., and Rhone-Poulenc Rorer Genentech, Inc. Genzyme, Inc. Amgen Corp. Molecular Biosystems (Mallinckrodt)

Phần lớn các chế phẩm nêu trên đều nhằm thay thế các protein hay enzyme bị sai hỏng. Ngoài ra, hàng loạt các chế phẩm khác như các antisense RNA, interleukine tác động vào trao đổi chất như kim hãm hoạt động của một gen hay tăng cường khả năng miễn nhiễm của tế bào để chống lại bệnh.

3. Tác động đến các vi sinh vật

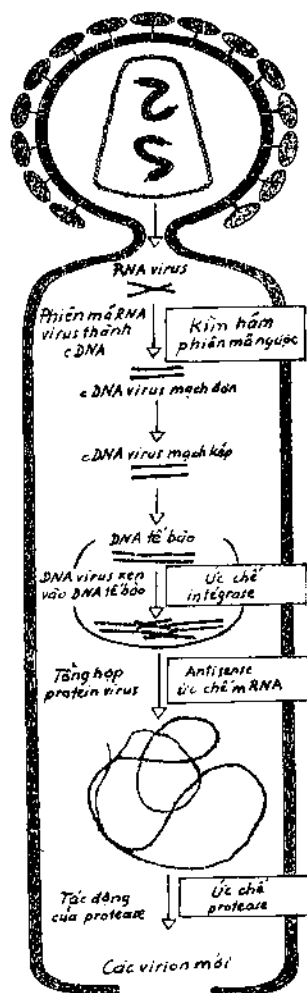
Một ví dụ về *tác động ở mức phân tử* để ngăn chặn các vi sinh vật gây bệnh là các biện pháp được dự kiến để kim hãm tác động của virus HIV (hình 20.8). Sự kim hãm có thể thực hiện :

- Đối với reverse transcriptase.
- Đối với integrase.
- Đối với mRNA bằng antisense oligonucleotide.
- Sử dụng protease để phân hủy các protein của virus.

Đối với từng loại vi sinh vật gây bệnh có thể có các biện pháp khác nhau.

4. Liệu pháp gen (Gene therapy)

Liệu pháp gen được xem là việc chữa trị các bệnh di truyền, bằng cách đưa những *gen bình thường* vào cơ thể để *thay thế các gen bệnh*. Trong trường hợp lý tưởng là làm sao đưa gen bình thường vào đúng vị trí gen sai hỏng và được điều hòa biểu hiện hợp lý. Tuy nhiên đối với người, việc chuyển gen phức tạp hơn, khó khăn hơn so với việc chuyển gen ở động vật bởi do con người không phải là vật thí nghiệm. Về mặt đạo lý, việc chuyển gen vào các *tế bào sinh dục* dễ gây các biến đổi nguy hiểm, nên hiện nay chỉ thực hiện đối với *tế bào soma*.



Hình 20.8. Các biện pháp kim hãm tác động của virus HIV. Các chữ ghi bên ngoài khung chỉ cơ chế hoạt động của virus. Các ô đóng khung chỉ tác động kim hãm.

Liệu pháp gen nhằm :

- Hồi phục chức năng bình thường của tế bào hay mô.
- Hồi phục sai hỏng di truyền.
- Thêm chức năng mới cho tế bào.

a) Những nguyên tắc chung

Trong việc trị bệnh di truyền có những vấn đề cơ bản là:

- Các gen có thể bị đột biến tạo nên các protein mất hoạt tính hay khác thường. Ví dụ : bệnh máu hồng cầu hình liềm.

- Đối với một số gen bệnh di truyền liên quan đến 2 cơ chế :

Cơ chế 1 : sản phẩm bất bình thường.

Cơ chế 2 : sản phẩm được tổng hợp với số lượng nhiều hay ít hơn bình thường.

Trong một số trường hợp, người ta có thể chữa trị bằng con đường bổ sung các chất bị sai hỏng. Ví dụ : bệnh miễn nhiễm hỗn hợp cấp tính (scid) thường làm bệnh nhân chết sớm, nếu thêm chất adenosin desaminase thì bệnh giảm đi. Chất này rất đắt tiền nên nếu bổ sung suốt đời thì quá tốn kém.

Từ đó, liệu pháp gen được đưa ra với các bước như sau :

- Tách các tế bào của cơ thể người bệnh (tế bào tạo máu của tủy sống hay tế bào nguyên sinh (fibroblast) có thể sản xuất máu mang đi khắp cơ thể).

- Tách gen bình thường và chuyển vào tế bào người bệnh.

- Chọn lọc dòng tế bào tốt (tức là những gen lắp đúng chỗ).

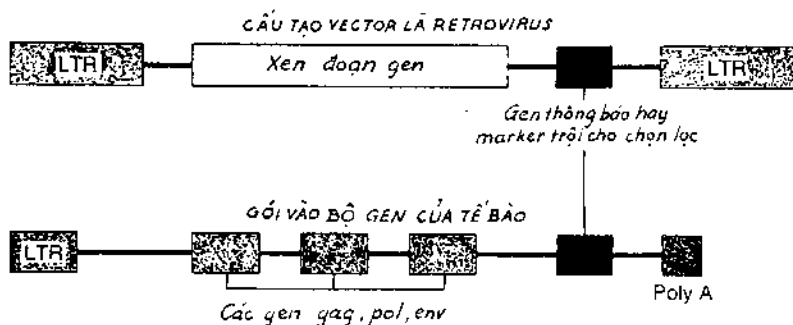
-- Đưa trở lại vào đúng cơ thể.

b) Các vector

Để chuyển gen, có thể sử dụng các vector là virus. Tất cả các loài virus của người đều có thể xâm nhập được vào tế bào người. Tuy nhiên cần lựa chọn để chuyển gen có hiệu quả từ các nhóm sau :

- **Nhóm retrovirus** có enzyme là *reverse transcriptase* chuyển RNA thành cDNA rồi gắn vào bộ gen của tế bào chủ. Đây là nhóm có nhiều thuận tiện trong chuyển gen vào tế bào người do nó có phổ xâm nhập rộng

Vector là retrovirus được cấu tạo gồm gen lặn cần chuyển, promoter, LTR (long terminal repeat - lặp đoạn dài ở cuối), các tín hiệu gói (gói vào đầu virus) và reporter gen (gen thông báo) (hình 20.9).



Hình 20.9. Cấu trúc của vector retrovirus

Để chuyển được gen vào cơ thể người trước hết người ta thay thế 1 đoạn gen có hại của virus bằng gen lành. Tuy nhiên, đây là nhóm virus gây ung thư, nên cần thận trọng.

– **Nhóm adenovirus** là DNA virus, khả năng nhiễm nhiều loại tế bào mà không cần chúng phân chia. Chúng thích hợp cho chuyển gen vào tế bào biểu bì ở đường hô hấp.

Hiện nay, điều đáng lo ngại là không biết nhóm retrovirus ngoài việc gây ung thư có còn gây hậu quả gì khác không. Việc sử dụng virus này cho thấy khi hiểu biết sâu về chúng thì con người có thể sử dụng *kẻ thù* (virus gây ung thư) thành *công cụ có ích* trong việc chữa trị bệnh cho con người.

c) Các tính trạng chữa trị

– Năm 1990 ở Mỹ, Michel Blaese và Frenk Anderson chữa trị bệnh miễn nhiễm hỗn hợp, đã đưa gen vào nhưng hiệu quả không mong muốn vì gen này sau một thời gian có thể ngừng hoạt động.

Hiện nay có khoảng 10 bệnh đang được nghiên cứu chữa trị nhưng chưa đạt được hiệu quả và hi vọng trong tương lai sẽ đưa các gen để trị bệnh cho người (bảng 20.4).

BẢNG 20.4. Các bệnh di truyền thường gặp là mục tiêu của liệu pháp gen

Bệnh	Vị trí trên nhiễm sắc thể	Gen sai hỏng
1	2	3
Hồng cầu hình lưỡi liềm (Sickle cell disease).	11p (nhiễm sắc thể 11-vai ngắn)	Mạch β - hemoglobin (Beta chain of hemoglobin).
Hóa xơ nang (Cystic fibrosis).	7	Nhóm protein gắn với ATP (ATP - binding family protein).

1	2	3
Bệnh Huntington (Huntington's disease).	4	Chưa rõ
Loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne's muscular dystrophy).	X	Dystrophin
Bệnh chậm phát triển trí tuệ do dư phenylalanine (Phenylketonuria mental retardation).	12q	Phenylalanine hydroxylase
Hội chứng Lesch - Nyhan (Lesch-Nyhan syndrome).	Xq	Hypoxanthineguanine-phosphoribosyltransferase
Bệnh Gaucher (Gaucher's disease).	1q	Glucocerebrosidase
Bệnh Tay - Sachs (Tay -Sach's disease).	15q	Mạch alpha của lysosomal hexosaminidase A
Galactosemia		Sự tích tụ galactose
Thiếu năng adenosine desaminase (ADA)(ADA deficiency).	20q13.11	Adenosine desaminase
Thalassemia	11p	Mạch β của hemoglobin
Thiếu năng alpha-1-antitrypsin (Alpha-1-antitrypsin deficiency).	14q	Alpha-1-antitrypsin
Dư cholesterol gia đình (Familial hypercholesteremia).	19p	Thụ thể của lipoprotein
Thiếu năng Ornithine transcarbamylase (Ornithine transcarbamylase deficiency).	Xp	Ornithine transcarbamylase
Hội chứng thiếu năng miễn nhiễm tổ hợp ác tính Scid (severe combined immunodeficiency syndrome)	Xq	mạch alpha của thụ thể IL-2 (IL-2 alpha receptor chain).
Thiếu năng của purine nucleoside phosphorylase (Purine nucleoside phosphorylase deficiency)	14q	Purine nucleoside
Thiếu năng dính của leukocyte (Leukocyte adhesion deficiency).	21q	CD18

Năm 1980, người ta thử tiến hành chữa bệnh di truyền liên quan đến bệnh thiếu máu thalassemia. Năm 1990 (Mi) chữa ở em bé 4 tuổi mang bệnh thiếu ADA - adenosine desaminase nhưng đều không đạt hiệu quả. Việc chuyển gen có thể dẫn đến những kết quả ngoài sức tưởng tượng và chưa lường hết được hậu quả như thế nào.

Ngoài ra, sự phối hợp kĩ thuật di truyền với các kĩ thuật miễn nhiễm có thể đưa đến sản xuất *vaccine* và *liệu pháp miễn nhiễm* (immunotherapy).

Các vector mang các gen này ảnh hưởng đến tế bào ung thư làm tăng cường sự nhận biết và phá hủy chúng bằng hệ thống miễn nhiễm.

5. Vai trò của bioinformatics trong trị bệnh dựa vào bộ gen

Vai trò của bioinformatics trong công nghệ sinh học phân tử là đảm bảo hệ thống thông tin nhằm *tích hợp các số liệu* nhận được từ bản đồ di truyền và trình tự các nucleotide. Nguồn thông tin này có thể làm xuất phát điểm cho sự phát triển các phương pháp chế tạo nhiều thuốc trị bệnh hữu hiệu hơn. Được trang bị bằng các phần mềm, các dữ liệu và Internet, các nhà nghiên cứu sinh y học có thể trả lời cho các câu hỏi quan trọng như :

– Đã tách được gen gây bệnh mong muốn chưa ? Nó có chức năng gì ?

Bao nhiêu protein do nó mã hóa và chúng có chức năng gì ?

– Có thể dự báo cấu trúc và tác động của protein đó không?

– Nhân tố nào tham gia vào điều hòa hoạt động gen ?

– Sử dụng chiến lược nào để chữa trị bệnh ?

Việc xử lý một số lượng lớn dữ liệu cần đến tin học.

Về hình thức, bioinformatics bao gồm sử dụng phần mềm, các database và mạng đối với việc xác định gen; so sánh sự tương đồng giữa các trình tự ; sự phân tích nối theo chiều dọc của các trình tự ; dự báo cấu trúc và chức năng của protein, tìm ra và chế thuốc kháng lại gen bệnh hay sản phẩm của chúng.

6. Chiến lược mới trong chế tạo thuốc

a) Sự đa dạng trong sản xuất thuốc

Thông thường trước đây, các công ti dược phẩm thu lợi nhuận lớn bằng một vài loại thuốc có giá trị đưa ra thị trường và giữ giá. Khối lượng thuốc bán ra tăng, nhưng số lượng các loại thuốc mới được đưa ra thử nghiệm giảm dần đến những năm 1980. Từ cuối những năm 1980 trở lại đây, tình hình sản xuất thuốc diễn ra theo chiều ngược lại : số chủng loại thuốc mới được thử nghiệm tăng vọt và số lượng từng loại lại không lớn. Sự cạnh tranh giữa các loại thuốc diễn ra gay gắt.

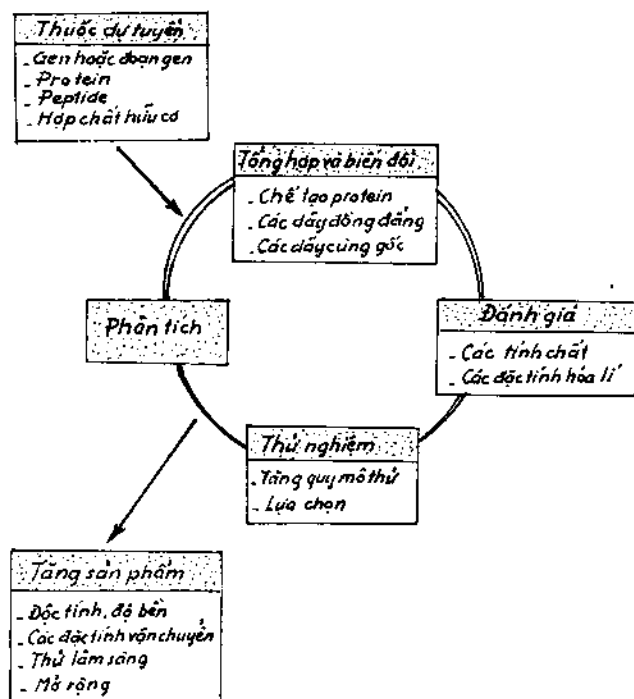
Nguyên do là trước đây, các chất thuốc hầu hết thuộc loại phân tử nhỏ có cơ chế tác động chung, ngày nay, các chất thuốc đa phần là protein có mục tiêu tác động cụ thể, mà số mục tiêu thì rất nhiều. Thêm vào đó, các thành tựu của công nghệ di truyền đã mở ra nhiều phương pháp trị bệnh mới như antisense RNA, interleukine. Các nhà sản xuất nhằm vào các mục tiêu mà nhiều trường hợp giống nhau nên phải rút ngắn thời gian thử nghiệm, giảm giá thành thì mới cạnh tranh được.

b) Chu trình chế tạo thuốc mới

Nhờ các hiểu biết chính xác về cấu trúc và chức năng của nhiều loại protein, việc điều chế thuốc đang chuyển sang giai đoạn mới. **Chế tạo thuốc dựa trên cấu trúc** đã thành phương pháp cốt lõi để phát hiện và tối ưu hóa các thuốc mới. Công việc này được thực hiện nhờ các kĩ thuật mới nhất là **bioinformatics** và **hóa học tổ hợp** (combinatorial chemistry). Việc chế tạo thuốc nhờ sử dụng máy điện toán đã mở ra khả năng tạo nhiều loại thuốc mới hữu hiệu hơn, nhờ vào khả năng thử một số lượng lớn các phân tử ứng viên.

Chu trình chế tạo thuốc mới gồm 6 bước (hình 20.10) như sau :

- Phát hiện và lựa loại đầu bảng (điển hình 1 - 2 năm).
- Tối ưu hóa dạng đầu bảng (1 - 2 năm).
- Thử nghiệm in vitro và in vivo (1 - 2 năm).
- Thử độc tính (1 - 3 năm).
- Thử nghiệm an toàn cho người (1 năm).
- Thử nghiệm hiệu quả ở người (1 - 2 năm).



Hình 20.10. Chu trình chế tạo thuốc mới

Các phân tích cho thấy thời gian để đưa một loại thuốc mới ra thị trường cần 6 đến 12 năm và chi phí khoảng 100 triệu đến 200 triệu USD. Các phương pháp chế thuốc mới dựa vào điện toán và hóa học tổ hợp sẽ giúp rút ngắn thời gian. Hiện nay, các đòi hỏi cao đối với các thuốc mới làm cho sự đầu tư vào sản xuất gia tăng đáng kể : riêng năm 1996, các công ti dược phẩm ở Mỹ đã bỏ ra **16 tỉ USD** cho nghiên cứu RNA và DNA có vai trò quan trọng trong sản xuất thuốc. Trong đó, không thể không nhắc đến vai trò của các công ti tư nhân trong sự phát triển của công nghệ sinh học (xem bảng 20.4).

Sự ra đời của nhiều chế phẩm đang bán ở thị trường và đang thử nghiệm của công nghệ di truyền còn cho thấy tốc độ triển khai nhanh các kết quả nghiên cứu vào sản xuất.

V. MỘT SỐ VẤN ĐỀ XÃ HỘI CỦA DI TRUYỀN HỌC

Các tiến bộ trong việc bảo vệ sức khỏe cho con người là rất lớn, các kĩ thuật mới có thể can thiệp vào trí thông minh, tuy nhiên nhiều vấn đề di truyền học người vẫn chưa có tiến triển đáng kể như sự di truyền trí thông minh, tập tính, ảnh hưởng của các nhân tố di truyền đối với sự phát triển cá thể. Nhiều vấn đề di truyền học, liên quan đến xã hội, đang được bàn cãi.

1. Sự di truyền trí năng (*intelligence*)

Đây là vấn đề có nhiều tranh cãi suốt cả thế kỉ, kể từ lúc di truyền học ra đời cho đến nay và có lẽ còn tiếp tục trong một thời gian dài.

a) Chỉ số thông minh IQ (*Intelligence quotient*)

Các thử nghiệm về *khả năng trí tuệ* được bắt đầu từ năm 1905 để đánh giá khả năng trí tuệ của những đứa bé kém phát triển. Thuật ngữ *chỉ số thông minh IQ* được nêu ra từ năm 1912 để đánh giá trí năng. Sự đánh giá được thực hiện nhờ các thử nghiệm bằng các bài tập với độ khó tăng dần trên các hình, các số và chữ. Tổng trung bình của các lời giải được tính thống kê đối chiếu với tuổi, chia cho tuổi sinh học và nhân với 100. Ví dụ, đứa bé 6 tuổi trả lời được các bài tập của 8 tuổi được tính $IQ = (8/6) \times 100 = 133$. Lúc đầu IQ được dùng cho trẻ em, về sau được áp dụng cho bất cứ lứa tuổi nào. Theo một số nhà khoa học, IQ là số đo về sự hoàn thiện ở lứa tuổi nào đó, đúng hơn là đo trí năng.

b) Trí năng và sự di truyền

Tính di truyền có ảnh hưởng nhất định nào đó đến trí năng. Tuy nhiên, vấn đề tranh cãi là ở mức độ nào. Sự phức tạp của vấn đề được tăng thêm do quan điểm về chủng tộc của nhiều tác giả. Một số tác giả đánh giá

sự di truyền trí năng qua IQ. Nhiều người khác cho rằng vấn đề phức tạp hơn nhiều, không thể chỉ căn cứ vào IQ. Ngoài ra, các phương pháp nghiên cứu về di truyền người chưa hoàn chỉnh, số liệu thu thập không đồng nhất do nhiều yếu tố xã hội.

Năm 1992, có tác giả ghi nhận rằng IQ tăng khoảng 3 điểm trong một thập niên, tức 15 điểm trong 50 năm. Người ta cũng nhận thấy những người làm nghĩa vụ quân sự ở Hà Lan và Bỉ có IQ tăng 7 điểm trong 10 năm. Điều đó cho thấy khó căn cứ vào IQ để đánh giá sự di truyền trí năng.

2. Ưu sinh học (*Eugenics*)

Thuật ngữ “Eugenics”, được F. Galton nêu ra vào năm 1893, với ý muốn phát triển lĩnh vực “cải thiện giống người”. Tuy nhiên vào những năm 1920 - 1930, ưu sinh học bị phát xít Đức lợi dụng, nên trong một thời gian dài không được nhắc tới. Gần đây, với việc ứng dụng kĩ thuật di truyền, nó được đề cập tới nhiều.

Người ta phân ra 2 kiểu ưu sinh học :

– **Ưu sinh học âm** (Negative eugenics) nhằm làm giảm tần số các gen xấu. Ví dụ, có một số nước cấm những người bị bệnh di truyền sinh ra con cái.

– **Ưu sinh học dương** (Positive eugenics) nhằm làm tăng tần số các gen có lợi. Ví dụ, ở Mi hàng năm có khoảng 5000 đến 10.000 trẻ em được sinh ra do tinh trùng của những người cha được chọn lọc. Nguyên nhân của phần lớn sự thụ tinh này là do chồng bất thụ hoặc có bệnh di truyền (như máu không đông).

Hiện nay, một số người cho rằng có thể dùng liệu pháp gen để cải tạo con người, nhưng chỉ nên tác động ở tế bào soma. Báo chí đã có đề cập đến những “**con người siêu việt**”. Tuy nhiên, đây cũng là vấn đề liên quan đến đạo lí và còn đang tranh cãi. Nhiều nhà triết học cho rằng **tính cá thể** (individuality) là một đặc điểm của xã hội loài người nên khó có thể hình dung ra một xã hội mà con người được cải tiến theo những mẫu giống nhau.

3. Đạo lí sinh học

Bên cạnh những đóng góp to lớn cho nhân loại, sự phát triển của di truyền học đồng thời gây không ít những điều đáng lo ngại. Thậm chí, có nơi trên thế giới có những nhà khoa học (được giải Nobel) đề nghị **trừng cầu dân ý để cấm** các nghiên cứu di truyền học. Đa số cho rằng không thể cấm, nhưng phải có những luật lệ để **bảo vệ bộ gen người**, phù hợp với đạo lí.

Kĩ thuật di truyền ngay từ lúc ra đời đã làm nhiều nhà khoa học lo sợ. Trải qua quá trình phát triển trong 25 năm, nhiều vấn đề tâm lí - xã hội được đặt ra. Có thể phân biệt hai loại vấn đề : tâm lí - xã hội và các thí nghiệm phi đạo lí.

a) Các vấn đề tâm lí - xã hội

Nhiều vấn đề tâm lí - xã hội nảy sinh khi biết rõ về bộ gen người :

- Chẩn đoán sớm có ảnh hưởng xã hội như thế nào khi biết rằng một số người mạnh khỏe nhưng có mang gen bệnh ?

- Việc biết trước người có mang gen bệnh có ảnh hưởng đến tâm lí của người đó không, ảnh hưởng đến hôn nhân trong tương lai không và con cái họ sẽ như thế nào ?

- Khi biết trước về bộ gen của mỗi người thì xã hội sẽ đối xử với họ như thế nào. Ví dụ, một số người khó xin việc làm.

Đó là những vấn đề cần lí giải. Do những vấn đề trên, trong chương trình bộ gen người, một *nhóm nghiên cứu về tâm lí - xã hội* đã được thành lập để đánh giá các hậu quả có thể xảy ra.

b) Các thí nghiệm phi đạo lí

Vấn đề mà loài người lo sợ hơn cả là một số cá nhân có thể lợi dụng kĩ thuật di truyền tạo ra các dạng sinh vật phi đạo lí. Điều này cần được sớm ngăn chặn. Tuy nhiên, hiện vẫn còn nhiều tranh cãi và chưa có sự nhất trí. Ví dụ, sau thí nghiệm tạo dòng người (human cloning) ở Mỹ vào năm 1993, Cộng đồng Châu Âu và một số nước đã nêu ra các luật lệ cấm các thí nghiệm tương tự. Những người bảo vệ môi sinh kịch liệt phản đối việc tạo dòng người và cả tạo giống sinh vật mới bằng kĩ thuật di truyền.

Trong khi đó, J.Lederberg (giải Nobel về y học) bảo vệ quan điểm cần tạo dòng người như phương tiện để sản sinh ra "các cá thể ưu việt". H.Varmus, tổng giám đốc của NIH (National institut of Health), đã giải trình trước Quốc hội Mỹ : "trong một số tình huống hiếm hoi, nó có thể có lợi như một đứa bé được tạo ra từ tủy sống của người đàn ông bất thụ".

UNESCO đã thành lập *Ủy ban Quốc tế về Đạo lí sinh học IBC* (International commitee of bioethics). Tổ chức này đã nêu ra các dự án, thu thập ý kiến để đi đến *các luật lệ về đạo đức sinh học*. Ủy ban này tuyên bố rằng "*bộ gen người là tài sản chung của loài người*". Nó là đối tượng cần được bảo vệ và không ai có quyền sử dụng nó làm đối tượng để phân biệt dựa trên các đặc tính về di truyền. Ủy ban kêu gọi các quốc gia cần theo dõi các nghiên cứu và có biện pháp *bảo vệ bộ gen người*.

4. Kỹ thuật di truyền có đáng sợ không ?

Kỹ thuật di truyền ngay từ khi ra đời đã gây nhiều lo ngại cho các nhà khoa học. Năm 1975, hội thảo ở Asilomar (California) đã xác định những *nguy hiểm* có thể xảy ra và đặt ra các nguyên tắc để ngăn ngừa thảm họa. Sau hơn 20 năm phát triển của kỹ thuật di truyền, nhiều vấn đề đã sáng tỏ hơn, nhưng chưa có câu trả lời dứt khoát.

Các *sinh vật được biến đổi về mặt di truyền GMO* (Genetic modified organism) có thể gây các hậu quả như :

- Các vi sinh vật GMO có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của các dạng tự nhiên hay tạo các dạng gây bệnh mới do tái tổ hợp với các dạng tự nhiên.
- Các gen của vi sinh vật GMO có thể gây nguy hiểm cho cơ thể người về lâu dài không ?
- Các thực vật GMO kháng chất diệt cỏ có chuyển gen cho cỏ dại không hay ong không thể thụ phấn cho các cây kháng côn trùng thì hậu quả sẽ như thế nào.
- Các động vật GMO khi thoát ra môi trường tự nhiên có lấn át các động vật khác không.

Nhiều nước đặt ra các quy chế và luật lệ kiểm soát chặt chẽ các GMO.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Con người cũng chịu sự chi phối của các quy luật di truyền. Việc nghiên cứu di truyền người có nhiều khó khăn riêng, nhiều vấn đề liên quan đến đời sống xã hội. Thời gian gần đây nhờ các *kỹ thuật mới* như *FISH, RH, tạo dòng định vị (STS)* và nhiều phương pháp khác, *bản đồ tích hợp* của tất cả các nhiễm sắc thể người được xây dựng chi tiết. *Chương trình xác định trình tự 3 tỉ nucleotide của bộ gen người* đạt những bước tiến ngoạn mục. Các kiến thức về di truyền y học ngày càng phong phú hơn và nhiều bệnh di truyền được xác định rõ cơ chế phân tử. *Y học dựa trên cơ sở bộ gen* đang phát triển mạnh làm *thay đổi chiến lược* trị bệnh và sản xuất thuốc. *Chẩn đoán và dự báo sớm* cùng sự can thiệp trực tiếp vào trao đổi chất của tế bào, cũng như kim hãm hoạt tính của các vi sinh vật gây bệnh là những nét căn bản của y học mới. *Liệu pháp gen* và *miễn nhiễm* sẽ là những biện pháp chữa trị nhiều bệnh trong tương lai. Các thuốc mới sẽ đa dạng hơn và được *chế tạo theo cấu trúc* cần tác động với sự hỗ trợ của bioinformatics và hóa tổ hợp.

Nhiều vấn đề di truyền học liên quan đến xã hội như sự *di truyền trí thông minh, ưu sinh học*. Nhiều thí nghiệm di truyền có thể ảnh hưởng đến đạo lí, nên cần có các luật cụ thể kiểm soát các nghiên cứu di truyền.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nghiên cứu di truyền học người có những đặc điểm gì ?
2. Nêu các phương pháp nghiên cứu di truyền người.
3. Hãy mô tả các bước chủ yếu trong xây dựng bản đồ bộ gen hiện nay.
4. Chương trình xác định trình tự nucleotide của bộ gen người đạt được kết quả như thế nào ?
5. Y học dựa trên cơ sở bộ gen người có những đặc điểm gì ?
6. Tin học có vai trò như thế nào trong trị liệu và chế tạo thuốc mới.
7. Sản xuất thuốc trong thời gian tới có những đặc điểm gì ?
8. Có thể đánh giá sự di truyền trí thông minh qua chỉ số IQ không ?
9. Ưu sinh học là gì ? Có cần phát triển nó trong tương lai không ?
10. Vì sao cần có các luật lệ về đạo lí sinh học ?

BÀI TẬP CÓ LỜI GIẢI

Trong phân tích FISH (Fluorescent in situ hybridization), mẫu DNA được dùng để xác định vị trí gen trên nhiễm sắc thể qua phản ứng màu huỳnh quang do lai tại chỗ. Nhiễm sắc thể ở gian kì trước khi sao chép DNA cho một tín hiệu lai đối với một nhiễm sắc thể. Giả định mỗi tín hiệu FISH được tạo ra với mỗi mạch DNA của nhiễm sắc thể. Các kết quả của FISH sẽ như thế nào khi phân tích một mẫu tinh hoàn gồm có các loại tế bào sau :

- a) Tinh nguyên bào sơ cấp (gian kì).
- b) Tinh nguyên bào sơ cấp (kì trước).
- c) Tinh nguyên bào thứ cấp (gian kì).
- d) Tinh nguyên bào thứ cấp (kì trước).
- e) Tinh trùng.

Lời giải

- a) Tế bào lưỡng bội ở gian kì có hai nhiễm sắc thể sẽ cho 2 tín hiệu FISH.
- b) Sao chép DNA xảy ra trong pha S, nên ở kì trước có 2 nhiễm sắc thể đôi nên có 4 tín hiệu FISH.
- c) Tinh nguyên bào thứ cấp đã qua một lần chia còn nhiễm sắc thể đôi (1 nhiễm sắc thể tương đồng có 2 chromatid) nên có 2 tín hiệu FISH.

d) Vì không có sao chép ở giảm phân II nên ở kì trước nhiễm sắc thể vẫn kép, nên có 2 tín hiệu FISH.

e) Tinh trùng chỉ có nhiễm sắc thể đơn nên chỉ có 1 FISH.

BÀI TẬP BỔ SUNG

1. Locus R kiểm soát việc sản xuất một loại kháng thể của tế bào hồng cầu người. Allele trội tạo các cá thể Rh^+ (rhesus dương), trong khi đó đồng hợp tử lặn tạo các cá thể Rh^- . Một quần thể có 85 % người Rh^+ được nghiên cứu. Giả sử quần thể ở trạng thái cân bằng, tần số các allele ở locus đó sẽ như thế nào ?

2. Hói đầu là một tính trạng mà sự biểu hiện phụ thuộc giới tính: trội ở nam và lặn ở nữ. Trong một nhóm chọn có 10.000 nam, 7225 không bị hói đầu. Trong nhóm chọn nữ với số lượng như vậy, có bao nhiêu phụ nữ không hói đầu?

3. Một nhóm người được nghiên cứu nhóm máu ABO.

a) Kết quả thu mẫu như sau: 23 nhóm máu AB, 441 nhóm máu O, 371 nhóm máu B và 65 nhóm máu A. Tính tần số các allele I_A , I_B và I .

b) Nếu biết tần số $I_A = 0,36$; $I_B = 0,20$, và $I = 0,44$. Hãy tính tần số phần trăm người trong quần thể sẽ có nhóm máu A, B, AB và O.

4. Mù màu ở người do gen lặn liên kết với giới tính. Sự theo dõi 500 đàn ông từ một quần thể cho thấy có 20 bị mù màu.

a) Tần số allele bình thường trong quần thể là bao nhiêu ?

b) Có bao nhiêu phần trăm phụ nữ có thể mù màu ?

5. Một cặp vợ chồng có một đứa con bị bệnh di truyền do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường. Bệnh do thiếu năng enzyme dehydrogenase ảnh hưởng đến trao đổi chất acid béo. Cặp vợ chồng này muốn có thêm con. Hãy tính xác suất :

a) Đứa con tiếp theo bị bệnh.

b) Đứa con mang gen bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 1997. *Sinh học phân tử*. Nxb giáo dục.
2. Lê Đình Lương, Phan Cự Nhân, Vũ Tuyên Hoàng, 1986. *Từ điển di truyền học, di truyền tế bào học và chọn giống - Anh Việt*. Nxb Khoa học và kĩ thuật .
3. Nguyễn Khắc Thuần, 1995. *Đại cương lịch sử cổ trung đại Việt Nam*. Tủ sách Đại Học Tổng Hợp.
4. Nguyễn Lộc và Trịnh Bá Hữu, 1975. *Di truyền học*. Nxb ĐH và THCN - HN.
5. Trần Ngọc Thêm, 1995. *Cơ sở văn hóa Việt Nam*. Trường ĐH Tổng Hợp.
6. N. P. Dubinin, 1986. *Obshaia genetika* (tiếng Nga : Di truyền học đại cương). "Nauka". Moskova.
7. A.E.Gaisimovich, 1988, *Sự phát sinh và phát triển của di truyền học* (tiếng Nga). "Nauka". Moskova.
8. M. I. Lobashov, 1969. *Genetica* (tiếng Nga : Di truyền học). NXB Đại học Tổng hợp Leningrad.
9. S. G. Inge - Vechtomov, 1989. *Genetica c osnovami selectsii* (tiếng Nga : Di truyền học với cơ sở chọn giống). Moskova.
10. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc.
11. K. W. Adolph, 1995. *Methods in molecular genetics* . Vol.6 Academic Press.
12. E. A. Birge, 1994. *Bacterial and bacteriophage genetics*. Spinger.
13. C. J. Bos, 1996. *Fungal genetics*. Principles and Practice – Marcel Dekker Inc.
14. T. A. Brown, 1995. *Gene Cloning an Introduction*. Chapman & Hall.
15. M. J. Dawson, R. Powell, F. Gannon, 1996. *Gene technology*. Biosscientific Publishers Ltd.
16. A. E. H. Emery, S. Malcolm, 1995. *An Introduction to Recombinant DNA in Medicine*. JohnWiley & Sons, Inc.,.
17. C. H. Mc Fadden, W. T. Keeton, 1994. *Biology : an Exploration of Life*. W. W. Norton & Company.
18. M. J. Gasson, W. M. Devos, 1995. *Genetic and biotechnology of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional.
19. D. L. Hartl, D. Freifelder, L. A. Snyder, 1988. *Basic Genetics*. Jones and Bartlett Publishers, Inc.
20. J. C. Kaplan, M. Delpech, 1992. *Biologie moléculaire et médecine*. Médecine - Sciences Flammarion.
21. A. Kornberg & T. A. Baker, 1992. *DNA Replication*. W. H. Freeman and Company.
22. D. Latchman, 1996. *Gene regulation*. Chapman & Hall.
23. B. Lewin, 1987. *Genes III*. JohnWiley & Sons, Inc.
24. B. Lewin, 1995. *Genes IV*. JohnWiley & Sons, Inc.
25. B. Lewin, 1996. *Genes V*. JohnWiley & Sons, Inc.

26. S. Manlik, S. D. Patel, 1997. *Molecular biotechnology*. Wiley Liss Inc.
27. C. R. Newton and A. Graham, 1995. *PCR*. Bios Scientific Publishers Ltd.
28. R. W. Old & S. B. Primrose, 1994. *Principles of Gene Manipulation*. Blackwell Science.
29. G. W. H. Potter, 1995. *Analysis of biological molecules*. Chapman & Hall.
30. I. Portrykus, G. Spangenberg, 1995. *Gene transfer to plant*. Springer.
31. P. Singleton, D. Sainsbury, 1997. *Dictionary of microbiology and Molecular Biology*. JohnWiley & Sons, Inc.
32. C. A. Smith & E. J. Wood, 1991. *Molecular biology & biotechnology*. Chapman & Hall.
33. C. A. Smith & E. J. Wood , 1992. *Cell Biology*. Chapman & Hall.
34. W.D.Stansfield, 1991. *Theory and problems of Genetics*. McGraw-Hill, Inc.
35. M.W.Strickberger, 1985. *Genetics*. Macmillan Pub. Company.
36. M.W.Strickberger, 1996. *Evolution*. Macmillan Pub. Company.
37. D. T. Suzuki, A. J. F. Griffiths, J. H. Miller, R. CÚA. Lewontin, 1989. *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company / New York.
38. Watson, Hopkins, Roberts, Steitz, Weiner, 1987. *Molecular biology of the gene*. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc.
39. A. M. Winchester, 1961. *HEREDITY : An Introduction to Genetics*. Barnes & Noble, Inc.
40. *NATURE*. Supplement to Nature 28 September 1995. Vol. 377.
41. *Science*. N^o 123, 135, Janvier, 1988,1989.
42. *Scientific American*, May, 1994.

MỤC LỤC

PHẦN MỞ ĐẦU

CHƯƠNG I. DẪN NHẬP : DI TRUYỀN HỌC - TRUNG TÂM CỦA SINH HỌC

I. Thế nào là di truyền học ?	6
II. Các giai đoạn phát triển căn bản của Di truyền học.	9
III. Các nguyên tắc nghiên cứu Sinh học.	16
IV. Các phương pháp nghiên cứu Di truyền học.	17
V. Tế bào.	19
VI. Gen và cơ thể.	21
VII. Quan hệ với các khoa học khác và với thực tiễn.	23
VIII. Đôi điều về Di truyền học ở Việt Nam.	28

PHẦN I. DI TRUYỀN HỌC CỔ ĐIỂN

CHƯƠNG II. DI TRUYỀN HỌC MENDEL

I. Mendel và quan niệm về gen.	31
II. Lai đơn tính và quy luật giao tử thuần khiết.	39
III. Lai với hai và nhiều cặp tính trạng.	43
IV. Các phát hiện bổ sung.	49

CHƯƠNG III. SỰ TƯƠNG TÁC GIỮA CÁC GEN VỚI NHAU VÀ VỚI MÔI TRƯỜNG

I. Các kiểu tương tác gen.	57
II. Sự thay đổi tỉ lệ kiểu hình ở lai lưỡng tính.	65
III. Những phức tạp trong biểu hiện của gen..	68
IV. Tác động của môi trường.	71

CHƯƠNG IV. DI TRUYỀN HỌC NHIỄM SẮC THỂ

I. T.H. Morgan và thuyết di truyền nhiễm sắc thể.	81
II. Nhiễm sắc thể.	84
III. Chu trình tế bào và phân bào ở <i>Eukaryotae</i> .	89
IV. Sự xác định giới tính (Sex determination).	97
V. Sự di truyền liên kết với giới tính.	104
VI. Sự di truyền liên kết.	111
VII. Tái tổ hợp và trao đổi chéo.	114
VIII. Xác định vị trí gen và bản đồ di truyền.	121
IX. Sự đa dạng các cơ chế di truyền.	125

PHẦN II. CƠ SỞ PHÂN TỬ CỦA TÍNH DI TRUYỀN

CHƯƠNG V. BẢN CHẤT CỦA VẬT CHẤT DI TRUYỀN

I. DNA là vật chất di truyền.	136
II. Thành phần và cấu trúc hóa học của DNA.	140
III. DNA trong tế bào.	149
IV. Sao chép DNA.	156
V. DNA thỏa mãn các yêu cầu đối với vật chất di truyền.	165

CHƯƠNG VI. SINH TỔNG HỢP PROTEIN

I. Cấu trúc và chức năng của protein.	170
II. Gen kiểm tra các phản ứng sinh hoá.	176
III. Cấu trúc và chức năng của gen	181
IV. Học thuyết trung tâm.	186
V. Quá trình phiên mã (Transcription).	193
VI. Các RNA và vai trò của chúng.	196
VII. Dịch mã (Translation).	200
VIII. Gen là gì ?	205

CHƯƠNG VII. ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN

I.	Các hiện tượng điều hòa.	210
II.	Các mức điều hòa.	214
III.	Điều hòa hoạt tính gen của <i>Prokaryotae</i> .	217
IV.	Điều hòa hoạt tính gen của <i>Eukaryotae</i> .	226
V.	Sự biệt hóa tế bào.	231

PHẦN III. BIẾN DỊ

CHƯƠNG VIII. ĐỘT BIẾN GEN

I.	Biến dị không di truyền và di truyền.	239
II.	Phân loại đột biến.	242
III.	Các phương pháp phát hiện đột biến.	246
IV.	Cơ chế phân tử của đột biến.	251
V.	Đột biến nhân tạo hay cảm ứng.	256
VI.	Hội biến.	263

CHƯƠNG IX. ĐỘT BIẾN CẤU TRÚC VÀ SỐ LƯỢNG NHIỄM SẮC THỂ

I.	Biến đổi cấu trúc trên một nhiễm sắc thể.	272
II.	Biến đổi cấu trúc giữa các nhiễm sắc thể.	279
III.	Đa bội thể nguyên.	284
IV.	Đa bội thể lệch.	290

CHƯƠNG X. CÁC CƠ CHẾ SỬA SAI VÀ BẢO VỆ DNA

I.	Khái quát về các cơ chế sửa sai	301
II.	Các kiểu sửa sai.	305
III.	Bảo vệ DNA : Hệ thống restriction - biến đổi.	312

PHẦN IV. DI TRUYỀN HỌC VI SINH VẬT

CHƯƠNG XI. DI TRUYỀN HỌC VIRUS

I.	Ưu thế và các đặc điểm của các đối tượng vi sinh vật.	320
II.	Sinh học của virus.	323
III.	Bacteriophage - virus của vi khuẩn.	328
IV.	Các virus <i>Eukaryotae</i> .	335

CHƯƠNG XII. DI TRUYỀN HỌC VI KHUẨN

I.	Sinh học của vi khuẩn.	343
II.	Biến nạp.	347
III.	Tái nạp.	350
IV.	Giao nạp.	354
V.	Lập bản đồ di truyền nhiễm sắc thể của vi khuẩn.	357

CHƯƠNG XIII. DI TRUYỀN HỌC VI NẤM VÀ VI TẢO

I.	Các vi nấm.	364
II.	Các tảo lục đơn bào.	374

CHƯƠNG XIV. KỸ THUẬT DI TRUYỀN

I.	Các enzyme restriction endonuclease.	379
II.	Thu nhận gen.	383
III.	Các vector chuyển gen.	387
IV.	Tạo plasmid tái tổ hợp.	395
V.	Biến nạp DNA tái tổ hợp vào tế bào.	400
VI.	Chọn lọc, tạo dòng và sự biểu hiện của gen.	402
VII.	Phương pháp PCR.	405
VIII.	Công cụ nghiên cứu sinh học.	409

IX.	Xác định trình tự các nucleotide của gen.	413
X.	Công nghệ protein (Protein engineering).	417
XI.	Các phương pháp chẩn đoán mới.	422
XII.	Quyền lực cải tạo sinh giới của kĩ thuật di truyền.	425

CHƯƠNG XV. SỰ DI TRUYỀN TẾ BÀO CHẤT

I.	Sự di truyền của lục lạp.	436
II.	Sự di truyền của ti thể.	443
III.	Các kiểu di truyền tế bào chất khác.	449

PHẦN V. DI TRUYỀN HỌC PHÁT TRIỂN CÁ THỂ VÀ DI TRUYỀN HỌC TIẾN HÓA

CHƯƠNG XVI. DI TRUYỀN HỌC PHÁT TRIỂN CÁ THỂ

I.	Các đối tượng mô hình nghiên cứu di truyền học phát triển cá thể.	455
II.	Tổ chức bộ gen ở <i>Eukaryotae</i> .	462
III.	Các nhân tố tác động đến sự phát triển.	469
IV.	Sự phát triển theo không gian : Các gen tác động đến hình mẫu thiết kế cơ thể.	472
V.	Chu trình phân bào và sự chết của tế bào.	477
VI.	Sự phát triển ở thực vật.	483
VII.	Ung thư.	485

CHƯƠNG XVII. CÁC BIẾN ĐỘNG CỦA BỘ GEN

I.	Tái tổ hợp tương đồng.	493
II.	Tái tổ hợp điểm chuyên biệt.	497
III.	Transposition (Sự chuyển vị).	501
IV.	Sự di truyền của các cơ chế miễn nhiễm.	505

CHƯƠNG XVIII. DI TRUYỀN HỌC TIẾN HÓA

I.	Di truyền học quần thể.	514
II.	Biến dị.	520
III.	Chọn lọc.	529
IV.	Sự tiến hóa phân tử.	533

PHẦN VI. ỨNG DỤNG CỦA DI TRUYỀN HỌC

CHƯƠNG XIX. CHỌN VÀ CẢI THIẾN GIỐNG

I.	Các nguồn vật liệu.	543
II.	Các phương pháp chọn giống.	545
III.	Chọn giống vi sinh vật.	552
IV.	Chọn giống thực vật.	555
V.	Chọn giống ở động vật.	566

CHƯƠNG XX. DI TRUYỀN HỌC NGƯỜI

I.	Các đặc điểm và phương pháp nghiên cứu.	573
II.	Phân tích bộ gen người.	577
III.	Di truyền y học.	587
IV.	Y học trên cơ sở hiểu biết về bộ gen.	593
V.	Một số vấn đề xã hội của di truyền học.	603
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	609
	MỤC LỤC	611

Chịu trách nhiệm xuất bản :

Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO

Biên tập nội dung :

ĐỖ MẠNH HÙNG

Biên tập tài bản :

**ĐỖ MẠNH HÙNG
TRẦN MINH HƯƠNG**

Biên tập kỹ - mỹ thuật :

TRẦN THÀNH TOÀN

Trình bày bìa :

HOÀNG PHƯƠNG LIÊN

Sửa bản in :

THANH VÂN

Chế bản tại :

PHÒNG CHẾ BẢN ĐIỆN TỬ - CN.NXBGD - TP. HCM

DI TRUYỀN HỌC

Mã số : 7K338t6-CNII

In 1.000 bản, khổ 16 x 24 cm tại Nhà in Thanh Niên, 62 Trần Huy Liệu-
Q.PN TP. HCM. Số in : 03. Số xuất bản : 03-2006/CXB/79-1859/GD. In
xong và nộp lưu chiểu tháng 02 năm 2006.

MỜI BẠN TÌM ĐỌC SÁCH SINH HỌC CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC :

NHỮNG KIẾN THỨC CƠ BẢN VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

DI TRUYỀN HỌC

**NGUỒN GỐC LOÀI NGƯỜI
SINH HỌC CỦA SỰ SINH SẢN**

**GIÁO TRÌNH SINH HOÁ HIỆN ĐẠI
SINH HỌC PHÂN TỬ
CÔNG NGHỆ VI SINH**

**HƯỚNG DẪN THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC
CƠ THỂ NGƯỜI - THẾ GIỚI KÌ DIỆU VÀ BÍ ẨN
CÂY CỎ CÓ ÍCH Ở VIỆT NAM (TẬP 1, 2)**

GS.TS. NGUYỄN VĂN UYỂN (Chủ biên)

TS. NGUYỄN TIẾN THẮNG

PGS. TS. PHẠM THÀNH HỒ

PGS. TS. PHẠM THÀNH HỒ

TS. HỒ HUỲNH THỦY DƯƠNG

THS. PHAN KIM NGỌC

TS. NGUYỄN TIẾN THẮNG

TS. HỒ HUỲNH THỦY DƯƠNG

TS. TRẦN THỊ THANH

THS. TRẦN THANH THỦY

PGS. NGUYỄN PHƯƠNG HẠNH

TS. VÕ VĂN CHI (Chủ biên)

TS. TRẦN HỢP

**Bạn đọc có thể mua tại các Công ti Sách - Thiết bị trường học ở địa phương hoặc
các cửa hàng của Nhà xuất bản Giáo dục :**

★ 81 TRẦN HƯNG ĐẠO hoặc 57 GIẢNG VÕ - HÀ NỘI

★ 15 NGUYỄN CHÍ THANH - ĐÀ NẴNG

★ 231 NGUYỄN VĂN CỬ - Q5 - THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



GIÁ : 55.000đ