TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
PGS. TS. KHUẤT HỮU THANH

CƠ SỞ DI TRUYỀN PHÂN TỬ VÀ KỸ THUẬT GEN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
TS. KHUẤT HỮU THANH

CƠ SỞ DI TRUYỀN PHÂN TỬ VÀ KỸ THUẬT GEN

(In lần thứ ba)

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI

LỜI GIỚI THIỆU

Sách " Cơ sở Di truyền phân tử và Kỹ thuật gen" của Tiến sĩ Khuất Hữu Thanh là giáo trình chuyên ngành dùng cho sinh viên ngành Công nghệ Sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, viết theo chương trình đã được duyệt của Bộ Giáo dục - Đào tạo. Sách viết công phu, chuẩn mực, đạt các yêu cầu: cơ bản, hiện đại, Việt Nam và sư phạm, đặt ra với một sách giáo khoa đại học Việt Nam.

Đặc biệt sách có ưu điểm nổi bật và có sức hấp dẫn là đã viết với nội dung khá cập nhật, bám sát các phát triển mới nhất những năm gần đây của Sinh học phân tử, Di truyền học phân tử. Những vấn đề chuyên sâu về phương pháp phân tích phân tử, về kỹ thuật gen được trình bày sáng sủa, súc tích, khoa học, có hệ thống, nêu được cơ sở khoa học của các kỹ thuật sinh học phân tử ứng dụng trong thực tiễn.

Sách ra đời đáp ứng tốt các yêu cầu cải cách hiện nay trong đào tạo đại học, phù hợp với phương hướng đổi mới nội dung, phương pháp dạy và học ở đại học, trong đó chủ yếu là tự học. Đây cũng là tài liệu tham khảo tốt cho sinh viên ngành Công nghệ sinh học, Công nghệ thực phẩm các trường kỹ thuật và cho sinh viên ngành Sinh học, Nông nghiệp, Lâm nghiệp của một số trường đại học khác.

Ngoài hiệu quả phục vụ đào tạo đại học và sau đại học, sách còn có giá trị phục vụ cho nghiên cứu khoa học, cung cấp các kiến thức, kỹ năng, kỹ thuật phân tích thực nghiệm trong sinh học phân tử, di truyền phân tử và kỹ thuật gen, giúp cán bộ nghiên cứu công nghệ sinh học đón đầu các hướng phát triển hiện đại của Sinh học thế kỷ 21.

Giáo sư - Tiến sĩ - Nhà giáo Nhân dân

Phan Cự Nhân

LỜI NÓI ĐẦU

Trong những năm gần đây sinh học hiện đại và các kỹ thuật nghiên cứu sinh học không ngừng phát triển, là cơ sở cho các ứng dụng trong nông nghiệp, y học và bảo vệ sức khoẻ con người. Di truyền phân tử và kỹ thuật gen là những chuyên ngành sâu cần thiết cho các nhà sinh học, nhất là các kỹ sư công nghệ sinh học. Công nghệ sinh học hiện đại mà nền tảng là di truyền phân tử và kỹ thuật gen ngày càng có nhiều ứng dụng trong thực tiễn sản xuất phục vụ đời sống của con người. Các thành tựu về giải mã bộ gen người, bộ gen cây lúa, bộ gen chuột, nhân bản động vật... đã mở ra một thời kỳ mới giúp con người hiểu biết, có thể chữa khỏi một số bệnh nan y, nâng cao sức khoẻ và đời sống con người.

Để đáp ứng nhu cầu học tập của sinh viên, chúng tôi biên soạn giáo trình ***Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen***, nhằm mục đích cung cấp kiến thức cơ bản trong lĩnh vực di truyền học, di truyền phân tử, các nguyên lý cơ bản của kỹ thuật gen và cơ sở khoa học của một số ứng dụng di truyền phân tử và kỹ thuật gen trong thực tiễn. Giáo trình được biên soạn trên cơ sở phân phối chương trình được Bộ Giáo dục & Đào tạo phê duyệt trong chương trình giảng dạy khối Thực phẩm - Sinh học các Trường Đại học kỹ thuật (1997). Giáo trình được dùng làm tài liệu học tập hoặc tham khảo cho sinh viên, học viên cao học, nghiên cứu sinh... các ngành công nghệ sinh học, công nghệ thực phẩm thuộc Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm trường đại học Bách khoa Hà Nội, Viện Đại học Mở Hà Nội và các Trường Đại học khác như Đại học Quốc gia, Đại học Nông nghiệp...

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. TS. Nhà giáo Nhân dân Phan Cự Nhân, PGS. Lê Ngọc Tú đã sửa chữa và đóng góp những ý kiến quí báu. Xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp Phòng nghiên cứu Vi sinh và Kỹ thuật di truyền Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, động viên giúp đỡ, tạo điều kiện hoàn thành giáo trình. Trong quá trình biên soạn giáo trình, chúng tôi đã cố gắng cập nhật các kiến

thức hiện đại, bám sát mục đích và tính đặc thù của môn học, tuy nhiên không thể tránh khỏi những thiếu sót. Chúng tôi mong muốn nhận được nhiều ý kiến đóng góp của bạn đọc và đồng nghiệp để giáo trình ngày càng hoàn chỉnh hơn.

Xin chân thành cảm ơn các ý kiến đóng góp của bạn đọc.

TS. KHUẤT HỮU THANH
Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

MỤC LỤC

Chương 3. DI TRUYỀN VI SINH VẬT

Chương 4. CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

Chương 5. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP CƠ BẢN SỬ DỤNG TRONG KỸ THUẬT GEN

Chương 6. DI TRUYỀN NHIỄM SẮC THỂ

Chương 7. DI TRUYỀN NGOÀI NHIỄM SẮC THỂ

Chương 8. ĐỘT BIẾN

Chương 1

VẬT CHẤT DI TRUYỀN

I. LƯỢC SỬ NGHIÊN CỨU VÀ THÀNH TỰU CHỦ YẾU CỦA DI TRUYỀN HỌC VÀ KỸ THUẬT GEN

Trong những năm cuối của thế kỷ 20, Di truyền học và Kỹ thuật gen đã phát triển nhanh chóng, đạt được những thành tựu to lớn về lý thuyết và thực tiễn. Sự phát triển của Di truyền học và Kỹ thuật gen giúp cho con người hiểu biết cơ sở khoa học của một số bệnh nan y, chế tạo ra các loại thuốc mới giúp con người chống lại bệnh tật, nâng cao sức khoẻ và đời sống. Thành tựu của Di truyền học và Kỹ thuật gen ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong thực tiễn sản xuất nông nghiệp, công nghiệp. Các giống vật nuôi, cây trồng mới có năng suất cao phẩm chất tốt, các giống động thực vật chuyển gen đáp ứng yêu cầu của con người...được đưa vào sản xuất đại trà. Mặt khác, một số chủng giống vi sinh vật tích luỹ các chất hoạt tính sinh học, hoặc sinh enzym, kháng sinh cao được ứng dụng trong sản xuất ở qui mô công nghiệp mang lại lợi ích kinh tế đáng kể cho con người.

Mốc khởi đầu cho sự phát triển của di truyền học thực nghiệm được đánh dấu bằng công trình của Gregor Mendel (1865), thành tựu lớn nhất trong những năm đầu thế kỷ 21 là công trình giải mã bộ gen người và nhân bản vô tính người.

Lược sử phát triển của Di truyền học và Kỹ thuật gen có thể tóm tắt bằng các công trình chủ yếu sau:

1865 - Gregor Mendel phát hiện các qui luật di truyền, nêu khái niệm "nhân tố di truyền" được xem là vật chất di truyền của các tính trạng.

1869 - Friedrich Miescher phát hiện acid nucleic.

1900 - Hugo de Vries, Carl Corren, Erich von Tschermak tái phát hiện qui luật di truyền Mendel.

1902 - Walter Sutton, Theodor Boveri nêu thuyết cấu trúc nhiễm sắc thể.

1910 - Thomas Hunt Morgan và cộng sự phát hiện vị trí sắp xếp của các gen trên nhiễm sắc thể.

1941 - George Beadel, E.L. Tatum nêu giả thuyết một gen - một enzym.

1944 - Oswald Avery, Colin McLeod, Maclyn McCarty xác định gen cấu tạo từ DNA.

1953 - James Watson, Francis Crick và cộng sự phát minh mô hình cấu trúc xoắn kép của phân tử DNA.

1958 - Mathew Meselson, Franklin Stahl phát hiện cơ chế tái bản DNA theo cơ chế bán bảo thủ.

1961 - Sydney Brener, Francois Jacob, Mathew Meselson phát hiện RNA thông tin (mRNA)

1966 - Marshall Nirenberg, Gobind Khorana hoàn thiện bảng mã di truyền.

1970 - Hamilton Smith phát hiện enzym giới hạn (restriction enzyme).

1972 - Paul Berg thành công tạo DNA tái tổ hợp in vitro.

1973 - Herb Boyer, Stanley Cohen lần đầu tiên sử dụng plasmid tách dòng DNA.

1977 - Walter Gilbert và Frederick Sanger phát minh phương pháp giải trình tự gen.

1977 - Frederick Sanger lần đầu tiên giải trình tự hoàn chỉnh bộ gen phage φX 174.

1977 - Phillip Sharp, Richard Roberts và cộng sự phát hiện các đoạn không mang mã di truyền trong gen gọi là intron.

1990 - James Watson và cộng sự thực hiện dự án bộ gen người.

1995 - Craig Venter, Hamilton Smith lần đầu tiên giải trình tự hoàn chỉnh bộ gen vi khuẩn *Hemophilus influenzae* và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

1996 - Lần đầu tiên bộ gen của sinh vật *eukaryote* được giải trình tự hoàn chỉnh là nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*), công trình nhiều tác giả.

1997 - Fred Blattner, Takashi Honuchi và cộng sự giải trình tự hoàn chỉnh bộ gen vi khuẩn *E. coli*.

1997 - Ian Wilmut và cộng sự thành công nhân bản vô tính động vật có vú tạo nên cừu Doly.

1998 - Giải trình tự bộ gen giun tròn (*Caenorhabditis elegans*) là bộ gen động vật được giải trình tự đầu tiên, công trình nhiều tác giả.

1999 - Cấu trúc các gen trên nhiễm sắc thể 22 ở người được giải trình tự, công trình nhiều tác giả.

2000 - Bộ gen ruồi giấm (*Drosophila melanogates*) được giải trình tự đầu tiên, công trình nhiều tác giả.

2000 - Bộ gen cây mù tạt (*Arabidopsis thaliana*) là bộ gen thực vật đầu tiên được giải trình tự, công trình nhiều tác giả.

2001- Craig Venter, Francis Colin và cộng sự báo cáo kết quả giải mã bộ gen người.

2002 - Bộ gen cây lúa, bộ gen chuột nhắt được giải trình tự.

II. ACID NUCLEIC LÀ VẬT CHẤT MANG THÔNG TIN DI TRUYỀN

1. Thí nghiệm Griffith

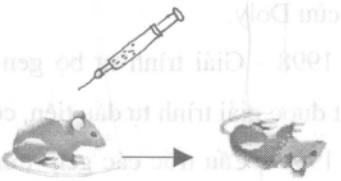
Năm 1928 Frederick Griffith tiến hành thí nghiệm với hai chủng vi khuẩn gây bệnh viêm phổi (*Staphylococcus pneumoniae*), chủng *Staphylococcus pneumoniae* tế bào có vỏ nhầy và chủng tế bào không có vỏ nhầy. Chủng tế bào có vỏ nhầy có độc tố, khi phát triển trên môi trường thạch hình thành các khuẩn lạc ướt, bóng (viết tắt là chủng S - Smooth), còn chủng tế bào không có vỏ nhầy không có độc tố, khi phát triển trên môi trường thạch tạo khuẩn lạc khô, sù sì (viết tắt là chủng R - Rough).

Tiến hành thí nghiệm: tiêm chủng R vào chuột → chuột sống; tiêm chủng S vào chuột → chuột chết, đun nóng dịch chứa tế bào chủng S tiêm vào chuột→ chuột sống; đun nóng dịch chứa tế bào chủng S trộn với dịch chứa tế bào chủng R vào chuột

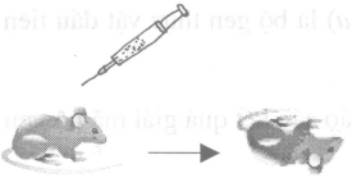
→ chuột chết, phân tích máu của chuột chết phát hiện trong máu những con chuột bị chết có cả tế bào chủng R và tế bào chủng S sống.

TN 1. Tiêm chủng R

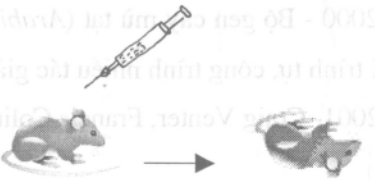
TN 2. Tiêm chủng S



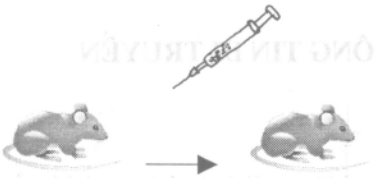
TN 3. Tiêm chủng R + chủng S đun nóng



TN 4. Tiêm chủng S đun nóng + chủng R + enzym protease



TN 5. Tiêm chủng S đun nóng + chủng R + enzym DNase



Hình 1.1. Sơ đồ thí nghiệm Griffith - Avery và cộng sự.

Kết quả thí nghiệm chứng tỏ đã có một nhân tố nào đó từ tế bào chủng S đã chết, được chuyển sang tế bào chủng R sống, làm cho các tế bào chủng R biến thành chủng S có màng nhầy, có độc tố làm chuột chết, nhân tố này được gọi là nhân tố biến nạp.

Năm 1944 Oswald Avery, Colin McLeod và Maclyn McCarty tiến hành lặp lại các thí nghiệm của Frederick Griffith, đã chứng minh nhân tố biến nạp là DNA.

Thực hiện các thí nghiệm như Griffith đã tiến hành năm 1928, đồng thời tiến hành bổ xung một số thí nghiệm sau:

- Thêm vào dung dịch chủng S đã đun nóng enzym Protease (enzym thuỷ phân protein) sau đó trộn với dịch chứa tế bào chủng R còn sống và tiêm vào chuột thí nghiệm, kết quả các chuột được tiêm bị bệnh và chết.

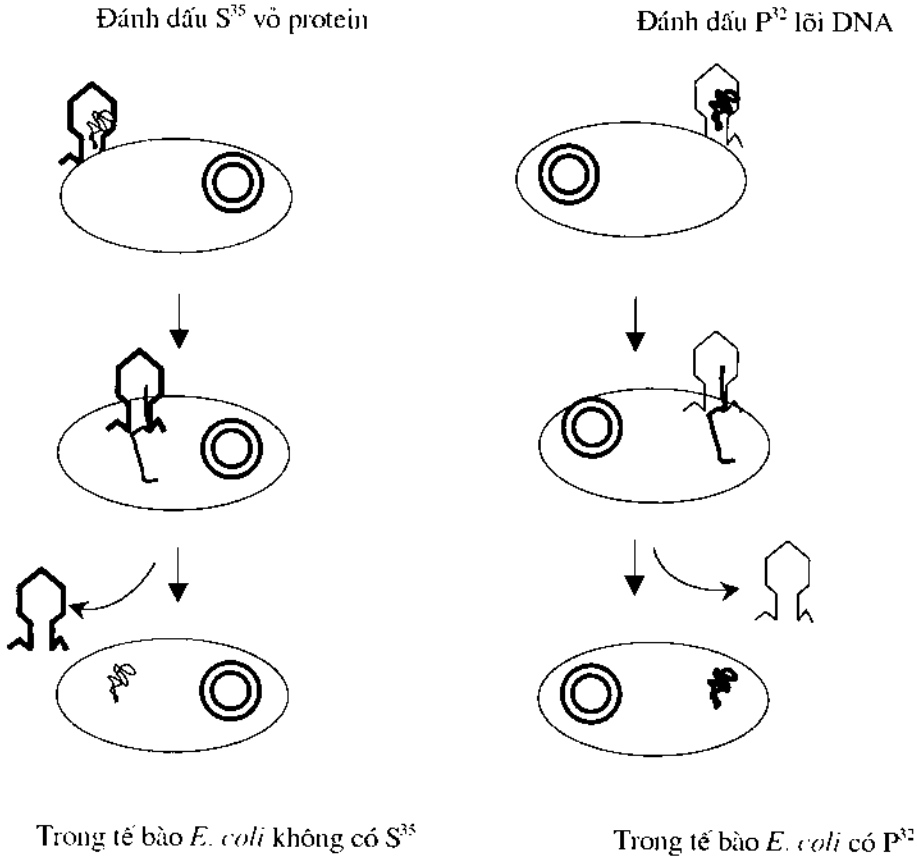
- Thêm vào dung dịch chủng S đã đun nóng enzym DNase (enzym phân huỷ DNA) sau đó trộn với dịch chứa tế bào chủng R còn sống và tiêm vào chuột, chuột vẫn sống bình thường.

Chuột được tiêm vẫn sống bình thường do enzym DNase phân huỷ DNA của tế bào vi khuẩn chủng S, biến nạp không xảy ra. Điều này chứng tỏ vật chất di truyền của vi khuẩn *Staphylococcus pneumoniae* là DNA. Biến nạp, làm cho một đoạn DNA mang gen hình thành vỏ nhầy từ tế bào dạng S đã chết, xâm nhập vào tế bào dạng R sống. Kết quả tái tổ hợp DNA của tế bào chủng S với tế bào chủng R, làm cho tế bào chủng R có gen hình thành vỏ nhầy, có vỏ nhầy và độc tố gây bệnh làm cho chuột bị chết.

Đoạn DNA của tế bào chủng S đã chết được gọi là nhân tố biến nạp. Hiện tượng biến nạp ở vi khuẩn *Staphylococcus pneumoniae* trong các thí nghiệm trên gọi là biến nạp tự nhiên. Biến nạp tự nhiên xảy ra với tần số rất thấp tuỳ thuộc đặc điểm của loài và kích thước của đoạn DNA biến nạp.

2. Thí nghiệm Hershey- Chase

Năm 1952 Alfred Hershey và Martha Chase dùng đồng vị phóng xạ S^{35} đánh dấu vỏ protein của phage T_2 kí sinh vi khuẩn *E. coli*, dùng P^{32} đánh dấu phần lõi DNA của một loại phage T_2 khác. Sau khi gây nhiễm từng loại phage T_2 đã đánh dấu đồng vị phóng xạ vào các chủng *E. coli* riêng biệt, phân tích kết quả cho thấy một chủng *E. coli* chỉ có S^{35} bên ngoài tế bào, chứng tỏ protein vỏ phage T_2 không được đưa vào trong tế bào, không tham gia vào sự sinh sản của phage T_2. Một chủng *E. coli* khác có P^{32} bên trong tế bào, điều này khẳng định DNA tham gia quá trình tái bản của phage T_2, hay DNA là vật chất di truyền của phage T_2.



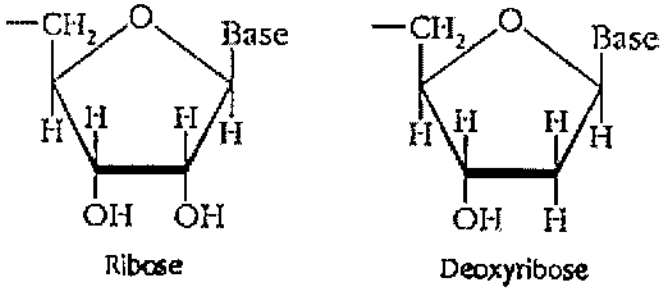
Hình 1.2. Sơ đồ thí nghiệm Hershey- Chase.

III. CẤU TRÚC CỦA ACID NUCLEIC

1. Thành phần cấu tạo

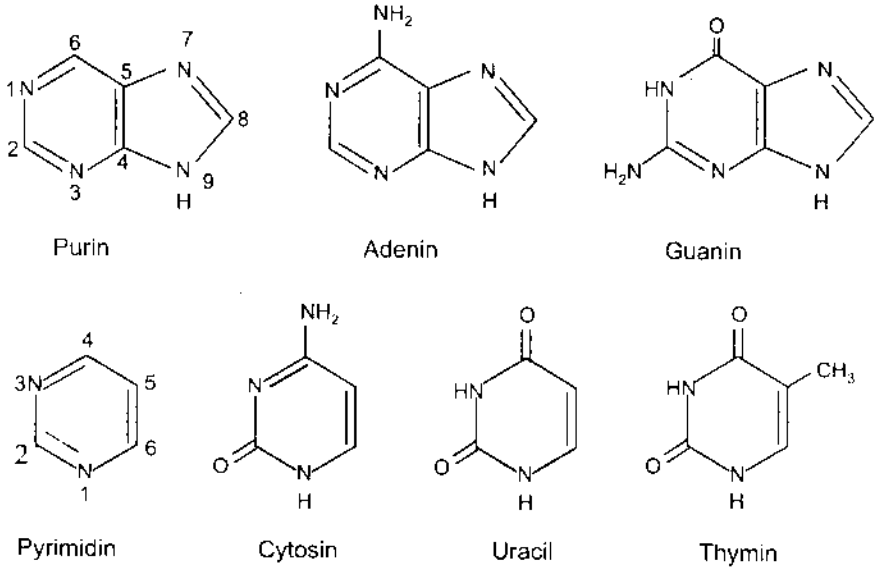
Acid nucleic gồm hai loại là deoxyribonucleic (DNA) và ribonucleic (RNA). Khi thuỷ phân hoàn toàn acid nucleic, thu được ba thành phần cấu tạo cơ bản là acid phosphoric, đường 5 carbon và bazơ nitơ. Bazơ nitơ thuộc loại hợp chất dị vòng gồm

hai nhóm: bazơ purin gồm Adenin (A) và Guanin (G); bazơ pyrimidin gồm Cytosin (C), Thymin (T) và Uracil (U).



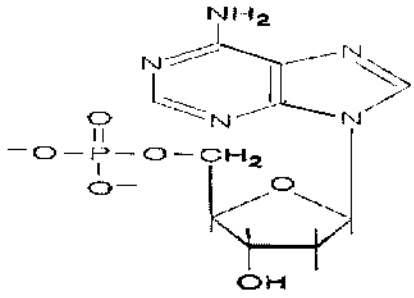
Hình 1.3. Cấu tạo của đường riboza và đường deoxyriboza.

Đơn vị cấu tạo cơ bản của phân tử DNA là các nucleotid. Mỗi nucleotid có ba thành phần chính là bazơ nitơ (gồm một trong bốn loại A, G, C, T), đường deoxyriboza ($C_5H_{10}O_4$) và acid phosphoric (H_3PO_4).



Hình 1.4. Cấu trúc các loại bazơ nitơ.

Nucleotid có bazơ nitơ loại nào, mang tên của bazơ nitơ đó. Chẳng hạn nucleotid có bazơ Adenin, gọi là deoxyadenidin triphosphat dATP, nucleotid có bazơ Guanin - deoxyguanidin triphosphat dGTP, nucleotid có Cytosin - deoxycytosin triphosphat dCTP, nucleotid có Thymin - deoxythymidin triphosphat dTTP, các nucleotid viết tắt là A, G, C, T.



Hình 1.5. Cấu tạo một nucleotid (Adenin monophosphat).

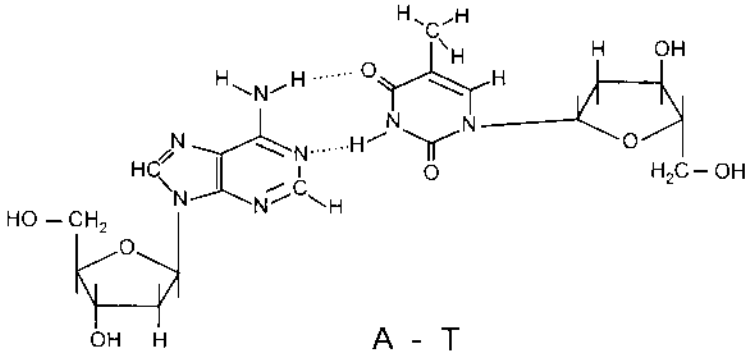
Phân tử RNA cấu tạo cơ bản từ các ribonucleotid, mỗi ribonucleotid có 3 thành phần chính là bazơ nitơ (một trong 4 loại A, G, C, U), đường riboza ($C_5H_{10}O_5$) và acid phosphoric (H_3PO_4). Ribonucleotid có bazơ nitơ loại nào, mang tên của bazơ nitơ đó. Các ribonucleotid viết tắt là rA, rG, rC, rU.

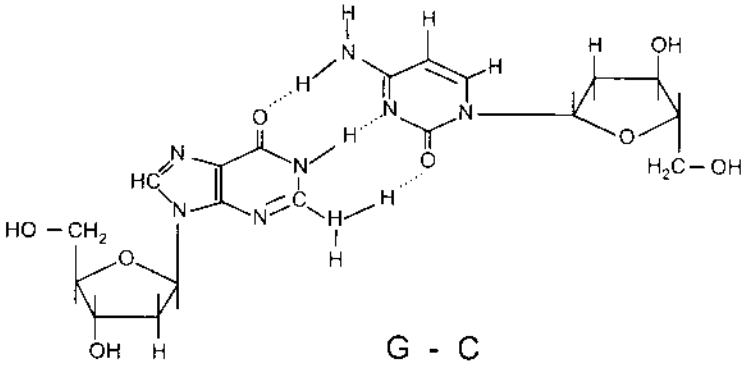
2. Acid deoxyribonucleic (DNA)

2.1. Cấu trúc DNA

Năm 1953 Watson và Crick bằng các nghiên cứu nhiễu xạ tia X, ứng dụng nguyên lí Chargaff và xử lý toán học các kết quả thu được, đã phát hiện cấu trúc điển hình của phân tử DNA (sau này gọi là dạng cấu trúc B). Phân tử DNA là một chuỗi xoắn kép gồm hai mạch đơn, mỗi mạch đơn là một chuỗi nucleotid (gồm bốn loại nucleotid A, G, C, T) sắp xếp kế tiếp nhau, liên kết với nhau bằng các liên kết photphoeste. Hai mạch đơn nối với nhau nhờ các cầu nối hydro giữa các bazơ nitơ. Các cầu nối hydro hình thành theo nguyên lí Chargaff (1950): Bazơ Adenin liên kết

với bazơ Thymin bằng 2 liên kết hydro (A = T), bazơ Guanin nối với bazơ Cytosin bằng 3 liên kết hydro (G ≡ C). Mỗi mạch đơn là một trình tự có định hướng, với đầu là 5' là gốc phosphat tự do và đầu 3' là gốc hydroxyl tự do. Chiều 5'→ 3' là chiều tái bản DNA, nghĩa là các nucleotide được lắp ghép ở mỗi mạch đơn mới theo chiều từ 5'→ 3'.





Hình 1.6. Nguyên lí Chargaff A =T, G ≡ C.

Theo Watson và Crick, phân tử DNA có cấu trúc xoắn kép. Các nucleotid sắp xếp thẳng góc với nhau và cách nhau 3,4 Å. Mỗi vòng xoắn có 10,4 cặp bazơ nitơ có

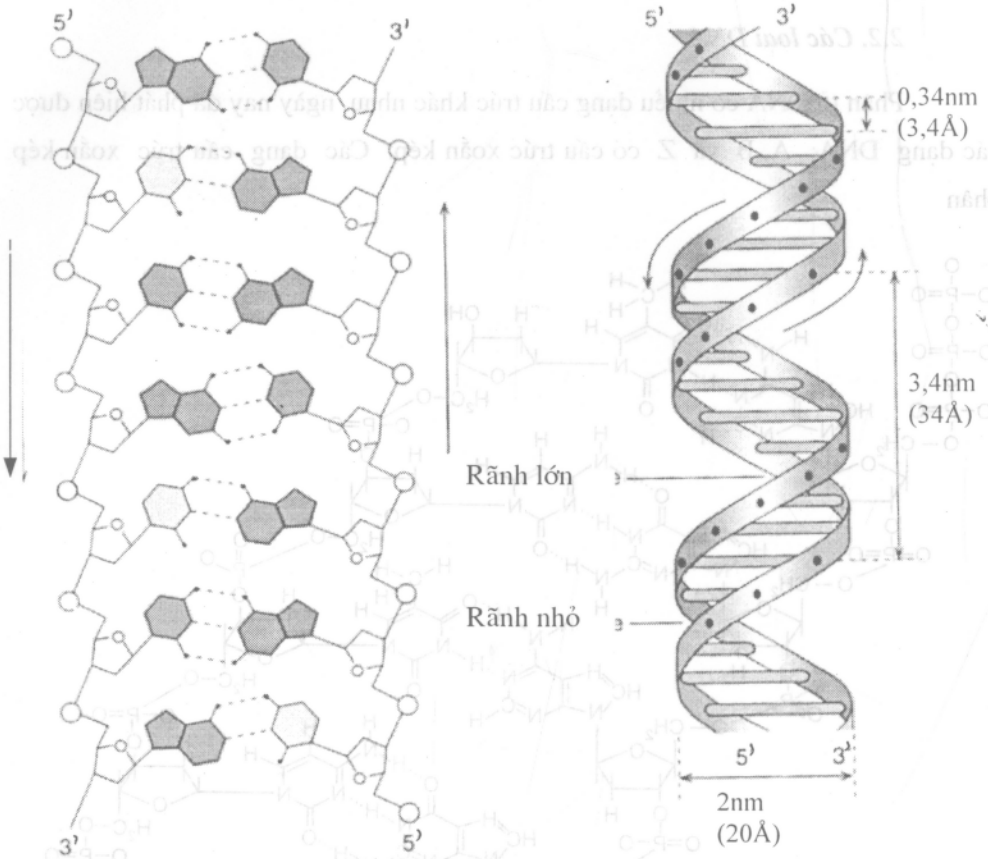
độ dài 35,4 Å (1 Å =10^{2} nm, 1mm = 10^{7} Å). Các nguyên tử đường và các nhóm phosphat xoay ra ngoài, hình thành các liên kết kỵ nước đảm bảo tính ổn định cho phân tử DNA. Đường kính trục xoắn của phân tử DNA là 20 Å.

Trong mỗi tế bào của các cơ thể, mỗi loài sinh vật chứa hàm lượng DNA đặc trưng riêng, hàm lượng DNA trong tế bào ít liên quan đến sự tiến hoá của sinh vật. Các loài sinh vật bậc cao có hàm lượng DNA trong một tế bào lớn hơn nhiều lần so với tế bào sinh vật bậc thấp. Mặt khác, DNA trong mỗi tế bào của mỗi loài sinh vật đặc trưng bởi dạng cấu trúc, mức độ lặp DNA, thành phần các loại bazơ nitơ...

Bảng 1.1. Hàm lượng DNA của một số đại diện các nhóm, loài

Tên đại diện các nhóm, loài sinh vật	Cặp bazơ (bp)	Chiều dài DNA
Virus SV40 (*Simian virus*)	5226	1,7 µm
Thực khuẩn thể φ X174 (Bacteriophageφ X174)	5386	1,8 µm
Thực khuẩn thể T_2 (Bacteriophage T_2)	2,0 x 10^{5}	50,0 µm
Thực khuẩn thể λ (Bacteriophage λ)	5,0 x 10^{4}	13,0 µm
Vi khuẩn *Hemophilus influenzae*	1,83 x 10^{6}	620 µm
Vi khuẩn *Escherichia coli*	4,65 x 10^{6}	1,6 mm
Vi khuẩn *Salmonella typhimurium*	1,1 x 10^{7}	3,8 mm
Nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*)	1,2 x 10^{7}	4,1 mm
Ruồi giấm (*Drosophile melanogates*)	1,8 x 10^{8}	6,0 cm
Ếch (*Rana pipiens*)	2,3 x10^{10}	7,7 m
Chuột nhắt (*Mus musculus*)	2,2 x 10^{9}	75 cm
Người (*Human*)	3,5 x 10^{9}	1,2 m
Ngô (*Zea mays*)	6,6 x 10^{9}	2, 2 m
Huệ tây (*lily*)	3,0 x 10^{11}	100,0 m

Phân tử DNA cấu trúc xoắn kép có số lượng bazơ A và T bằng nhau, C và G bằng nhau. Tỷ lệ A+T / G+C đặc trưng riêng cho mỗi loài sinh vật, biểu hiện mức độ tiến hoá của loài. Ví dụ, ở người tỷ lệ A+T / G+C = 1,52; cừu = 1,36; vi khuẩn *E. coli* = 0,93 và lúa mì = 1,19...



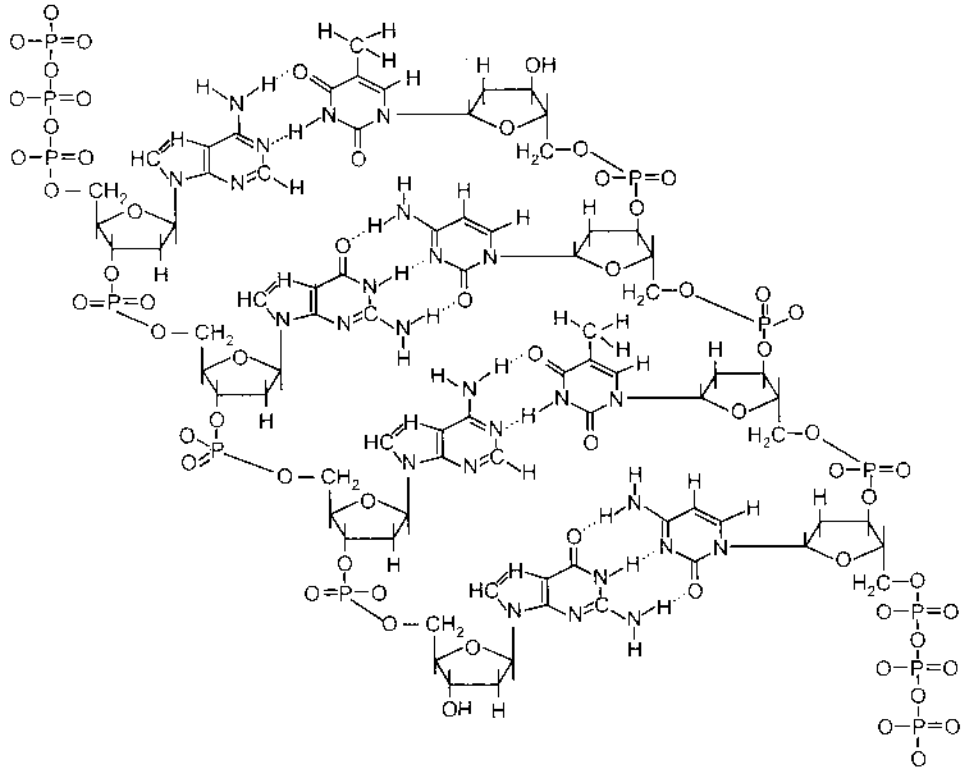
Hình 1.7. Cấu trúc phân tử DNA theo mô hình Watson — Crick.

Tỷ lệ phần trăm G + C khác nhau ở các loài sinh vật, khác nhau giữa các giống, các thứ trong cùng một loài. Phân tử DNA có tỷ lệ G, C càng cao, số lượng G, C sắp xếp liền kề nhau tạo chuỗi các nucleotid liên tục càng dài, thì nhiệt độ biến tính (Tm) của DNA càng cao, nghĩa là độ bền vững với nhiệt độ càng cao, hoặc

ngược lại. Trong điều kiện bình thường, hàm lượng G - C trong phân tử DNA tăng 1%, nhiệt độ biến tính (Tm) của phân tử DNA tăng 0,4 ^{0}C. Nhiệt độ biến tính của phân tử DNA đặc trưng riêng cho từng loài , sinh vật. Có mức độ tiến hoá càng cao thì khả năng bền nhiệt của DNA càng giảm, Tm giảm.

2.2. Các loại DNA

Phân tử DNA có nhiều dạng cấu trúc khác nhau, ngày nay đã phát hiện được các dạng DNA: A, B và Z có cấu trúc xoắn kép. Các dạng cấu trúc xoắn kép phân



Hình 1.8. Sơ đồ liên kết hydro giữa hai mạch đơn của phân tử DNA.

biệt nhau bởi chiều xoắn (xoắn phải hoặc xoắn trái), số cặp base trong mỗi vòng xoắn, khoảng cách giữa mỗi cặp base hoặc đường kính của phân tử DNA. Phân tử

DNA cấu trúc dạng B (cấu trúc điển hình theo mô hình Watson và Crick) xoắn phải, mỗi vòng xoắn có 10,4 cặp base nitơ, đường kính vòng xoắn 2,0 nm. Cấu trúc phân tử DNA dạng A xoắn phải, mỗi vòng xoắn có 11 cặp base nitơ, đường kính vòng xoắn 2,6 nm. Phân tử DNA dạng Z xoắn trái, gọi là dạng xoắn zigzag, mỗi vòng xoắn có 12 cặp bazơ nitơ, đường kính vòng xoắn 1,8 nm.. . Một số loại virus có DNA một mạch đơn.

Hàm lượng DNA trong mỗi tế bào, đặc điểm cấu trúc DNA đặc trưng riêng cho mỗi loài của sinh vật, hàm lượng DNA ít liên quan đến mức độ tiến hoá của loài. Một số loài sinh vật có hàm lượng DNA rất lớn, nhưng theo vị trí phân loại lại có mức tiến hoá thấp, như ếch nhái có hàm lượng DNA trong tế bào lớn hơn so tế bào người.

Điểm khác biệt DNA của sinh vật *prokaryote* với sinh vật *eukaryote* là toàn bộ DNA của *prokaryote* mang thông tin mã hoá protein, chỉ một phần DNA của sinh vật *eukaryote* mã hoá protein. Sinh vật *eukaryote* có phần DNA mang thông tin di truyền mã hoá protein chiếm 7%- 30% khác nhau tuỳ từng loài, gọi là các exon, trình tự DNA không mang thông tin di truyền gọi là intron.

3. Acid ribonucleic (RNA)

Phân tử RNA có cấu trúc một mạch đơn, gồm bốn loại ribonucleotid (rA, rG, rC và rU) sắp xếp kế tiếp nhau, liên kết với nhau bằng các liên kết phosphodieste.

Có ba loại RNA: RNA thông tin - mRNA (messenger RNA), RNA vận chuyển - tRNA (transfer RNA) và RNA riboxom (ribosonal RNA- rRNA).

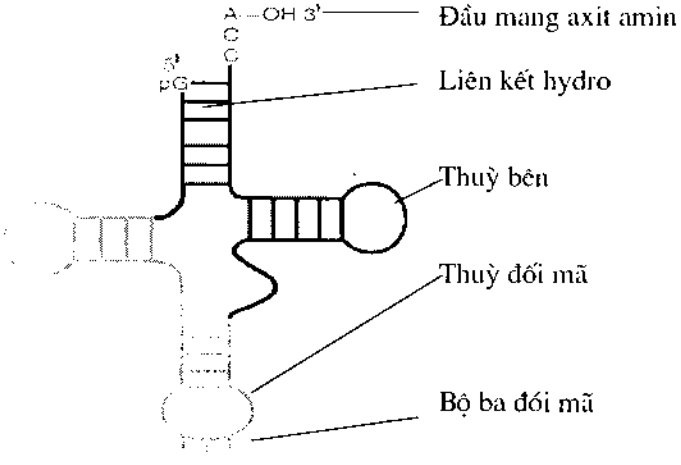
3.1. Cấu trúc RNA thông tin (mRNA)

Phân tử RNA thông tin (mRNA) có cấu trúc một mạch đơn, là bản sao trình tự cấu trúc của gen, chiếm 2-5% tổng lượng RNA. Đầu 5' tận cùng của mRNA có một phân tử 7- metylguanidin triphosphat (m^7G), kết thúc bằng chuỗi polyA. Kích thước sợi polyribonucleotid chứa 900-1200 ribonucleotid, khối lượng trung bình từ 3.10^5 đến 4.10^6 Dalton, hệ số lắng 6S - 25S (S - đơn vị đo độ lắng Svedberg). Các phân tử mRNA được tổng hợp từ các gen trong nhân tế bào, một số ít mRNA được tổng hợp từ các gen trong ty thể hoặc lạp thể.

3.2. Cấu trúc RNA vận chuyển (tRNA)

Hàm lượng RNA vận chuyển (tRNA) trong tế bào chiếm khoảng 10-15% lượng RNA của tế bào. Phân tử tRNA là một mạch polyribonucleotid ngắn, chứa khoảng 75 - 90 ribonucleotid, khối lượng phân tử 23000 -30000 Dalton, hệ số lắng 4S.

Cấu trúc tRNA gồm 1 mạch polyribonucleotid cuộn xoắn dạng hình lá chè ba có một vài đoạn xoắn kép, ở những đoạn xoắn kép các ribonucleotid sắp xếp theo qui luật Chargaff tạo thành 3 - 4 nhánh. Nhánh tiếp nhận acid amin tận cùng bằng đầu 3', kết thúc bằng nhóm CCA. Nhánh đối mã mang bộ 3 đối mã phù hợp với bộ ba mã trên mRNA trong quá trình dịch mã. Ngoài ra có thể có một hoặc 2 nhánh phụ tuỳ theo loại tRNA, các nhánh phụ có thể có chức năng ổn định cấu trúc tRNA. Các phân tử tRNA thực hiện chức năng vận chuyển các acid amin tham gia tổng hợp protein. Mỗi loại tRNA vận chuyển một loại acid amin, có khoảng 20 loại tRNA khác nhau vận chuyển các loại axit amin trong quá trình dịch mã.



Hình 1.9. Sơ đồ cấu trúc tRNA.

3.3. Cấu trúc RNA riboxom (rRNA)

RNA riboxom (rRNA) chiếm khoảng 80% tổng lượng RNA trong tế bào. Cấu trúc dạng mạch đơn polyribonucleotid, có nhiều khúc cuộn, chứa khoảng 100 - 1500 nucleotid , các rRNA kết hợp với protein tạo thành các riboxom. Riboxom có cấu tạo gồm tiểu phần nhỏ và tiểu phần lớn, cấu tạo từ protein và nhiều rRNA. Trong quá trình dịch mã hai tiểu phần của riboxom kết hợp với nhau thành riboxom, khi kết thúc dịch mã các tiểu phần tách rời nhau và tồn tại riêng rẽ. Trong các tế bào sinh vật *eukaryote* có các riboxom có hệ số lắng 80S, phân tử lượng khoảng 4,2.10. Tiểu phần nhỏ 40S được cấu tạo từ 1 phân tử rRNA 18S và 35 phân tử protein, tiểu phần lớn 60S cấu tạo từ 50 phân tử protein và 3 phân tử rRNA: 28S, 5S và 5,8S. Tế bào sinh vật *prokaryote* có các riboxom 70S gồm tiểu phần lớn 50S cấu tạo từ 31 phân tử protein, 2 phân tử rRNA 23S và 5S; Tiểu phần nhỏ 30S cấu tạo từ phân tử rRNA 16S và 21 phân tử protein.

Trong tế bào của sinh vật *eukaryote* có một số RNA nhỏ, kích thước khoảng 90-300 nucleotide gọi là small RNA, các phân tử small RNA không tham gia tổng hợp protein, chủ yếu tham gia các cấu tạo các nhân tố cắt nối gọi là phức hợp spliceosom. Spliceosom có vai trò quan trọng trong quá trình cắt nối các exon và intron trong quá trình hoàn thiện các mRNA sau phiên mã trong nhân tế bào. Một số tế bào có loại RNA đặc hiệu có chức năng giống các enzym, tham gia các phản ứng xúc tác và tự cắt nối (self-splicing) các phân tử RNA gọi là ribozym. Ribozym là những phân tử RNA nhỏ khoảng 40 đến 50 ribonucleotid có trình tự đặc hiệu, cắt các phân tử RNA khác ở những vị trí nhất định, thường cắt tại C khi gặp các trình tự GUG trên phân tử RNA. (Ribozym được phát hiện năm 1983 do Thomas Cech, Đại học Colorado và Sid Alman, Đại học Yale, ribozym được thương mại hoá từ 1989).

IV. TÍNH CHẤT BIẾN TÍNH VÀ HỒI TÍNH CỦA DNA

Phân tử DNA bị biến tính (denaturation) khi nhiệt độ tăng, hoặc tác động của các tác nhân hoá học (dung dịch kiềm, urea...). Nhiệt độ làm cho hai mạch đơn của

DNA tách nhau ra, gọi là nhiệt độ biến tính Tm (melting temperature). Tm phụ thuộc vào số lượng cặp G - C và vị trí sắp xếp của các nucleotid trong phân tử DNA. Phân tử DNA số lượng cặp G - C cao, có Tm cao và ngược lại. Trong phân tử DNA các cặp G - C hoặc A-T xếp liền nhau càng dài, nhiệt độ biến tính (Tm) càng cao. Hàm lượng G - C trong phân tử DNA giảm 1%, nhiệt độ biến tính Tm giảm 0,4 °C. Trong điều kiện thích hợp, Tm của DNA của sinh vật bậc cao khoảng 85 - 95 °C.

Tm được tính theo công thức Wallace (1989)

$Tm = 2\,^0C \times (A + T) + 4\,^0C \times (G + C)$ với các đoạn DNA ngắn < 25 bp.

Các phân tử DNA > 25 bp Tm được tính theo công thức Meinkoth- Wahl (1989): $Tm = 81{,}5\,^0C + 16{,}6\,(\log Na^+) + 0{,}41\,(\%\,G+C) - (500/n) - 0{,}61\%FA$

(FA- Formaldehyt)

DNA có khả năng hồi tính (renaturation). Khi nhiệt độ giảm dần đến một mức nhất định, hai mạch đơn đã tách rời nhau liên kết lại với nhau theo nguyên lý Chargaff tạo nên chuỗi xoắn kép. Nếu nhiệt độ hạ đột ngột, sự hồi tính không xảy ra, phân tử DNA ở dạng cuộn vô định hình, hoặc rối loạn cấu trúc do các mạch đơn bị đứt ở một điểm nào đó. Một số tác nhân hoá học gây biến tính vĩnh viễn phân tử DNA, bị biến tính do một số loại hoá chất phân tử DNA không có khả năng hồi tính trở lại cấu trúc xoắn kép ban đầu.

Đặc điểm biến tính và hồi tính của DNA được ứng dụng tổng hợp nhân tạo DNA, nhân gen và trong công nghệ DNA tái tổ hợp. Phân tử DNA không bị biến tính (dạng xoắn kép) hấp phụ ánh sáng ít hơn DNA biến tính (dạng mạch đơn), nên có thể sử dụng quang phổ kế (UV- spectrophotometer) để theo dõi quá trình biến tính và hồi tính của DNA. Dựa vào chỉ số hấp phụ quang phổ tử ngoại, có thể xác định hàm lượng DNA tổng số.

V. XU HƯỚNG TIẾN HOÁ PHÂN TỬ CỦA VẬT CHẤT DI TRUYỀN

Nhiều nghiên cứu về xu hướng tiến hoá của DNA cho thấy tiến hoá phân tử DNA biểu hiện ở năm đặc điểm:

- Tăng hàm lượng DNA trong tế bào: từ vi khuẩn đến động vật có vú hàm lượng DNA trong 1 tế bào tăng 10^3 lần. Hàm lượng DNA trong 1 tế bào tăng có thể do tăng các trình tự DNA lặp lại, phần lớn các đoạn DNA lặp lại liên quan với chức năng điều khiển ở mức trên tế bào ở các sinh vật có mức tiến hoá cao. Hàm lượng DNA giữ chức năng này có thể chiếm tới 90-95% hàm lượng DNA trong bộ gen (Ashmarin 1977). Bộ gen của sinh vật bậc cao có những phần DNA không mã hoá protein, không mang chức năng điều khiển, chức năng chưa rõ như phần DNA xung quanh tâm động.

- Tăng tỷ lệ A+T/ G+C: ở sinh vật đơn giản tỷ lệ này có giá trị nhỏ, sinh vật càng tiến hoá giá trị của tỷ lệ này càng lớn. Ví dụ, vi khuẩn gram âm 0,48 - 0,82, ở vi khuẩn gram dương 0,72 đến 0,92; ở thực vật bậc cao 1,23 đến 1,86 (Kalinin 1976). Như vậy, hướng tiến hoá của sự biến đổi DNA là chuyển dần từ dạng giàu G - C sang dạng DNA giàu A - T. Tỷ lệ A- T ngày càng tăng trong quá trình tiến hoá của DNA do các đoạn DNA lặp lại rất giàu A — T, các DNA vệ tinh (DNA satellite) có hàm lượng A- T rất cao. Nhiều nghiên cứu cho rằng DNA giàu A - T dễ biến tính, dễ dàng liên kết trong các nucleosom, tăng khả năng đóng gói của DNA trong tế bào.

- Giảm tính bền nhiệt của DNA: các sinh vật bậc cao DNA có tính bền nhiệt kém hơn so với sinh vật bậc thấp. Ví dụ, DNA của vi khuẩn *E. coli* có nhiệt độ biến tính Tm = 88 ^{0}C, DNA của tế bào gan bò Tm = 84 ^{0}C. Tính bền nhiệt giảm liên quan tới tỷ lệ G - C trong phân tử DNA giảm, hoặc do sự phân bố xen kẽ giữa các loại nucleotid. Trong phân tử DNA khi thành phần G - C giảm 2,5 % nhiệt độ biến tính (Tm) giảm 1 ^{0}C.

- Tăng độ dài của các nucleotid loại A và T sắp xếp kế tiếp nhau. Chỉ số β biểu thị độ tập hợp của các nucleotid T và A trong phân tử DNA tăng rõ rệt trong quá trình tiến hoá. Chẳng hạn ở động vật không xương β = 4,39; bò sát β = 5,38; động vật có vú β = 6,07.

- Tăng dần tỷ lệ protein histon trong cấu trúc DNA: ở sinh vật *prokaryote* trong cấu trúc DNA không có histon, sinh vật eukaryote có DNA kết hợp với histon tạo thành các nhiễm sắc thể làm tăng mức độ đóng xoắn của DNA, tăng hàm lượng

DNA trong tế bào. Nhóm sinh vật trung gian giữa *prokaryote* và *eukaryote* như động vật nguyên sinh, tảo lục, nấm thành phần histon tham gia cấu tạo nucleosome chưa đầy đủ.

VI. VẬT CHẤT DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ NHÓM SINH VẬT

1. Vật chất di truyền của virus

Virus là dạng sống đơn giản chưa có cấu tạo tế bào, virus sống kí sinh vi khuẩn gọi là thực khuẩn thể (bacteriophage) viết tắt là phage. Virus và phage có cấu tạo cơ bản gồm hai phần, phần vỏ ngoài cấu tạo từ các protein, phần lõi có cấu tạo từ các acid nucleic. Đa số virus có phần lõi là DNA hai mạch xoắn kép như phage T_4, phage λ, virus cúm , virus sởi, virus đậu , SV 40... Một số virus có DNA một sợi như phage φ X174, M_{13}...

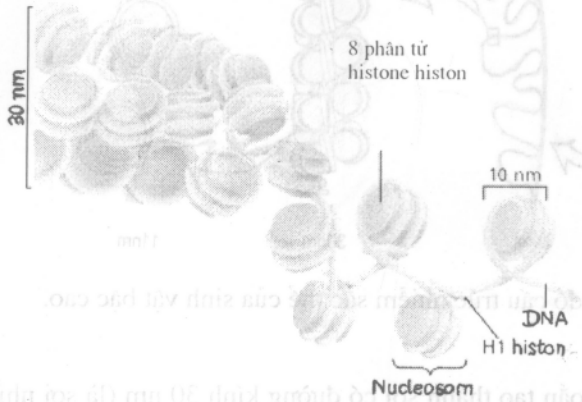
Nhiều virus có phần lõi RNA, như virus đốm thuốc lá (MTV), virus HIV, virus MS_2, các *Paramyxovirus*... Virus MS_2 dạng hình cầu vỏ protein, lõi RNA chứa ba gen mã hoá ba loại protein: protein A là protein gây dính bám và làm tan vi khuẩn, protein mũ - tạo vỏ virus, protein tái bản - tạo enzym tái bản của virus.

2. Vật chất di truyền của sinh vật *prokaryote*

Nhóm sinh vật *prokaryote* bao gồm vi khuẩn, nấm bậc thấp và một số tảo đơn bào. Tế bào cấu tạo đơn giản, chưa có màng nhân phân biệt nhân với tế bào chất, chất nhân tập trung ở gần giữa tế bào gọi là vùng nhân (nhân sơ). Vật chất di truyền ở *prokaryote* gồm DNA nhân, DNA của plasmid và DNA của các bào quan như ty thể, lạp thể...

DNA của nhân có cấu trúc hai mạch xoắn kép. Trong tế bào vi khuẩn có các plasmid, plasmid là DNA kép dạng vòng kín, kích thước từ 1kb - hàng trăm kb (1kb = 1000 cặp base). Plasmid phát triển độc lập với nhiễm sắc thể của vi khuẩn, có khả năng tự tái bản không phụ thuộc vào sự tái bản của DNA của nhân. Plasmid chứa các gen kháng chất kháng sinh, và một số gen đặc trưng cho từng loại vi khuẩn. Một số vi khuẩn có các plasmid dính liền với nhiễm sắc thể của vi khuẩn gọi là episom.

Trong lạp thể của vi khuẩn tự dưỡng có một lượng nhỏ DNA. Phân tử DNA hai mạch xoắn kép, mang một số gen đặc trưng riêng cho mỗi loài vi khuẩn.



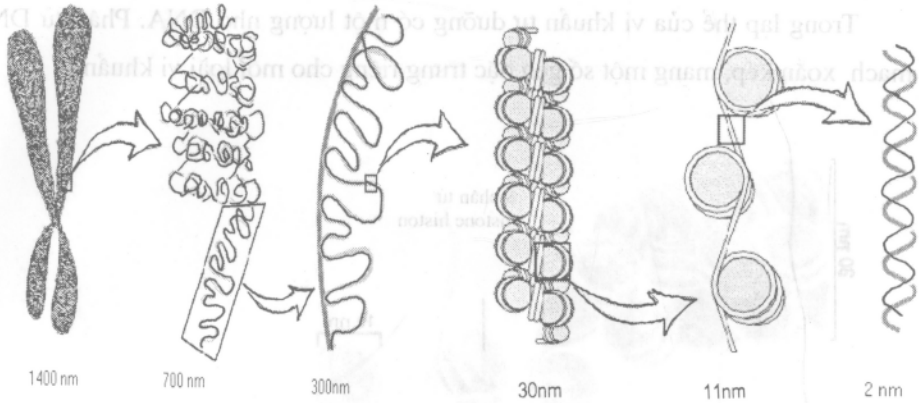
Hình 1.10. Cấu trúc nucleosom và sợi nhiễm sắc.

3. Vật chất di truyền của sinh vật *eukaryote*

Tế bào của sinh vật nhân chuẩn (*eukaryote*) có màng nhân ngăn cách nhân với tế bào chất. Trong nhân tế bào phân tử DNA kết hợp với các protein kiềm (histon) tạo thành các sợi nhiễm sắc.

Trong tế bào *eukaryote* vật chất di truyền nằm chủ yếu trong nhân tế bào (gọi là hệ gen nhân). Ngoài ra có một phần nhỏ DNA nằm trong các bào quan như ty thể, lạp thể, plasmid và các cơ quan tử khác (gọi là hệ gen ngoài nhân).

Phân tử DNA cuốn quanh 8 phân tử histon tạo thành hạt nucleosom, đường kính khoảng 11nm (110 Å). Tham gia cấu tạo mỗi nucleosom có bốn loại histon gồm 2 phân tử H_2A, 2 phân tử H_2B, 2 phân tử H_3, 2 phân tử H_4. Giữa các nucleosom nối với nhau nhờ 1 phân tử histon H_1 và một đoạn DNA dài khoảng 15 - 100 cặp nucleotid tạo thành chuỗi polynucleosom, gọi là sợi cơ bản có đường kính 11 nm.



Hình 1.11. Sơ đồ cấu trúc nhiễm sắc thể của sinh vật bậc cao.

Sợi cơ bản cuộn xoắn tạo thành sợi có đường kính 30 nm (là sợi nhiễm sắc), sợi nhiễm sắc cuộn xoắn kiểu zigzag tạo thành các cấu trúc tiền chromatid có đường kính 300 nm, cấu trúc tiền chromatid tiếp tục xoắn thành các chromatid đường kính 700 nm. ở kỳ giữa của chu kỳ phân bào, mỗi nhiễm sắc thể gồm 2 chromatid có đường kính khoảng 1400 nm - 1500 nm.

Chương 2

CẤU TRÚC, HOẠT ĐỘNG VÀ BIỂU HIỆN GEN

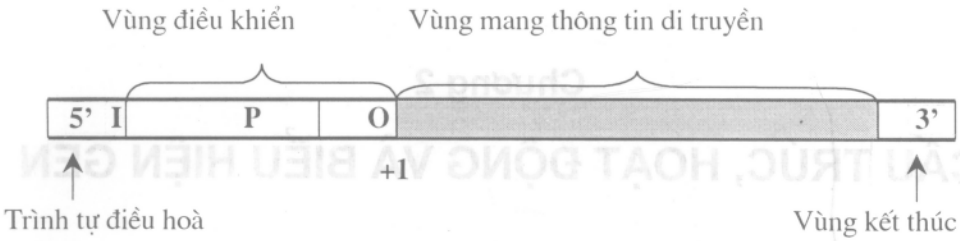
I. CẤU TRÚC GEN

Gen là một đoạn phân tử DNA, RNA, mang thông tin di truyền xác định cấu trúc của một chuỗi polypeptid hoặc một phân tử RNA nhất định. Một gen cấu trúc điển hình gồm ba vùng chính: vùng điều khiển, vùng mang mã di truyền và vùng kết thúc. Vùng điều khiển có một số trình tự đặc hiệu điều khiển hoạt động gen. Vùng mang mã chứa các thông tin di truyền, được phiên mã sang RNA thông tin (mRNA), gen cấu trúc có thể được dịch mã tạo các sản phẩm là protein. Vùng kết thúc mang các trình tự phân biệt giữa các gen, và các trình tự kết thúc quá trình phiên mã. Cấu trúc gen còn bao gồm một số cấu trúc đặc thù nằm ở phía trước, phía sau hoặc trong gen như các trình tự điều hoà, vùng tăng cường (enhance), vùng bất hoạt (silencer), vùng đệm (spacer)...

1. Vùng điều khiển của gen

Vùng điều khiển nằm ở đầu 5' của gen thường gồm promoter (P), operator (O), và một vài trình tự nucleotid đặc hiệu. Promoter là trình tự nhận biết và gắn của enzym RNA polymerase trong quá trình phiên mã (promoter còn gọi là trình tự khởi động). Operator (O) còn gọi là trình tự chỉ huy, là trình tự mã hoá các phân tử protein hoặc enzym kiểm soát hoạt động của gen cấu trúc, xúc tác hoạt động phiên mã hoặc không phiên mã của gen cấu trúc. Trình tự điều hoà là trình tự nucleotid mã hoá các protein hay enzym hoạt hoá hoặc ức chế hoạt động của gen.

Qui ước vị trí nucleotid đầu tiên được phiên mã sang mRNA là +1, các nucleotid vùng mang thông tin di truyền mang dấu dương (+), các nucleotid vùng điều khiển mang dấu âm (-).



Hình 2.1. Sơ đồ cấu trúc các vùng gen.

Promoter (P) gồm các trình tự đặc hiệu cho các enzym RNA polymerase nhận biết, cho phép khởi đầu đúng của sự phiên mã tổng hợp RNA thông tin (mRNA). Promoter của *prokaryote* thường có một đoạn lặp khoảng 4 - 6 cặp T - A, gọi là hộp TA - TA (TA - TA box), sau TA - TA box khoảng 5 - 7 cặp bazơ nitơ là điểm bắt đầu phiên mã tổng hợp mRNA (vị trí +1). Ví dụ, cấu trúc promoter của virus SV 40 (simian virus) gây khối u ở động vật có vú:

+1

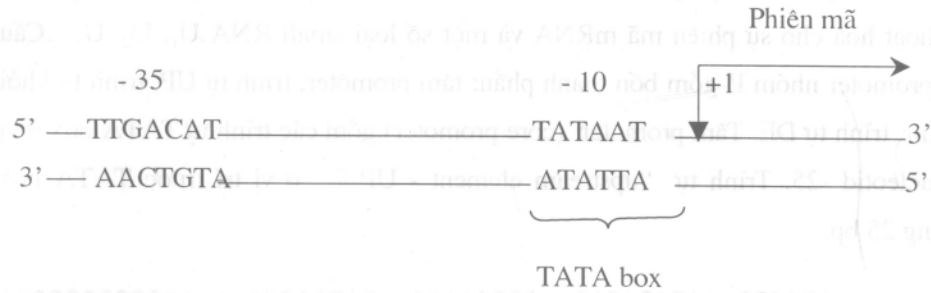
TTATTGCAGCTATATATATAGGTTAC AAATAAGCAA

↑ |----6 nu----| ↑

TA - TA box

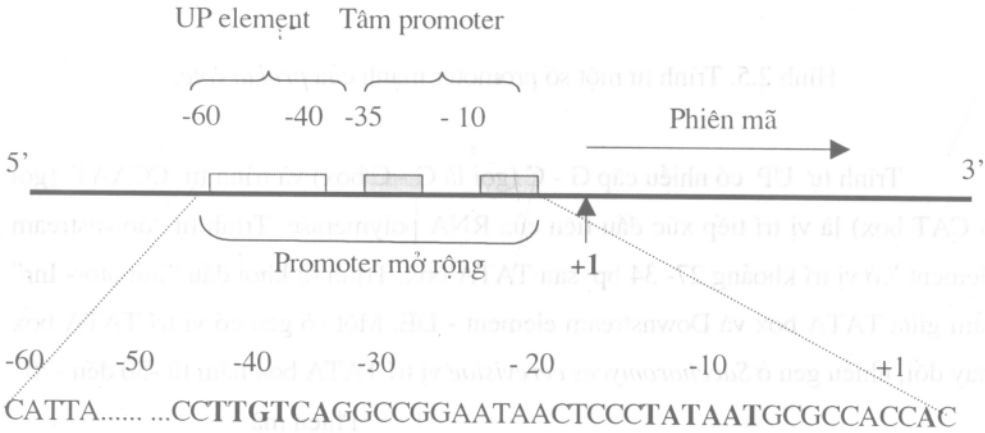
Hình 2.2. Cấu trúc promoter của virus SV 40.

Vị trí promoter, operator và trình tự điều hoà của các gen cấu trúc ở *prokaryote* và *eukaryote* nằm ở những vị trí khác nhau của gen. Promoter của *prokaryote* nằm ở khoảng nucleotid - 35 đến - 10 gọi là tâm promoter (core promoter). Vi khuẩn *E. coli* tâm promoter đặc trưng bằng trình tự TATAAT ở vị trí -10, trình tự TTGACAT nằm ở vị trí -35.



Hình 2.3. Sơ đồ cấu trúc promoter của vi khuẩn *E. coli*.

Các gen có promoter mạnh thường có một đoạn trình tự đặc hiệu ở phía trên trình tự -35 về phía đầu 5' gọi là "upstream element - UP", đoạn trình tự đặc hiệu này giúp cho các enzym RNA polymerase nhận dạng và hoạt động có hiệu quả. Tâm promoter và trình tự UP được gọi là promoter mở rộng.



Hình 2.4. Sơ đồ cấu trúc promoter rrnB P_1 của vi khuẩn *E. coli*.

Eukaryote có nhóm promoter tương ứng với ba loại enzym RNA polymerase I, II và III. Promoter nhóm I là vị trí bám cho enzym RNA polymerase I, promoter nhóm II là vị trí bám cho enzym RNA polymerase II và promoter nhóm III là vị trí

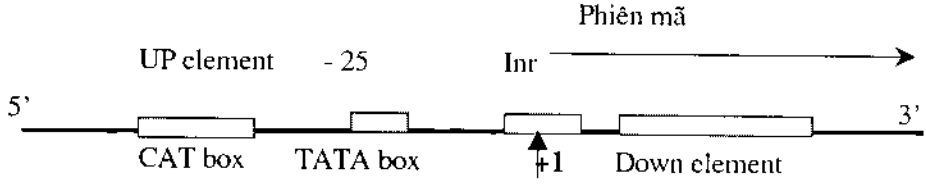
bám cho enzym RNA polymerase III. Promoter nhóm II bao gồm promoter của các gen hoạt hoá cho sự phiên mã mRNA và một số loại small RNA.U_1, U_2, U_3 ...Cấu trúc promoter nhóm II gồm bốn thành phần: tâm promoter, trình tự UP, trình tự khởi đầu Inr, trình tự DE. Tâm promoter (core promoter) gồm các trình tự TATA box ở vị trí nucleotid -25. Trình tự "upstream element - UP" ở vị trí trước TATA box khoảng 25 bp.

```
rrn A2   AAATGCTTGACTCTGTAG··CGGGAAGGCGTATTATGC·ACACCCCGCGCCGC
λ PR     TGCGTGTTGACTATTTTA·CCTCTGGCGGTGATAATGG··TTGCATGTACTAA
λ PL     GCGGTGTTGACATAAATA·CCACTGGCGGTGATACTGA··GCACATCAGCAGG
T7 A3    AAACGGTTGACAACATGA·AGTAAACACGGTACGATGT·ACCACATGAAACGA
T7 A1    AGAGTATTGACTTAAAGT·CTAACCTATAGGATACTTA·CAGCCATCGAGAGG
T7 A2    CAGGTATTGACAACATGAAGTAACATGCAGTAAGATAC·AAATCGCTAGGTAA
fd VIII  TCTCCGTTGTACTTTGTT··TCGCGCTTGGTATAATCG·CTGGGGGTCAAAGA
                35                          10          +1 ---------→
```

Gen TATA box

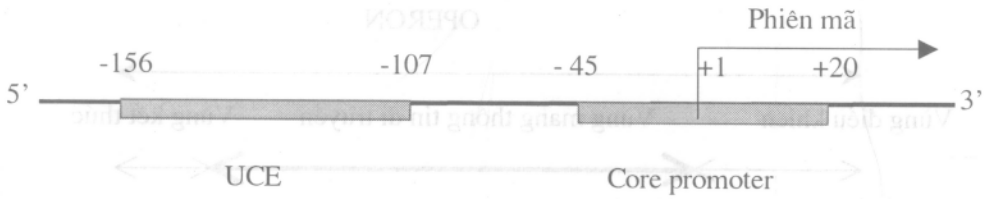
Hình 2.5. Trình tự một số promoter mạnh của *prokaryote*.

Trình tự UP có nhiều cặp G - C (gọi là G - C box) và trình tự CCAAT (gọi là CAT box) là vị trí tiếp xúc đầu tiên của RNA polymerase. Trình tự "downstream element" ở vị trí khoảng 27- 34 bp sau TATA box. Trình tự khởi đầu "initiator- Inr" nằm giữa TATA box và Downstream element - DE. Một số gen có vị trí TATA box thay đổi, nhiều gen ở *Saccharomyces cerevisiae* vị trí TATA box nằm từ -50 đến -70.



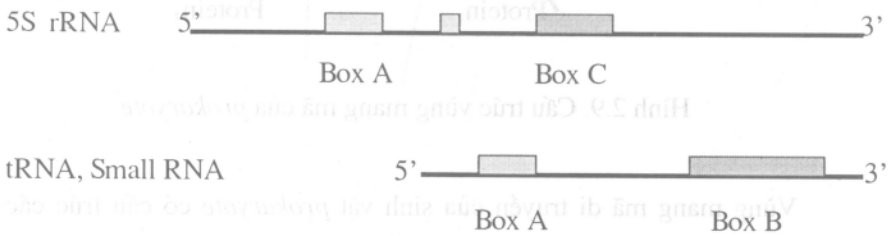
Hình 2.6. Sơ đồ cấu tạo promoter nhóm II của *eukaryote*.

Promoter nhóm I là promoter của các gen hoạt hoá cho sự phiên mã rRNA 18S, 28S và 5,8S. Theo Robert Tjian và cộng sự promoter nhóm I gồm promoter của các gen hoạt hoá cho sự phiên mã mRNA có 2 trình tự đặc trưng: tâm promoter (core promoter) nằm ở vị trí -40 đến +20 và trình tự kiểm tra trên "upstream control element - UCE "nằm ở vị trí -156 đến- 107.



Hình 2.7. Sơ đồ cấu tạo promoter nhóm I của eukaryote.

Promoter nhóm III là promoter của các gen hoạt hoá cho sự phiên mã các tRNA, rRNA 5S và một số ít small RNA như U_5, U_6...Promoter nhóm III có hai trình tự đặc trưng là Box A và Box C (hoặc Box B), trình tự đặc trưng của các promoter nhóm III đang được tiếp tục nghiên cứu.

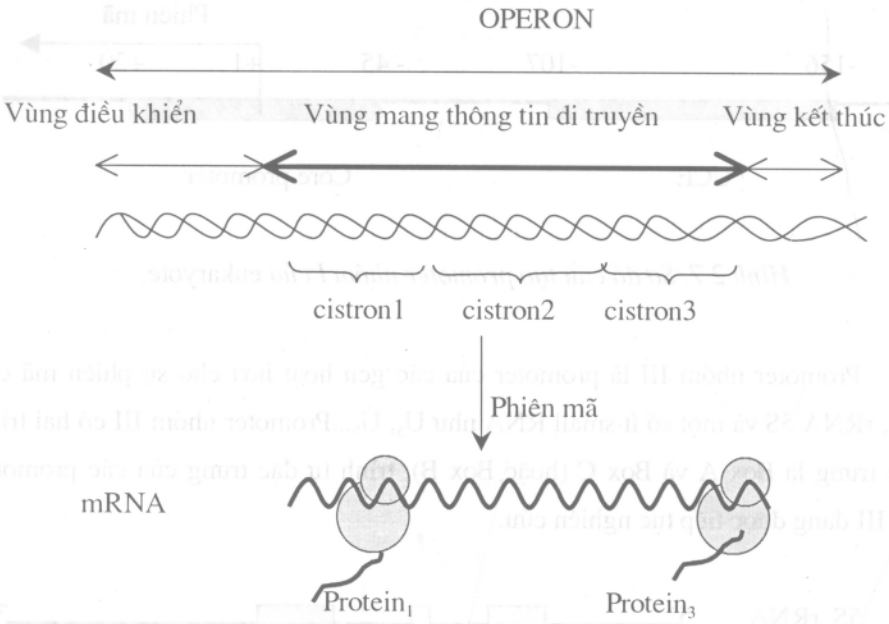


Hình 2.8. Sơ đồ cấu tạo promoter nhóm III của *eukaryote*.

2. Vùng mang mã di truyền

Toàn bộ vùng mang mã của sinh vật *prokaryote* đều mang thông tin di truyền (coding sequence). Vùng mang mã di truyền gồm nhiều cistron, mỗi cistron mã hoá

một chuỗi polypeptid, các cistron sắp xếp thành từng nhóm, chung một vùng điều khiển tạo thành một operon. Các cistron trong operon có quan hệ chặt chẽ với nhau, cùng chung kiểu trao đổi chất giúp cho vi khuẩn thích ứng nhanh với điều kiện môi trường thay đổi. Operon Lac của vi khuẩn *E. coli* gồm ba gen, operon Tryptophan gồm năm gen ...



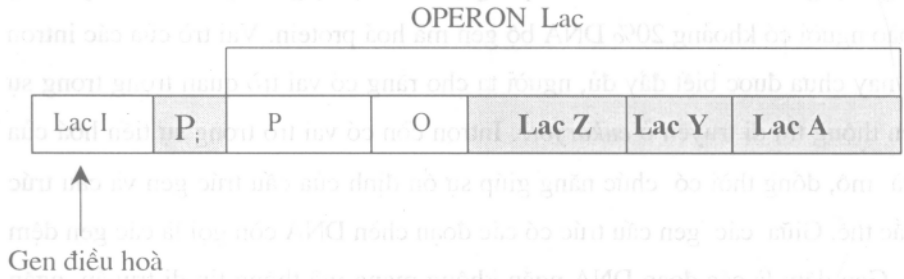
Hình 2.9. Cấu trúc vùng mang mã của *prokaryote*

Vùng mang mã di truyền của sinh vật *prokaryote* có cấu trúc các operon. Trong operon, một vùng điều khiển hoạt hoá và khởi động phiên mã cho tất cả các gen cấu trúc (cistron), tạo một phân tử mRNA chung cho các cistron. Tuỳ giai đoạn sinh trưởng của tế bào, có một số cistron được dịch mã hoặc tất cả các cistron đều được dịch mã tổng hợp nên các chuỗi polypeptid.

Vùng mang mã di truyền của sinh vật *eukaryote* có cấu trúc phức tạp, gồm các gen cấu trúc riêng. Mỗi gen cấu trúc mang thông tin di truyền mã hoá một chuỗi

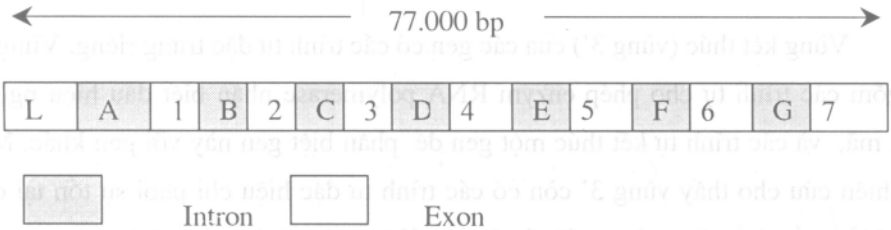
polypeptid. Giữa các gen cấu trúc có các đoạn DNA không mang mã, các đoạn DNA dị nhiễm sắc, các gen đệm. Phần lớn gen cấu trúc bao gồm các exon xen kẽ với các intron. Exon là những đoạn mang mã di truyền được dịch mã (coding sequences), intron là các đoạn không mang mã di truyền (no coding sequences).

Các đoạn DNA không mang thông tin di truyền (intron) của sinh vật *eukaryote* được Philip Sharp, Richard Roberts và cộng sự phát hiện năm 1977. Gen cấu trúc của sinh vật *eukaryote* gồm exon và intron xen kẽ nhau, gọi là gen phân đoạn (split gene) hay gen khảm (mosaic gene).



Hình 2.10. Sơ đồ operon Lac của vi khuẩn *E. coli*.

Các exon và intron đều được phiên mã tạo thành phân tử tiền mRNA (pre mRNA), phân tử tiền mRNA phải qua một quá trình cắt nối (processing) loại bỏ các intron trở thành mRNA trưởng thành trong nhân tế bào, sau đó chui qua màng nhân ra tế bào chất, tham gia quá trình dịch mã dịch mã tổng hợp protein.



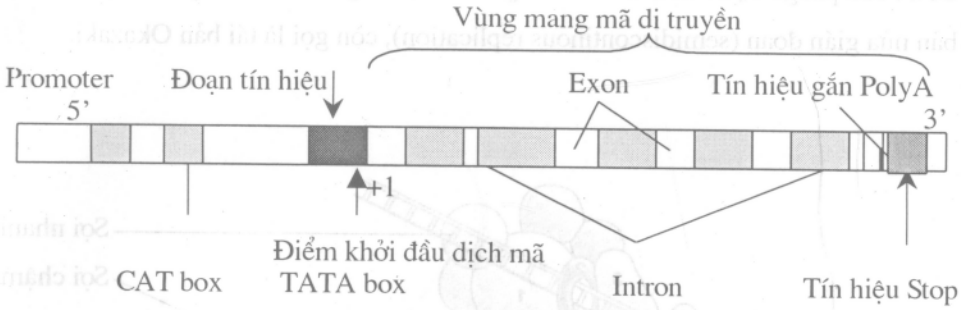
Hình 2. 11. Sơ đồ cấu trúc gen ovalbumin lòng trắng trứng gà.

Khi nghiên cứu cấu trúc gen mã hoá ovalbumin trong lòng trắng trứng gà, các nhà khoa học thuộc Đại học Tổng hợp Strasbourg Pháp (1977) đã phát hiện gen ovalbumin chứa DNA không đồng nhất như các gen của *prokaryote*. Gen ovalbumin ở dạng thể khảm gen, gồm 77. 000 cặp base (bp), có 8 exon (**L, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**) xen kẽ 7 intron (**A, B, C, D, E, F, G**). Kích thước các intron có thể từ vài chục cặp bazơ nitơ đến hàng nghìn cặp bazơ nitơ, khác nhau tuỳ từng gen, tuỳ loài sinh vật. Ví dụ, tổng chiều dài các intron của gen ovalbumin ở gà chiếm 75% chiều dài gen. Ở *eukaryote* phần DNA không mang mã chiếm khối lượng rất lớn, có thể chiếm 60 % - 70% tổng lượng DNA của tế bào. Kết quả giải trình tự bộ gen người cho thấy trong mỗi tế bào người có khoảng 20% DNA bộ gen mã hoá protein. Vai trò của các intron cho đến nay chưa được biết đầy đủ, người ta cho rằng có vai trò quan trọng trong sự biểu hiện thông tin di truyền ở *eukaryote*. Intron còn có vai trò trong sự tiến hoá của tế bào và mô, đồng thời có chức năng giúp sự ổn định của cấu trúc gen và cấu trúc nhiễm sắc thể. Giữa các gen cấu trúc có các đoạn chèn DNA còn gọi là các gen đệm (spacer). Gen đệm là các đoạn DNA ngắn không mang mã thông tin di truyền, ngăn cách giữa các gen. Khác với *prokaryote*, các gen cấu trúc ở *eukaryote* không được phiên mã cùng một lúc. Tuỳ theo giai đoạn phát triển, yêu cầu và hoạt động của tế bào, một hoặc một số gen được phiên mã tổng hợp mRNA.

Một số ít gen cấu trúc của *eukaryote* không có sự xen kẽ exon và intron, chỉ gồm các exon giống như ở *prokaryote*. Ví dụ, gen mã hoá protein zein ở ngô (một protein dự trữ trong hạt ngô), gen gây sốc nhiệt ở ruồi giấm...

3. Vùng kết thúc của gen (terminator)

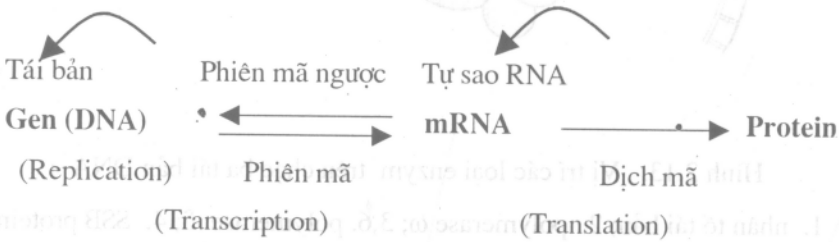
Vùng kết thúc (vùng 3') của các gen có các trình tự đặc trưng riêng. Vùng 3' bao gồm các trình tự cho phép enzym RNA polymerase nhận biết dấu hiệu ngừng phiên mã, và các trình tự kết thúc một gen để phân biệt gen này với gen khác. Một số nghiên cứu cho thấy vùng 3' còn có các trình tự đặc hiệu chi phối sự tồn tại của gen, nhiễm sắc thể, cũng như sự lão hoá của tế bào, các trình tự kết thúc đến nay còn hiểu biết chưa đầy đủ.



Hình 2.12. Sơ đồ cấu trúc tổng quát một gen của *eukaryote*.

II. TÁI BẢN GEN (REPLICATION DNA)

Hoạt động của gen được trình bày theo sơ đồ sau:

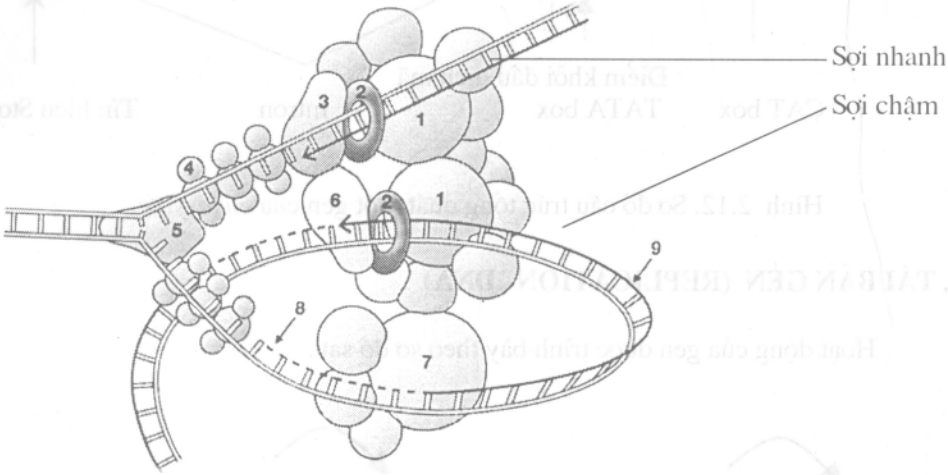


Tái bản gen có ý nghĩa quan trọng đảm bảo tính đặc trưng ổn định của mỗi loài và sự truyền đạt thông tin di truyền qua các thế hệ. Tái bản gen và các quá trình phiên mã và dịch mã là cơ chế duy trì tính ổn định, đặc trưng riêng của mỗi loài. Tuỳ theo đặc điểm cấu trúc đặc trưng bộ gen của sinh vật, mỗi nhóm sinh vật điển hình có những kiểu tái bản gen khác nhau.

1. Tái bản DNA kiểu Okazaki

Năm 1969 R. Okazaki khi nghiên cứu tái bản DNA của thực khuẩn thể T_4 (DNA của phage T_4 có hai mạch xoắn kép). Okazaki dùng H^3- thymidine đánh dấu

DNA của phage T_4 kí sinh *E. coli* đang tái bản, là người đầu tiên phát hiện cơ chế tái bản nửa gián đoạn (semidiscontinous replication), còn gọi là tái bản Okazaki.



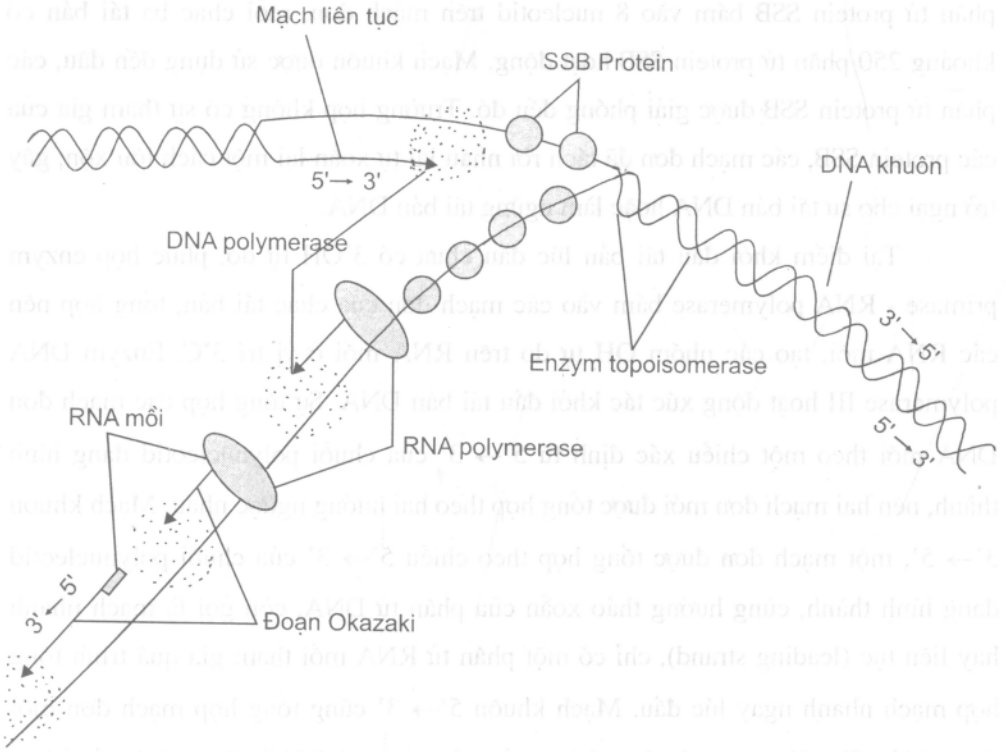
Hình 2.13. Vị trí các loại enzym trên chạc ba tái bản DNA :

1. nhân tố tái bản; 2. polymerase ω; 3,6. polymerase δ; 4. SSB protein;

5. helicase; 7. primase; 8. RNA mồi;9. đoạn Okazaki.

Phân tử DNA của phage T_4 tái bản theo hai chiều ngược nhau. Trên các mạch đơn đang tổng hợp, nhờ xúc tác của các enzym các nucleotid được kéo dài (gắn) theo chiều 5'→ 3'. Một mạch đơn được tổng hợp liên tục gọi là mạch liên tục, mạch nhanh hay mạch chủ (leading strand). Một mạch đơn được tổng hợp từng đoạn nhỏ khoảng 1000 - 2000 nucleotid, gọi là đoạn Okazaki, các đoạn DNA nhỏ, được enzym DNA ligase nối lại tạo thành mạch đơn hoàn chỉnh, gọi là mạch gián đoạn hay mạch chậm (lagging strand). Các mạch đơn được tổng hợp đến đâu, cùng với mạch khuôn xoắn lại với nhau tạo nên một phân tử DNA xoắn kép mới. Kết thúc tái bản có hai phân tử DNA hoàn toàn giống nhau, giống phân tử DNA ban đầu, mỗi phân tử DNA

mới có một mạch khuôn và một mạch mới tổng hợp. Quá trình tái bản DNA cần có các nhóm -OH tự do của 3' C ở đầu 5', giúp cho sự kéo dài chuỗi polynucleotid theo chiều 5'→ 3' tạo nên mạch đơn mới. Lúc đầu, phân tử DNA khuôn không có các nhóm 3' OH tự do. Sự có mặt của các phân tử RNA mồi tạo nên các nhóm 3' OH tự do giúp cho khởi đầu tái bản DNA được thực hiện. RNA mồi là các đoạn RNA ngắn khoảng 10 bazơ nitơ, được tổng hợp nhờ enzyme RNA polymerase.



Hình 2.14. Sơ đồ chạc 3 tái bản DNA theo Okazaki.

Khởi đầu tái bản DNA, enzym mở xoắn topoisomerase gắn vào phân tử DNA mạch kép, cắt đứt một trong hai mạch làm cho phân tử DNA ở trạng thái siêu xoắn hoặc xoắn cấp hai được giãn xoắn. Tốc độ giãn xoắn khoảng 100 vòng/phút. Enzym helicase xúc tác cắt các liên kết hydro giữa các bazơ, nhờ năng lượng từ thuỷ phân

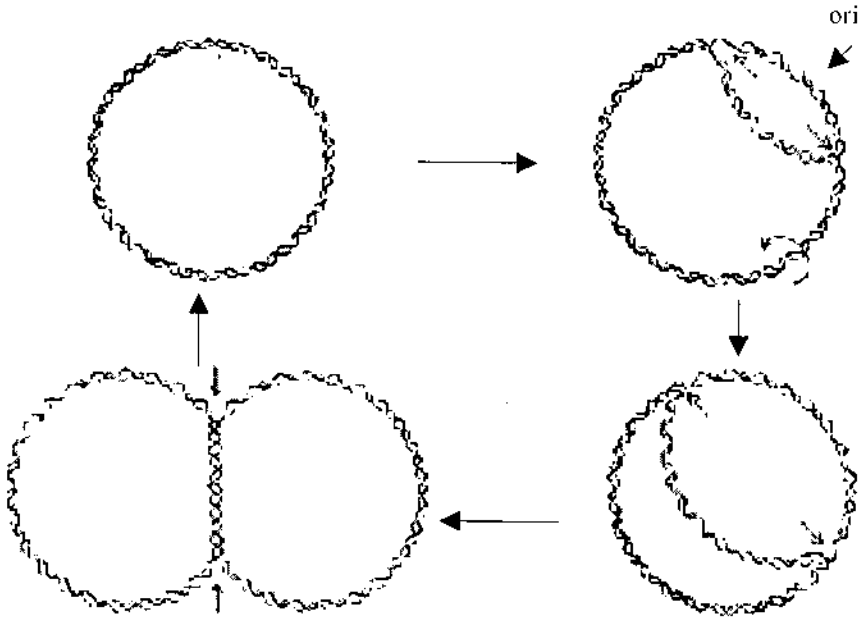
ATP, GTP.... Các cầu nối hydro bị đứt, tạo nên chạc ba hình chữ Y, gọi là chạc tái bản (replication fork). Có nhiều loại enzym helicase hoạt động cùng một lúc, một số phân tử enzym helicase gắn trên mạch 3'→ 5' (protein Rep), một số khác gắn trên mạch 5'→ 3' (helicase II và III).

Hai mạch đơn của phân tử DNA đã tách rời nhau, không tự xoắn trở lại nhờ có sự tham gia của protein SSB (Single Strand Binding protein). Các phân tử protein SSB bám vào sợi đơn của DNA, làm cho trạng thái mở xoắn được bền vững. Mỗi phân tử protein SSB bám vào 8 nucleotid trên mạch đơn, mỗi chạc ba tái bản có khoảng 250 phân tử protein SSB hoạt động. Mạch khuôn được sử dụng đến đâu, các phân tử protein SSB được giải phóng đến đó. Trường hợp không có sự tham gia của các protein SSB, các mạch đơn đã tách rời nhau lại tự xoắn lại một cách lộn xộn, gây trở ngại cho sự tái bản DNA hoặc làm ngừng tái bản DNA.

Tại điểm khởi đầu tái bản lúc đầu chưa có 3'OH tự do, phức hợp enzym primase - RNA polymerase bám vào các mạch đơn của chạc tái bản, tổng hợp nên các RNA mồi, tạo các nhóm OH tự do trên RNA mồi ở vị trí 3'C. Enzym DNA polymerase III hoạt động xúc tác khởi đầu tái bản DNA. Sự tổng hợp các mạch đơn DNA mới theo một chiều xác định từ 5'→ 3' của chuỗi polynucleotid đang hình thành, nên hai mạch đơn mới được tổng hợp theo hai hướng ngược nhau. Mạch khuôn 3'→ 5', một mạch đơn được tổng hợp theo chiều 5'→ 3' của chuỗi polynucleotid đang hình thành, cùng hướng tháo xoắn của phân tử DNA, còn gọi là mạch nhanh hay liên tục (leading strand), chỉ có một phân tử RNA mồi tham gia quá trình tổng hợp mạch nhanh ngay lúc đầu. Mạch khuôn 5'→ 3' cũng tổng hợp mạch đơn mới theo chiều 5'→3', ngược hướng tháo xoắn của phân tử DNA. Quá trình tổng hợp mạch đơn DNA này có nhiều phân tử RNA mồi tham gia, các RNA mồi gắn trên từng đoạn ngắn của sợi khuôn, tạo các nhóm 3'OH tự do giúp cho tái bản DNA được thực hiện. Giữa các RNA mồi, các đoạn mạch đơn DNA ngắn khoảng 1000 - 2000 nucleotid được tổng hợp gọi là đoạn Okazaki. Sau đó enzym RNase phân huỷ RNA mồi tạo nên các "lỗ hổng". Enzym DNA polymerase I xúc tác tổng hợp các nucleotid lấp đầy các "lỗ hổng", enzym DNA ligase nối các đoạn lại tạo nên mạch đơn DNA

hoàn chỉnh, mạch đơn mới tạo thành gọi là mạch gián đoạn hay còn gọi là mạch chậm (lagging strand). Mỗi mạch đơn mới được tổng hợp cùng với mạch khuôn xoắn lại tạo nên phân tử DNA xoắn kép mới. Kết quả một phân tử DNA sau tái bản nên hai phân tử DNA mới, giống nhau và giống DNA khuôn, bảo đảm thông tin di truyền được truyền đạt qua các thế hệ một cách chính xác.

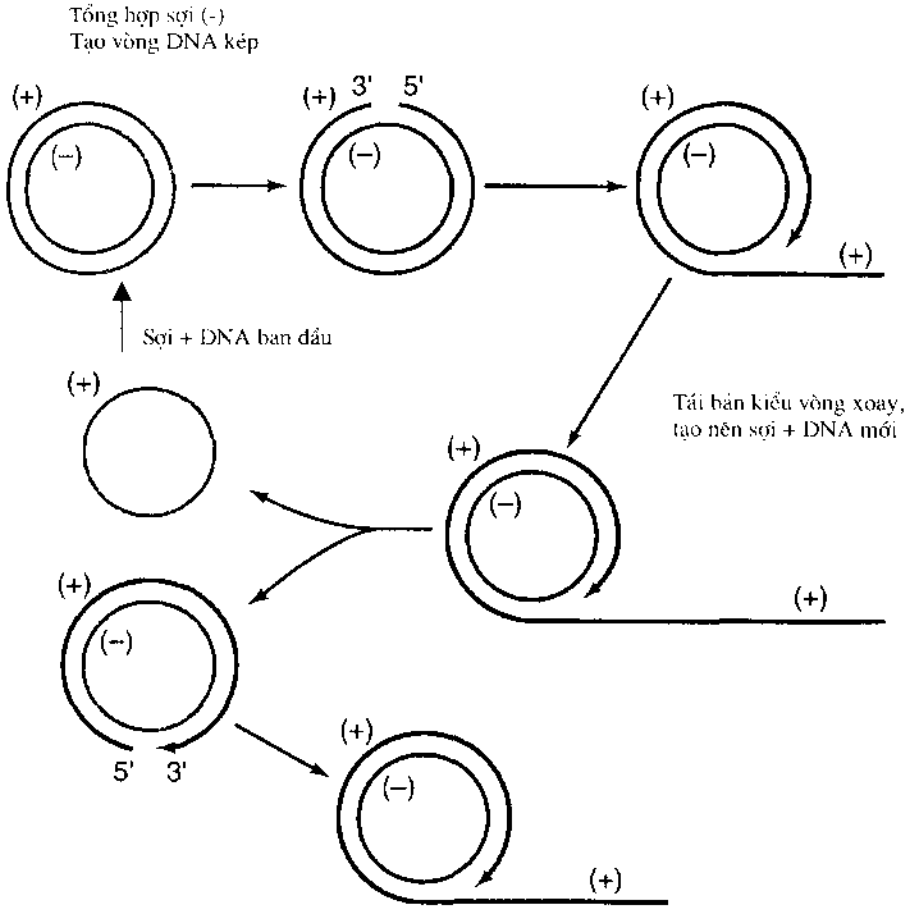
Quá trình tổng hợp các mạch đơn mới theo nguyên lý Chargaff A- T, G - C. Trong quá trình tái bản DNA, enzym DNA polymerase III có tỷ lệ sai sót khi gắn các nucleotid không theo nguyên lý Chargaff khoảng 10^{-4}. Các phân tử DNA mới được tổng hợp có tỷ lệ sai sót trên các mạch chỉ là 10^{-8} đến 10^{-9}. Sai khác này do enzym DNA polymerase có khả năng tự sửa chữa sai sót. Nhờ hoạt tính exonuclease, các enzym DNA polymerase III trượt qua mạch DNA đang tổng hợp, tự nhận biết các sai sót của các base bắt cặp sai nguyên lý Chargaff trong quá trình tái bản DNA, loại bỏ những nucleotid bị gắn sai và thay thế bằng các nucleotid phù hợp.



Hình 2.15. Tái bản DNA dạng "mắt" ở vi khuẩn.

2. Tái bản DNA kiểu vòng xoay

Các nghiên cứu tái bản DNA ở vi khuẩn *E. coli* và một số nhóm vi khuẩn khác, cho thấy plasmid và DNA nhân có kiểu tái bản vòng xoay hay dạng " mắt tái bản". Tại điểm **ori** (origin- điểm khởi đầu tái bản) phân tử DNA được cắt tại một điểm trên mạch khuôn tạo nên vòng DNA xoắn, quá trình tái bản DNA thực hiện theo cả 2 bên vòng xoắn tạo nên các "mắt" gọi là tái bản DNA kiểu vòng xoay hay tái bản DNA dạng " mắt ".

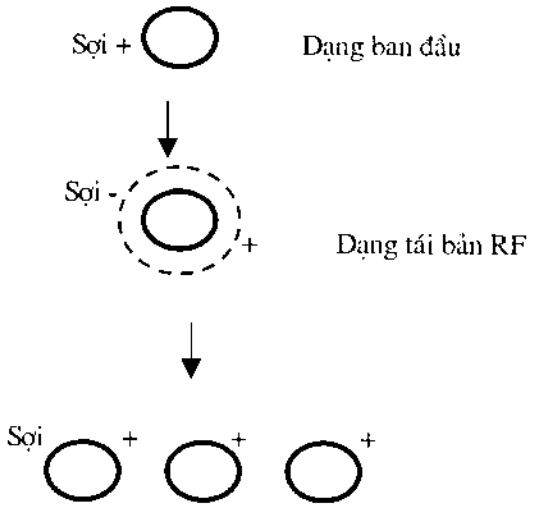


Hình 2.16. Sơ đồ cơ chế tái bản DNA dạng vòng xoay ở vi khuẩn.

Tái bản DNA kiểu vòng xoay thường gặp phage λ và các plasmid có DNA mạch kép ở dạng vòng kín. Đầu tiên, một vết cắt trên một mạch đơn DNA, đầu 5' của sợi mới được cắt được kéo về một phía, những đoạn vừa kéo khỏi vòng DNA được tái bản theo nguyên lí Chargaff.

3. Tái bản DNA sợi đơn và tái bản RNA ở virus

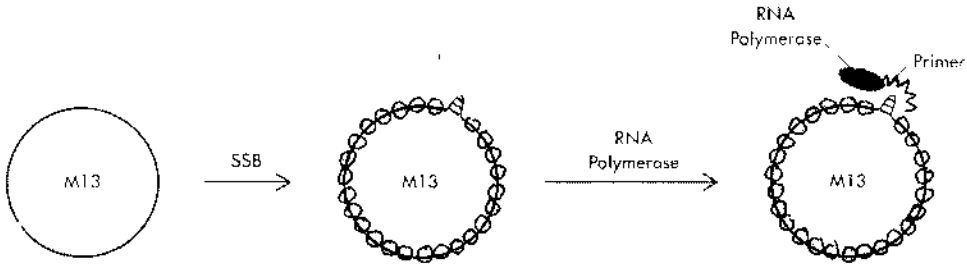
Một số bacteriophage như φ X 174, phage M_{13} ... có DNA mạch đơn dạng vòng. Khi xâm nhiễm tế bào vi khuẩn, DNA sợi đơn của phage được đưa vào tế bào chủ. Trong tế bào chủ sợi đơn DNA của phage nối thành vòng gọi là sợi dương (+),sau đó sợi dương (+) được dùng làm khuôn để tổng hợp sợi bổ sung theo nguyên lý Chargaff gọi là sợi âm (-).



Hình 2.17. Sơ đồ tái bản của phage DNA sợi đơn.

Vòng DNA mạch kép của phage gọi là dạng tái bản RF (Replicating Form). Sợi âm của dạng tái bản (RF) làm khuôn để tổng hợp nên các sợi đơn DNA mạch thẳng, có trình tự nucleotid giống như bộ gen phage. Các sợi DNA mới được tổng

hợp nối thành vòng, lắp ghép với vỏ protein của phage tạo thành các phage mới. Nhiều loại virus có vật chất di truyền là RNA, quá trình tái bản RNA của virus được thực hiện nhờ enzym phiên mã ngược của virus (reverse transcriptase). Khi xâm nhiễm tế bào chủ, RNA của virus được đưa vào tế bào. Các gen của virus sử dụng các bộ máy của tế bào tổng hợp một số enzym của virus, đặc biệt là enzym phiên mã ngược. Enzym phiên mã ngược của virus xúc tác tổng hợp một mạch đơn DNA bổ sung (cDNA — Complement DNA), mạch đơn cDNA có thể được sử dụng làm khuôn để tổng hợp RNA của virus, hoặc tiếp tục tổng hợp sợi bổ sung thứ 2 tạo thành cDNA mạch kép gắn vào hệ gen của tế bào vật chủ.



Hình 2.18. Tái bản gen của phage M_{13}.

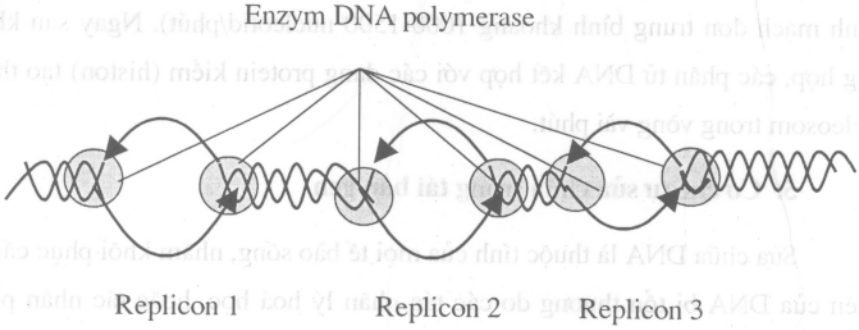
4. Tái bản gen ở *eukaryote*

Tái bản gen ở *eukaryote* có sự tham gia của nhiều loại enzym polymerase, nhiều nhân tố tái bản RF (Replication Factor) và các nhân tố hoạt hoá... Cơ chế tái bản DNA ở sinh vật nhân chuẩn rất phức tạp.

Tái bản DNA của các gen khác nhau, các loại tế bào khác nhau...khác biệt với nhau về tốc độ tái bản, thời gian khởi đầu tái bản, cũng như tuỳ thuộc giai đoạn phát triển của tế bào, vai trò và đặc điểm của các gen, cũng như điều kiện sinh lí sinh hoá của tế bào.

Sinh vật nhân chuẩn có bộ gen kích thước lớn, tái bản DNA thực hiện đồng thời tại rất nhiều điểm, tạo nên nhiều đơn vị tái bản khác nhau. Mỗi đơn vị tái bản

(replication unit) gọi là replicon. Tế bào nấm men có hàng trăm điểm khởi đầu tái bản, tế bào người có khoảng 20.000 - 30.000 điểm khởi đầu tái bản (20.000-30.000 replicon). Ngược lại, bộ gen vi khuẩn có một điểm khởi đầu tái bản tạo nên một replicon.



Hình 2.19. Sơ đồ tái bản gen (DNA) ở *eukaryote*.

Tốc độ tái bản DNA của tế bào *eukaryote* tương đối giống nhau, ở 37° C tốc độ tái bản khoảng 1.000 - 1.500 nucleotid trong 1 phút. Một phân tử DNA đang tái bản có nhiều chạc tái bản dạng vòng dọc theo chiều dài phân tử DNA. Trung bình mỗi nhiễm sắc thể của *eukaryote* có khoảng 20 - 80 replicon. Các đơn vị tái bản hoạt động không đồng thời, trên cùng một nhiễm sắc thể các vùng khác nhau được tái bản ở những thời điểm khác nhau, theo một trật tự nhất định. Các vùng mang gen cấu trúc được tái bản sớm nhất, các vùng dị nhiễm sắc, vùng gần tâm động hoặc gần hai đầu nhiễm sắc thể được tái bản muộn hơn. Các gen cấu trúc hoạt động ở tất cả các tế bào và các loại mô, được tái bản trước so với các gen chỉ hoạt động trong một số tế bào, hoặc mô đặc biệt.

Tái bản DNA của *eukaryote* theo cơ chế bán bảo thủ với sự tham gia của nhiều loại nhân tố tái bản. Đầu tiên enzym topoisomerase và nhân tố tái bản A (RF - A Replication Factor - A) xúc tác được tháo xoắn phân tử DNA. Các phân tử DNA được tháo xoắn với tốc độ khoảng 100 vòng / 1 phút. Enzym helicase cắt các liên kết

hydro tạo nên các nút tái bản dạng vòng. Phức hợp enzym DNA polymerase α - primase xúc tác tổng hợp các đoạn RNA mồi. Phân tử DNA đang tái bản có một mạch đơn được tổng hợp liên tục, một mạch đơn tổng hợp gián đoạn giống như ở *prokaryote*. Tái bản DNA theo cơ chế Okazaki, mỗi đoạn Okazaki khoảng 1000 - 2000 nucleotid. Thời gian tổng hợp mỗi đoạn hết khoảng 4 giây (nếu tính tốc độ hoàn chỉnh mạch đơn trung bình khoảng 1000-1500 nucleotid/phút). Ngay sau khi được tổng hợp, các phân tử DNA kết hợp với các dạng protein kiềm (histon) tạo thành các nucleosom trong vòng vài phút.

5. Cơ chế tự sửa chữa trong tái bản gen

Sửa chữa DNA là thuộc tính của mọi tế bào sống, nhằm khôi phục cấu trúc tự nhiên của DNA bị tổn thương do các tác nhân lý hoá học, hoặc tác nhân phóng xạ phát sinh trong quá trình tái bản của DNA. Sai sót tự nhiên xảy ra khi tái bản DNA khoảng 10^{-5}, khi kết thúc tái bản sai sót còn khoảng 10^{-9} (10^{9} nucleotid được sử dụng để tái bản thì có 1 nucleotid bị ghép sai nguyên lý Chargaff). Trong quá trình tái bản DNA các nucleotid gắn không đúng nguyên tắc bổ sung A = T, G ≡ C, đều được cắt bỏ nhờ enzym DNA polymerase I, và được thay thế bằng nucleotid thích hợp. Cơ chế sửa sai trong quá trình tái bản DNA được phát hiện ở *prokaryote*, hiểu biết về chế sửa sai trong tái bản DNA ở *eukaryote* còn nhiều hạn chế.

Sau khi tái bản DNA sự sửa chữa các sai sót theo cơ chế sửa chữa trực tiếp và sửa chữa gián tiếp. Sửa chữa trực tiếp bằng quang phục hoạt (photo reparation). Tác động của tia tử ngoại (UV) làm cho các thymin (T) nằm kề nhau xích lại gần nhau, liên kết với nhau làm méo mó chuỗi xoắn kép, hình thành các dime thymin. Dưới tác động của các photon ánh sáng kích hoạt enzym photolyase, sau đó một enzym kiểu endonuclease cắt bỏ một đoạn mạch đơn khoảng 10 -12 nucleotid, tạo nên một lỗ hổng tại vị trí dime thymin. Enzym DNA polymerase I xúc tác tổng hợp các nucleotid lấp lỗ hổng. Enzym DNA ligase nối lại, làm cho các dime tách thành các monome bình thường, cấu trúc của DNA được phục hồi.

Sửa chữa gián tiếp còn gọi là sửa chữa tối (dark reparation), nhờ hàng loạt các enzym trong tế bào nhận biết các nucleotid gắn sai và cắt bỏ. Enzym DNA polymerase I xúc tác tổng hợp các đoạn DNA bổ sung, hoặc thay thế bằng các nucleotid phù hợp, cơ chế của quá trình sửa chữa này rất phức tạp chưa được hiểu biết cặn kẽ.

III. PHIÊN MÃ TỔNG HỢP RNA (RNA TRANSCRIPTION)

1. Phiên mã tổng hợp mRNA

Các loài sinh vật bậc cao có bộ gen gồm nhiều phân tử DNA xoắn kép, thường xoắn zigzag tạo nên các nhiễm sắc thể. Ở sinh vật bậc cao gen cấu trúc điển hình là đoạn xoắn kép của phân tử DNA. Mạch có chiều 3'→ 5' được dùng làm khuôn tổng hợp mRNA, gọi là mạch khuôn (antisense). Trong quá trình phiên mã tổng hợp mRNA, các ribonucleotid được kéo dài trên mạch mRNA đang hình thành theo chiều 5'→ 3'. Mạch không được làm khuôn có chiều 5'→ 3' (sense). Trình tự sắp xếp các nucleotid trên mạch sense, tương đồng với trình tự của các acid amin trong phân tử protein được tổng hợp từ gen. Do vậy, khi công bố một gen mới, hoặc đăng ký một gen vào ngân hàng gen cần đăng ký trình tự của mạch sense. Phân tử RNA thông tin được tổng hợp từ mạch antisense theo nguyên lí bổ sung giữa các bazơ nitơ, nguyên liệu là các ribonucleotid tự do trong nhân tế bào (rATP, rGTP, rCTP, rUTP). Quá trình phiên mã có sự tham gia xúc tác và hoạt hoá của enzym RNA polymerase, các nhân tố phiên mã và năng lượng từ sự thuỷ phân ATP, GTP...

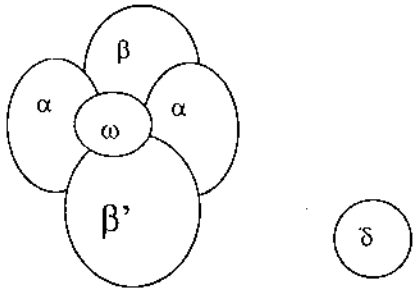
Do không có cơ chế sửa sai, nên mặc dù quá trình phiên mã có tính chính xác cao, kết quả phiên mã có nhiều sai sót hơn so với quá trình tái bản gen. Tỷ lệ sai sót trong phiên mã từ 10^4 - 10^5, sai sót trong phiên mã dẫn đến sai khác trong biểu hiện gen .

1.1. Phiên mã ở prokaryote

1.1.1. Enzym RNA polymerase ở prokaryote

Sinh vật *prokaryote* có một loại enzym RNA polymerase tham gia phiên mã. Enzym RNA polymerase của *E. coli* được nghiên cứu kỹ, có trọng lượng phân

tử 500.000 Da (1 Dalton (Da) = 1,66 x 10^{-24} gr = 1/12 khối lượng nguyên tử carbon), hệ số lắng 11 - 13 S (Sveyber). Enzym RNA polymerase của *E. coli* cấu tạo gồm nhân tố nhận biết δ và phần lõi có 5 chuỗi polypeptid gồm hai chuỗi α (mỗi chuỗi 41.000 Da), 1 chuỗi β (155.000 Da), 1 chuỗi β' (165.000 Da) và chuỗi ω (19.000 Da).



Lõi enzyme Nhân tố δ

Hình 2.20. Sơ đồ cấu trúc enzyme RNA polymerase của *E. coli*.

Các chuỗi β, β' giúp cho hình thanh các liên kết photphoeste, các chuỗi α, ω chưa rõ chức năng. Nhân tố δ là phân tử protein có vai trò quan trọng trong phiên mã, giúp nhận biết promoter và xác định điểm khởi đầu phiên mã đúng của gen.

1.1.2. Phiên mã tổng hợp mRNA ở prokaryote

Tế bào sinh vật *prokaryote* thực hiện phiên mã cùng một lúc trên toàn bộ phân tử DNA, tất cả các gen cấu trúc (cistron) được phiên mã đồng thời tạo nên một phân tử RNA thông tin chung cho tất cả các cistron. Mạch đơn của gen có chiều 3'→ 5' (antisense) là mạch khuôn, enzym RNA polymerase trượt trên gen cùng chiều mạch khuôn từ 3'→ 5'. Phiên mã hình thành phân tử mRNA theo một chiều xác định 5'→ 3', nghĩa là phân tử mRNA đang hình thành kéo dài theo chiều 5'→ 3'. Quá trình phiên mã tổng hợp mRNA được nghiên cứu kỹ ở vi khuẩn *E. coli*.

Trình tự - 35 Trình tự - 10 (hộp Pribnow)

5'TGTATTGACATGATAGAAGCACTCTACTATAAT CTCAAT AGGTCC 3'
3' ACATAACTGTACTATCTTCGTGAGATG ATATTA GAGTTATCCAGG5'
- 35 - 10 +1

Vị trí khởi đầu phiên mã

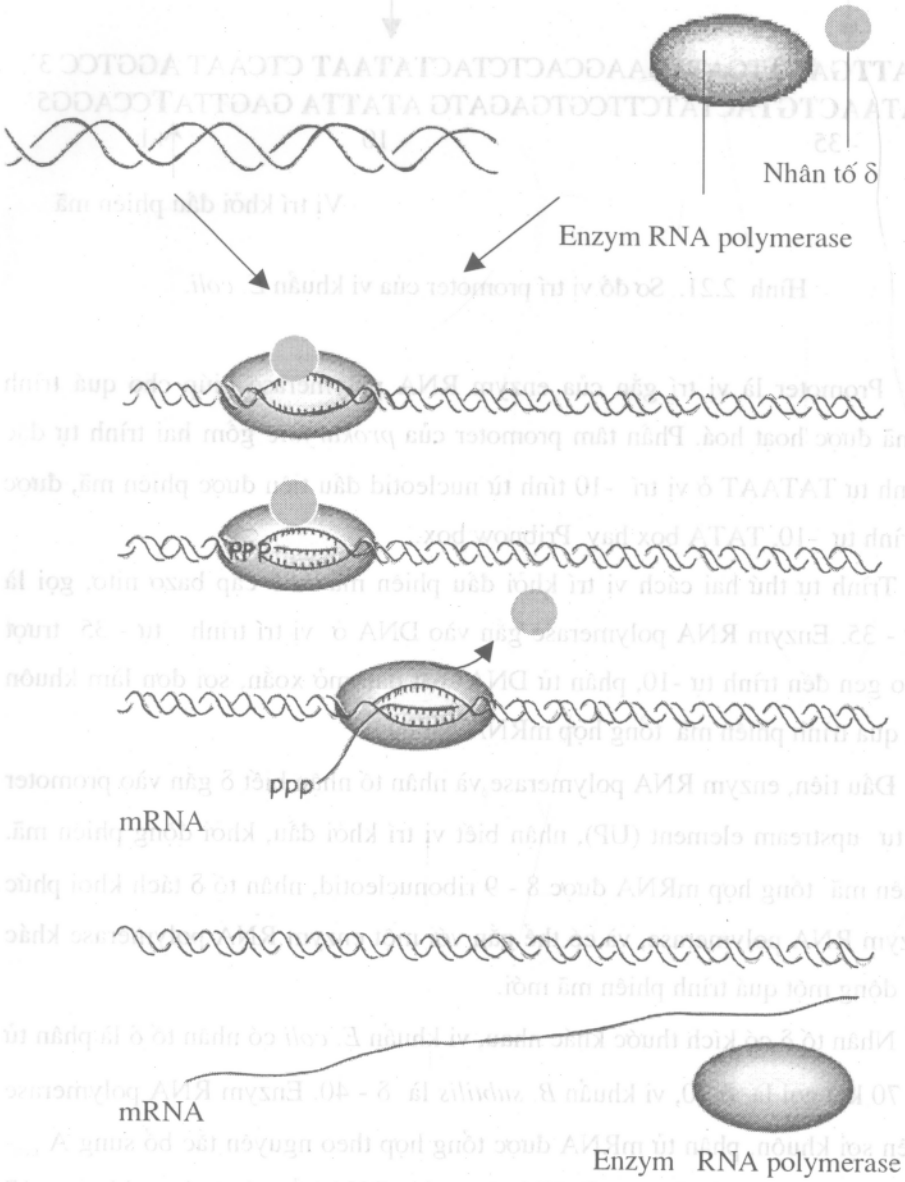
Hình 2.21. Sơ đồ vị trí promoter của vi khuẩn *E. coli*.

Promoter là vị trí gắn của enzym RNA polymerase giúp cho quá trình phiên mã được hoạt hoá. Phần tâm promoter của *prokaryote* gồm hai trình tự đặc hiệu trình tự TATAAT ở vị trí -10 tính từ nucleotid đầu tiên được phiên mã, được gọi là trình tự -10, TATA box hay Pribnow box.

Trình tự thứ hai cách vị trí khởi đầu phiên mã - 35 cặp bazơ nitơ, gọi là trình tự - 35. Enzym RNA polymerase gắn vào DNA ở vị trí trình tự - 35 trượt dọc theo gen đến trình tự -10, phân tử DNA bắt đầu mở xoắn, sợi đơn làm khuôn tách ra, quá trình phiên mã tổng hợp mRNA bắt đầu.

Đầu tiên, enzym RNA polymerase và nhân tố nhận biết δ gắn vào promoter ở trình tự upstream element (UP), nhận biết vị trí khởi đầu, khởi động phiên mã. Khi phiên mã tổng hợp mRNA được 8 - 9 ribonucleotid, nhân tố δ tách khỏi phức hợp enzym RNA polymerase, và có thể gắn với một enzym RNA polymerase khác để khởi động một quá trình phiên mã mới.

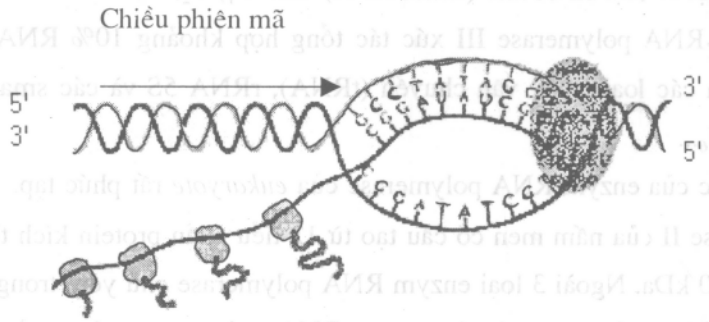
Nhân tố δ có kích thước khác nhau, vi khuẩn *E. coli* có nhân tố δ là phân tử protein 70 kD gọi là δ-70, vi khuẩn *B. subtilis* là δ - 40. Enzym RNA polymerase trượt trên sợi khuôn, phân tử mRNA được tổng hợp theo nguyên tắc bổ sung A_{gen}-rU, T_{gen} - rA, G_{gen} - rC, C_{gen} - rG. Khi phân tử mRNA tổng hợp được khoảng 17 ribonucleotid, phần đầu mRNA tách dần khỏi mạch khuôn DNA, còn đoạn đầu đang phiên mã khoảng 12 ribonucleotid vẫn gắn với gen. Khi enzym RNA polymerase trượt qua, đoạn gen đã tháo xoắn được xoắn lại cấu trúc ban đầu.



Hình 2.22. Nhân tố δ và enzym RNA polymerase trong phiên mã của vi khuẩn *E. coli*.

Trên mạch khuôn DNA có các dấu hiệu kết thúc (dấu hiệu kết thúc có thể là nhân tố ρ, hoặc Rho protein...). Các nghiên cứu mới của Terry Platt (1987) cho thấy Rho protein có vai trò kết thúc phiên mã, Rho protein bám vào đoạn cuối của mRNA tạo nên cấu trúc kẹp tóc làm cho enzym RNA polymerase rời khỏi mạch khuôn.

Kết thúc phiên mã một phân tử mRNA chung cho tất cả các cistron được tổng hợp. Quá trình phiên mã tổng hợp mRNA ở *prokaryote* tiến hành đồng thời với dịch mã. Tuỳ thuộc giai đoạn sinh trưởng của tế bào và điều kiện môi trường, có thể một số cistron được dịch mã, hoặc toàn bộ các cistron được dịch mã.



Hình 2.23. Sơ đồ phiên mã và dịch mã ở *prokaryote*.

1.2. Phiên mã tổng hợp mRNA ở sinh vật eukaryote

Sinh vật nhân chuẩn có nhân phân biệt với tế bào chất, trong nhân DNA tập hợp thành nhiều nhiễm sắc thể, mỗi nhiễm sắc thể có nhiều gen. Phần lớn các gen cấu trúc của *eukaryote* là gen phân đoạn gồm exon xen kẽ với các intron. Các gen cấu trúc được phiên mã riêng biệt, tạo nên các phân tử RNA thông tin đặc trưng của mỗi gen. Quá trình phiên mã đầu tiên tạo nên các phân tử tiền RNA thông tin (pre mRNA), các phân tử tiền mRNA phải qua một quá trình biến đổi thành mRNA hoàn chỉnh. Các phân tử mRNA hoàn chỉnh (trưởng thành) có thể được đưa ra tế bào chất tham gia quá trình dịch mã. Phiên mã ở *eukaryote* có sự tham gia của nhiều loại enzym RNA polymerase và nhiều loại nhân tố phiên mã.

1.2.1. Enzym RNA polymerase ở eukaryote

Sinh vật *eukaryote* có ba loại enzym RNA polymerase, mỗi loại enzym RNA polymerase có vai trò khác nhau trong phiên mã.

Enzym RNA polymerase I xúc tác phiên mã tổng hợp khoảng 60% RNA tổng số, chủ yếu là các loại rRNA tham gia cấu trúc của các ribosom gồm rRNA 28S, rRNA 18S và rRNA 5,8S.

Enzym RNA polymerase II xúc tác tổng hợp khoảng 30% tổng lượng RNA của tế bào. Enzym RNA polymerase II xúc tác phiên mã tạo các phân tử RNA thông tin và một số loại RNA nhỏ (small RNA) như U_1, U_2, U_3...

Enzym RNA polymerase III xúc tác tổng hợp khoảng 10% RNA của tế bào, chủ yếu là các loại RNA vận chuyển (tRNA), rRNA 5S và các small RNA khác như U_5, U_6...

Cấu trúc của enzym RNA polymerase của *eukaryote* rất phức tạp. Enzym RNA polymerase II của nấm men có cấu tạo từ 12 tiểu phần protein kích thước từ 7,7 kDa đến 190 kDa. Ngoài 3 loại enzym RNA polymerase chủ yếu, trong ty thể, lạp thể của tế bào *eukaryote* có các enzym RNA polymerase như của tế bào *prokaryote*.

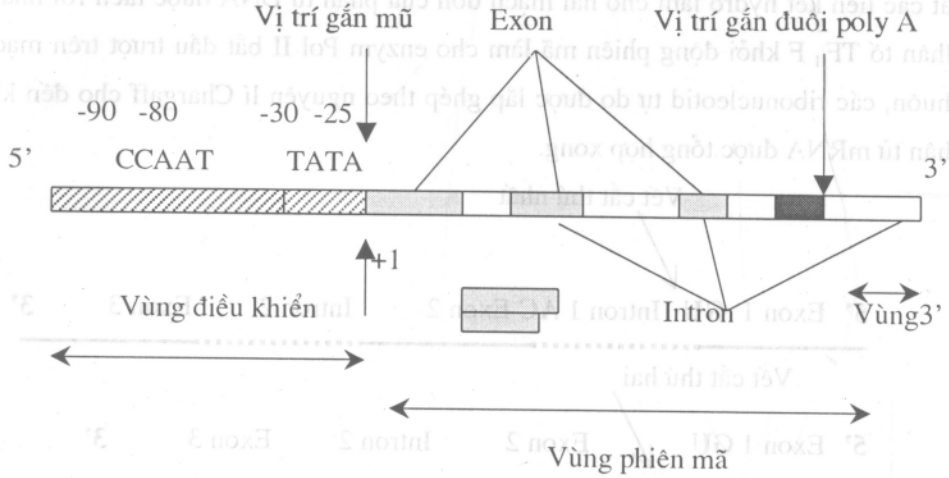
1.2.2. Các nhân tố phiên mã ở eukaryote

Tế bào sinh vật *eukaryote* có nhiều loại nhân tố phiên mã, gồm nhân tố nhận biết vị trí khởi đầu phiên mã trên mạch gen, nhân tố hoạt hoá và khởi động promoter...

Trong mỗi quá trình phiên mã có sự tham gia của một loại enzyme RNA polymerase, cần có sự tham gia của các nhân tố phiên mã phù hợp. Nhân tố phiên mã viết tắt là TF (transcription factor). TF nhóm II tham gia phiên mã tổng hợp mRNA gồm TF_{II} A, TF_{II} B, TF_{II} D, $TF_{II}E$, $TF_{II}F$ và $TF_{II}H$... Mỗi loại TF có vai trò khác nhau trong sự tổng hợp mRNA. Tham gia phiên mã tổng hợp mRNA còn có nhiều loại protein đặc hiệu như TATA TBP (box binding protein), $TAF_{II}S$ ...

1.2.3. Phiên mã tổng hợp mRNA ở eukaryote

Promoter của *eukaryote* có trình tự giàu các cặp T - A gọi là hộp TATA thường ở vị trí - 25 đến - 30 trước vị trí nucleotide đầu tiên được phiên mã (vị trí +1). Hộp TATA giúp enzym RNA polymerase nhận biết và khởi động phiên mã ở vị trí chính xác.



Hình 2.24. Vị trí vùng phiên mã của *eukaryote*.

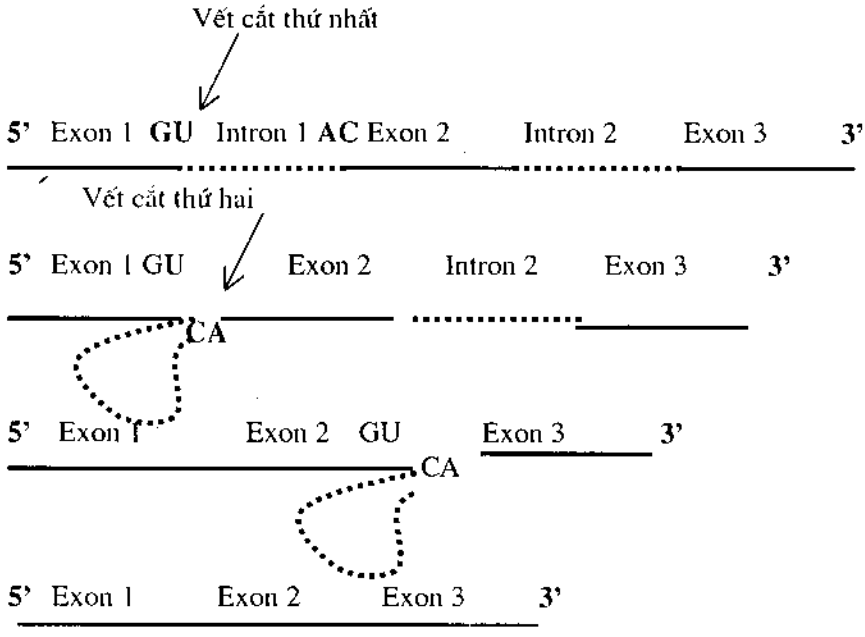
Vùng phiên mã được tính từ nucleotid đầu tiên được phiên mã đến vị trí gắn đuôi poly A của mRNA, vùng phiên mã gồm các intron xen kẽ exon.

Intron là trình tự không mang mã thông tin di truyền, còn gọi là dãy mã mù, chiếm khoảng 30 -75% độ dài của các gen cấu trúc. Đầu 5' của intron thường có hai nucleotid GU, đầu 3' là hai nucleotid AG.

Exon là trình tự nucleotid của gen mã hoá các acid amin trong mỗi chuỗi polypeptid. Trong nhân tế bào các intron và exon đều được phiên mã tạo các phân tử tiền mRNA (pre mRNA). Các phân tử tiền mRNA qua một quá trình biến đổi, được cắt bỏ các intron, nối các exon với nhau tạo thành mRNA trưởng thành. Vùng 3' của gen không được phiên mã, chức năng vùng 3' đến nay còn chưa được hiểu biết một cách cặn kẽ.

Quá trình phiên mã tổng hợp mRNA gồm nhiều giai đoạn kế tiếp và đan xen lẫn nhau:

Giai đoạn khởi động phiên mã: nhờ tác động hoạt hoá của nhân tố phiên mã $TF_{II}D$, enzym RNA polymerase II (viết tắt là Pol II) gắn vào vị trí TATA box. Nhân tố phiên mã $TF_{II}H$ và $TF_{II}B$ gắn tiếp vào vị trí của Pol II. Enzym Pol II xúc tác cắt các liên kết hydro làm cho hai mạch đơn của phân tử DNA được tách rời nhau. Nhân tố TF_{II} F khởi động phiên mã làm cho enzym Pol II bắt đầu trượt trên mạch khuôn, các ribonucleotid tự do được lắp ghép theo nguyên lí Chargaff cho đến khi phân tử mRNA được tổng hợp xong.



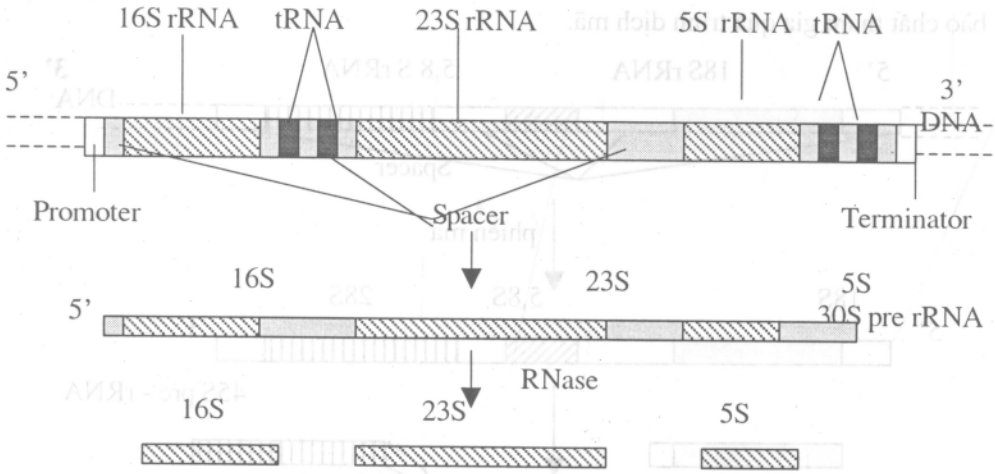
Hình 2.25. Sơ đồ cắt nối exon - intron của tiền mRNA.

Khi enzym Pol II gặp tín hiệu kết thúc phiên mã thì dừng lại, phân tử tiền mRNA được hình thành. Khi có tác nhân ức chế, tín hiệu từ vị trí hoạt hoá đến enzym Pol II bị cắt, quá trình phiên mã không được thực hiện, phân tử mRNA không được tổng hợp.

Giai đoạn biến đổi tiền mRNA thành phân tử mRNA hoàn chỉnh: quá trình biến đổi gồm: gắn mũ, hình thành đuôi poly A và cắt intron nối các exon.

Gắn mũ (capping): khi phân tử tiền mRNA mới hình thành được một đoạn, ở đầu 5' của phân tử tiền mRNA liên kết với một phân tử 7- methyl guanin, gọi là gắn mũ. Mũ là yếu tố cần thiết cho các ribosom nhận biết trong sự khởi đầu dịch mã, và tránh cho mRNA không bị phân huỷ bởi các loại enzym nuclease.

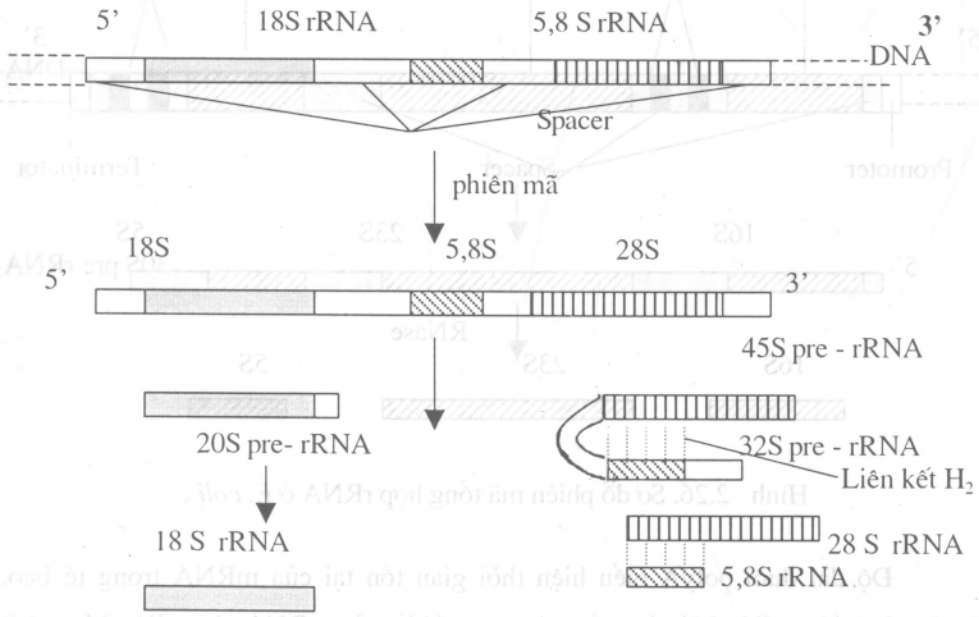
Hình thành đuôi polyA: phân tử tiền mRNA vừa tổng hợp xong, bị cắt bỏ khoảng 20 nucleotid nằm trước một trình tự **AAUAAA.** Enzym polyA polymerase xúc tác gắn thêm một số nucleotid loại A vào đầu 3' của phân tử tiền mRNA, tạo thành đuôi polyA. Số lượng A được gắn thay đổi tuỳ theo loài và giai đoạn phát triển của tế bào (ở động vật có vú khoảng 250, khoảng 100 ở *eukaryote* bậc thấp). Khi mRNA được chuyển ra tế bào chất đuôi polyA của mRNA bị thoái hoá ngắn dần, chỉ còn 30 - 150 A.



Hình 2.26. Sơ đồ phiên mã tổng hợp rRNA ở *E. coli* .

Độ dài đuôi polyA biểu hiện thời gian tồn tại của mRNA trong tế bào. Đuôi polyA càng dài, thời gian tồn tại trong tế bào của mRNA càng dài. Một số ít trường hợp mRNA không có đuôi polyA như các mRNA phiên mã từ gen mã hoá histon không có đuôi poly A.

Quá trình cắt intron nối exon (splicing): Phân tử tiền mRNA đã gắn mũ và gắn đuôi poly A tiếp tục biến đổi, các intron được cắt bỏ và các exon được nối với nhau thành phân ử mRNA hoàn chỉnh. Quá trình cắt intron nối exon có sự tham gia của các phần tử ghép nối - spliceosom. Các phân tử RNA nhỏ (small RNA) có thể kết hợp với protein đặc hiệu tạo thành nhân con. Các phân tử RNA nhỏ có khoảng 100 - 300 ribonucleotid, giàu nucleotid loại Uracin. Hiện nay đã biết có 6 loại small RNP đặt tên từ U_1, U_2, U_3, U_4, U_5 và U_6 (Chữ U biểu thị các phân tử RNA giàu Uracin). Các spliceosom tạo nên một vết cắt ở biên giới của exon thứ nhất với intron. Gốc 5' photphat của Guanin ở phần đầu của intron liên kết với gốc - 3'OH của Adenin gần đầu kia của intron tạo cấu trúc thòng lọng. Tiếp theo một vết cắt tại biên giới của intron đầu tiên với exon thứ hai làm cho intron bị cắt bỏ còn các exon được nối với nhau. Quá trình tiếp tục đến khi các intron bị cắt hết, các exon nối với nhau thành mRNA trưởng thành. Các phân tử mRNA trưởng thành chui qua lỗ màng nhân ra tế bào chất tham gia quá trình dịch mã.



Hình 2.27. Sơ đồ phiên mã tổng hợp rRNA ở *eukaryote*.

3. Phiên mã tổng hợp rRNA

Các phân tử rRNA được tổng hợp từ các gen đặc trưng riêng, các gen mã hoá rRNA thường nằm ở vùng DNA lặp lại. Phân tử rRNA được tổng hợp theo nguyên lí Chargaff, tạo nên các phân tử tiền rRNA.

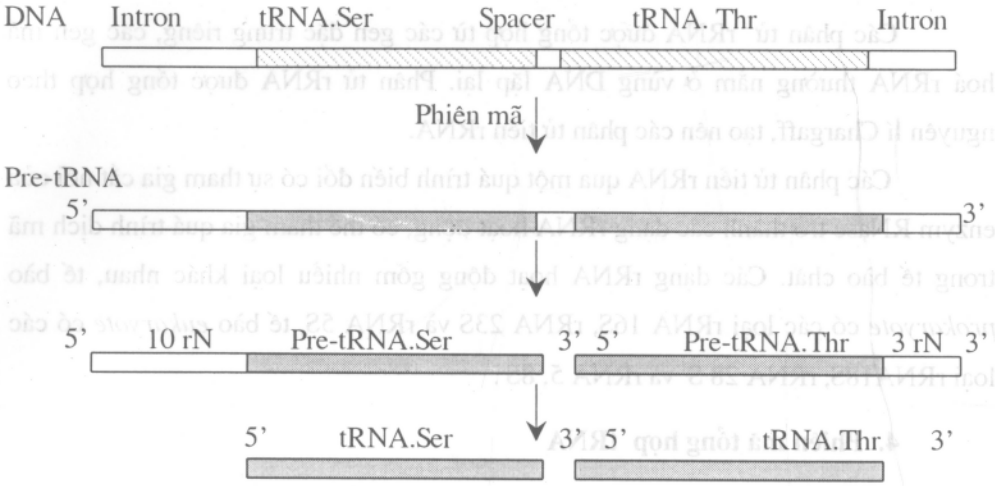
Các phân tử tiền rRNA qua một quá trình biến đổi có sự tham gia cắt nối của enzym RNase trở thành các dạng rRNA hoạt động, có thể tham gia quá trình dịch mã trong tế bào chất. Các dạng rRNA hoạt động gồm nhiều loại khác nhau, tế bào *prokaryote* có các loại rRNA 16S, rRNA 23S và rRNA 5S, tế bào *eukaryote* có các loại rRNA18S, rRNA 28 S và rRNA 5, 8S .

4. Phiên mã tổng hợp tRNA

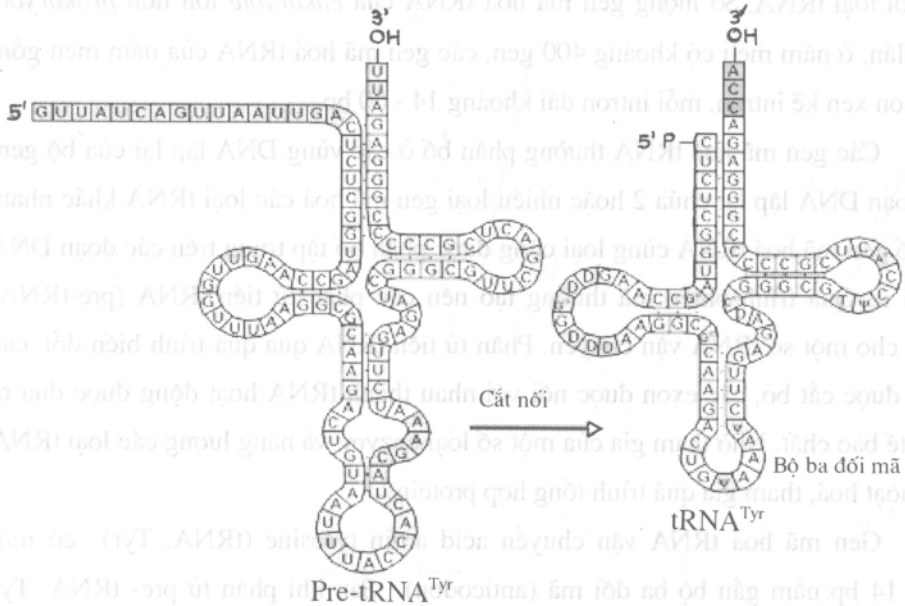
Các gen mã hoá tRNA thường nằm ở vùng DNA lặp lại, có thể ở vị trí trong các gen đệm (spacer). Gen mã hoá tRNA của *eukaryote* có nhiều bản sao, tế bào ếch Xenopus levis mỗi loại tRNA có khoảng 200 bản sao, tế bào *E. coli* chỉ có một bản sao mỗi loại tRNA. Số lượng gen mã hoá tRNA của *eukaryote* lớn hơn *prokaryote* nhiều lần, ở nấm men có khoảng 400 gen, các gen mã hoá tRNA của nấm men gồm các exon xen kẽ intron, mỗi intron dài khoảng 14 - 60 bp.

Các gen mã hoá tRNA thường phân bố ở các vùng DNA lặp lại của bộ gen, mỗi đoạn DNA lặp lại chứa 2 hoặc nhiều loại gen mã hoá các loại tRNA khác nhau. Một số gen mã hoá tRNA cùng loại cũng được phân bố tập trung trên các đoạn DNA lặp lại ít. Quá trình phiên mã thường tạo nên các phân tử tiền tRNA (pre-tRNA) chung cho một số tRNA vận chuyển. Phân tử tiền tRNA qua quá trình biến đổi, các intron được cắt bỏ, các exon được nối với nhau thành tRNA hoạt động được đưa ra ngoài tế bào chất. Nhờ tham gia của một số loại enzym và năng lượng các loại tRNA được hoạt hoá, tham gia quá trình tổng hợp protein.

Gen mã hoá tRNA vận chuyển acid amin tyrosine (tRNA. Tyr) có một intron 14 bp nằm gần bộ ba đối mã (anticodon). Sau khi phân tử pre- tRNA. Tyr được tổng hợp bị cắt bỏ một đoạn 14 ribonucleotid trở thành dạng tRNA hoạt động.



Hình 2.28. Sơ đồ phiên mã tổng hợp tRNA ở *E. coli*.



Hình 2.29. Sơ đồ cắt nối phân tử RNA vận chuyển axit amin tyrosin ở vi khuẩn *E. coli*.

Nhiều gen mã hoá tRNA có thể nằm kề nhau trên một đoạn DNA ngăn cách bằng các gen đệm, chẳng hạn tế bào *E. coli* có 2 gen mã hoá 2 loại tRNA vận chuyển acid amin threonin và serin nằm kề nhau, ngăn cách bằng một đoạn đệm dài 6 bp. Sau khi phiên mã đoạn đệm được cắt bỏ, phân tử tRNA.ser cắt bỏ tiếp 10 ribonucleotid ở đầu 5' còn tRNA.thr được cắt bỏ 3 ribonucleotid ở đầu 3' tạo thành các tRNA hoạt động

IV. DỊCH MÃ (TRANSCRIPTION)

1. Mã di truyền

Phân tử DNA có bốn loại nucleotid A, G, T, C, phiên mã tạo các phân tử mRNA có bốn loại ribonucleotid A, G, U, C. Trong các phân tử protein do gen mã hoá có hơn 20 loại acid amin khác nhau. Do vậy, nếu một loại nucleotid mã hoá một acid amin có $4^1 = 4$ loại acid amin. Nếu hai loại nucleotid mã hoá một acid amin được $4^2 = 16$ loại acid amin, không đủ mã hoá 20 loại acid amin trong các phân tử protein. Nếu ba loại nucleotid mã hoá một acid amin được $4^3 = 64$ loại acid amin, thừa và đủ mã thông tin cho hơn 20 loại acid amin khác nhau.

Nhiều nghiên cứu đã xác định có một số loại acid amin do hai hay nhiều loại bộ ba mã hoá khác nhau xác định. Bằng thực nghiệm gây đột biến gen R_{II} của phage T_4, làm mất các nucleotid của gen, tạo nên các phân tử protein khác nhau. Tiến hành tạo đột biến thực nghiệm làm mất một, hoặc mất ba nucleotid của gen R_{II} của phage T_4 tạo nên các phân tử protein thiếu mất một acid amin, trật tự các acid amin bị thay đổi. Nếu đoạn đầu của gen R_{II} của phage T_4 bị mất ba nucleotid liền nhau hoặc cách nhau, thì phân tử protein tạo thành thiếu một acid amin, trật tự sắp xếp của các acid amin ở đoạn đầu bị thay đổi, trật tự đoạn sau giữ nguyên. Điều đó chứng tỏ mã di truyền là mã bộ ba, nghĩa là ba nucleotid kế tiếp nhau trong gen mã hoá cho một loại acid amin.

Bảng 2.1. Mã di truyền của mRNA

	U	C	A	G	Đầu 3'
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gls	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gls	CGG Arg	G
A	AUU Ileu	ACU Thr	AUU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ileu	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ileu	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Tính chất của mã di truyền:

- Thông tin di truyền theo một chiều từ 5' đến 3' của mRNA, tạo nên các khung đọc mã.

- Mã di truyền có tính liên tục, nghĩa là đọc và dịch mã liên tục không bị gián đoạn.

- Mã di truyền có tính chất phổ biến ở các sinh vật. Mã di truyền có bộ ba mở đầu, bộ ba kết thúc đặc trưng và giống nhau ở các nhóm sinh vật *prokaryote*,

eukaryote và virus. Bộ ba mở đầu các phân tử mRNA là AUG ở đầu 5', bộ ba kết thúc ở đầu 3' của mRNA là một trong 3 bộ ba: UAG, UAA, UGA.

- Mã di truyền có tính linh hoạt, một số bộ ba mã hoá có thể thay đổi nucleotid thứ hai hoặc thứ ba vẫn mã hoá một loại acid amin, mặt khác có một số acid amin được xác định bởi hai hay nhiều bộ ba mã hoá: acid amin glutamin do hai bộ ba mã hoá GAU, GAG; acid amin Alanin do bốn bộ ba mã hoá GCA, GCU, GCC, GCG.

2. Quá trình dịch mã (Translation)

2.1. Cấu trúc protein

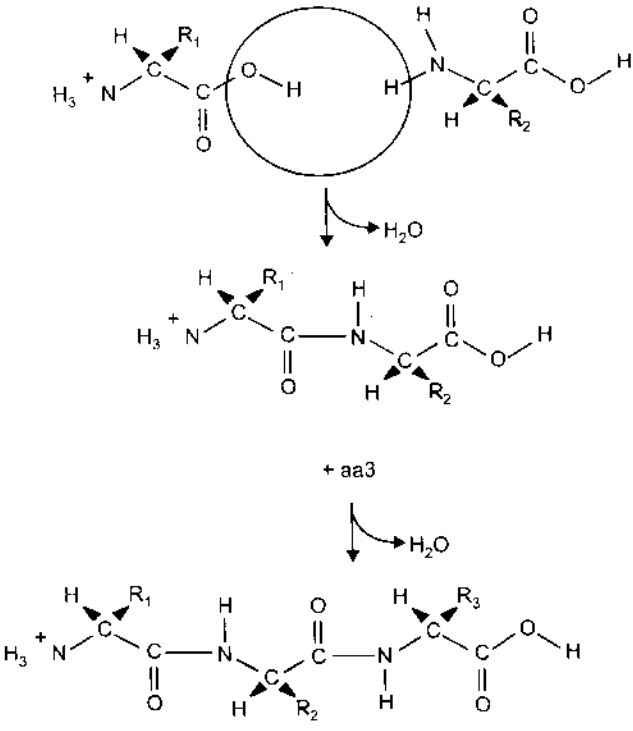
Protein có cấu tạo từ các acid amin sắp xếp kế tiếp nhau, liên kết với nhau bằng các liên kết peptid tạo nên chuỗi polypeptid. Mỗi acid amin có cấu tạo chung gồm nhóm amin (- NH_2), nhóm carboxyl (- COOH) và các hydrocarbon (-R), sự khác nhau của các acid amin do cấu trúc khác nhau của gốc các hợp chất hydrocarbon.

Mỗi phân tử protein đặc trưng riêng bởi số lượng, số loại và trình tự sắp xếp của các acid amin và mức độ xoắn của chuỗi polypeptid. Một phân tử protein có thể cấu tạo từ một hoặc nhiều chuỗi polypeptid. Chẳng hạn, phân tử insulin là protein có 51 acid amin, cấu tạo từ hai chuỗi polypeptid chuỗi A gồm 21 acid amin, chuỗi B có 30 acid amin nối với nhau bằng ba cầu disulfur (S - S), hoặc phân tử hemoglobin có 4 chuỗi peptid cùng nhân hem cấu tạo nên...

Protein tham gia cấu tạo các tổ chức của tế bào và cơ thể, là thành phần chủ yếu của các enzym, hormon tham gia quá trình chuyển hoá và điều hoà các quá trình sinh trưởng phát triển của tế bào và cơ thể, protein đồng thời là nguồn năng lượng dự trữ của tế bào và của mọi cơ thể sống.

2.2. Cơ chế dịch mã (Translation)

Các acid amin (aa) được hoạt hoá nhờ năng lượng từ các ATP, GTP được gắn với RNA vận chuyển (tRNA) nhờ xúc tác của enzym aminoacyl-tRNA synthetase, tạo thành phức hợp aa~tRNA (aminoacyl-tRNA).

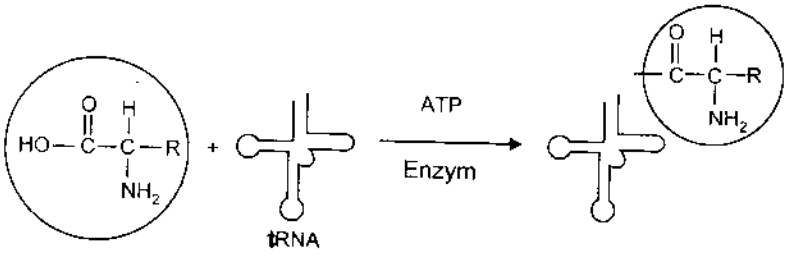


Hình 2.30. Sơ đồ cấu tạo chuỗi polypeptid.

aa + ATP + Enzym ⟶ aa ~ AMP~ Enzym + 2P

aa ~ AMP~ Enzym + tRNA ⟶ aa ~ tRNA + Enzym + AMP

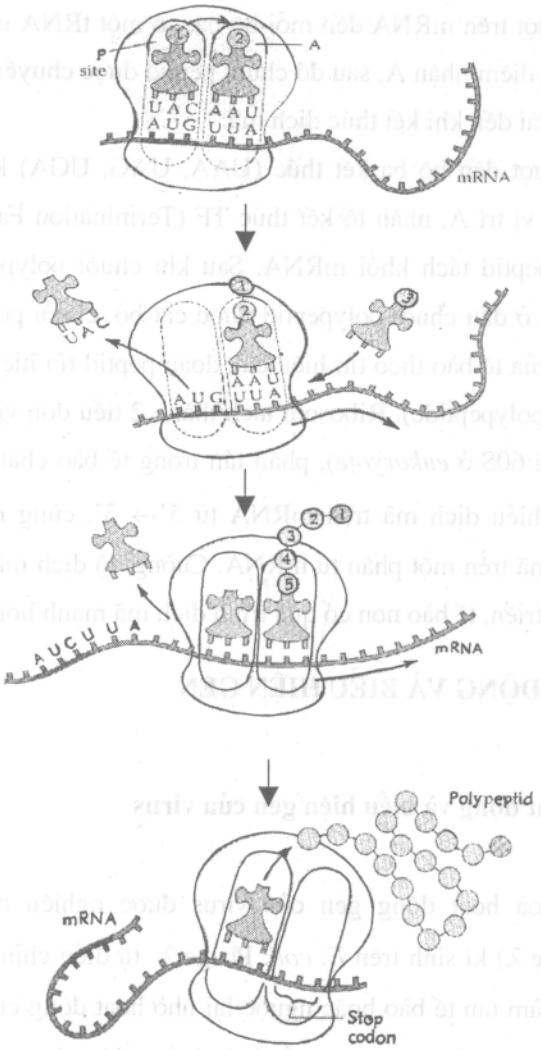
(xem hình 2.31)



Hình 2.31. Sơ đồ hoạt hoá axit amin.

Nhân tố khởi động dịch mã IF (Initiation Factor) ở sinh vật *prokaryote* gồm ba loại, ở sinh vật *eukaryote* có 6 loại nhân tố IF.

Dấu hiệu khởi động dịch mã là bộ ba AUG trên mRNA (AUG đồng thời mã hoá acid amin methionin). Acid amin methionin (Met) được hoạt hoá tạo phức hợp Met ~ tRNA.



Hình 2.32. Sơ đồ dịch mã của ribosom.

Năng lượng giải phóng từ sự thuỷ phân ATP làm cho tiểu phần ribosom nhỏ (30S, 40S) gắn vào vị trí bộ ba AUG, tiểu phần ribosom lớn (50S, 60S) kết hợp với tiểu phần nhỏ thành ribosom. Một phân tử tRNA mang acid amin methionin (Met ~ tRNA) dịch chuyển đến ribosom ở bộ ba AUG và gắn Met vào vị trị nhận acid amin (vị trí A) trên tiểu phần lớn. Ribosom trượt tiếp trên mRNA theo chiều 5' → 3'.

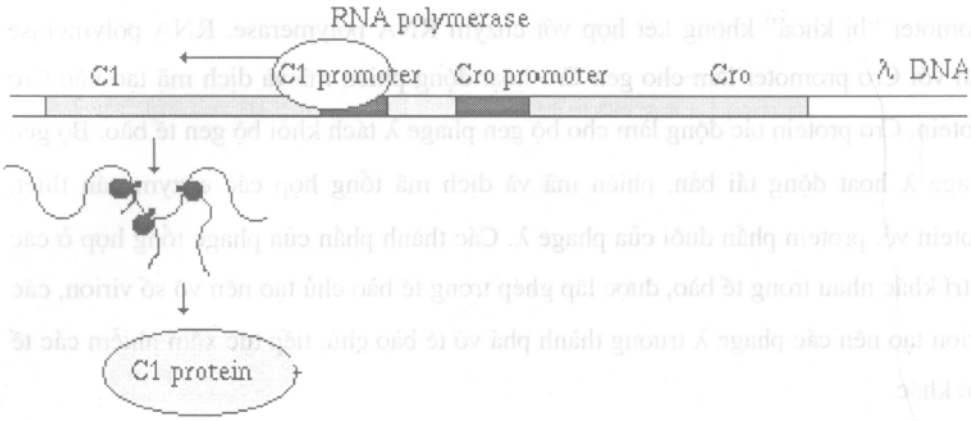
Các ribosom trượt trên mRNA đến mỗi bộ ba, có một tRNA mang một acid amin tương ứng gắn vào điểm nhận A, sau đó chuỗi peptid được chuyển sang vị trí P, chuỗi peptid được kéo dài đến khi kết thúc dịch mã.

Khi ribosom trượt đến bộ ba kết thúc (UAA, UAG, UGA) không có acid amin nào được đưa đến vị trí A, nhân tố kết thúc TF (Termination Factor) làm cho ribosom và chuỗi polypeptid tách khỏi mRNA. Sau khi chuỗi polypeptid rời khỏi ribosom, acid amin Met ở đầu chuỗi polypeptid được cắt bỏ, chuỗi polypeptid được đưa đến vị trí cần thiết của tế bào theo tín hiệu của đoạn peptid tín hiệu (khoảng 16-24 axit amin đầu chuỗi polypeptide). Ribosom tách thành 2 tiểu đơn vị 30S và 50S ở *prokaryote* (hoặc 40S và 60S ở *eukaryote*), phân tán trong tế bào chất chuẩn bị quá trình dịch mã mới. Chiều dịch mã trên mRNA từ 5'→ 3', cùng một lúc nhiều ribosom tham gia dịch mã trên một phân tử mRNA. Cường độ dịch mã tuỳ theo loại tế bào và giai đoạn phát triển, tế bào non có quá trình dịch mã mạnh hơn tế bào già.

V. ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG VÀ BIỂU HIỆN GEN

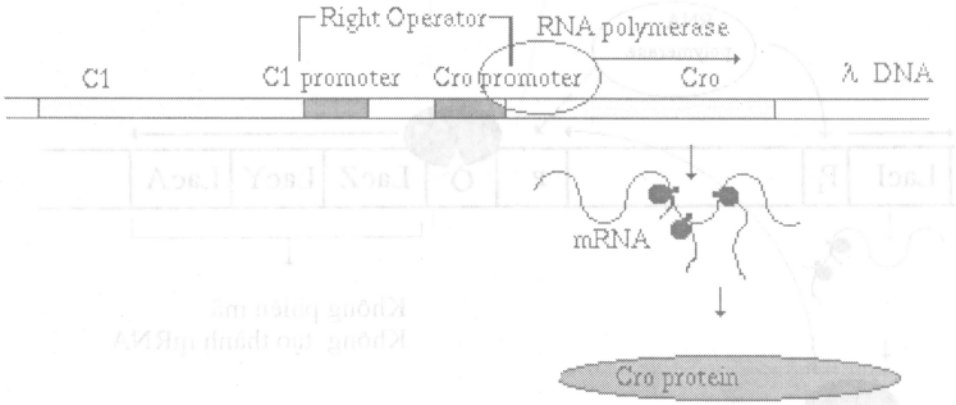
1. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen của virus

Cơ chế điều hoà hoạt động gen của virus được nghiên cứu kỹ ở các Bacteriophage λ (phage λ) kí sinh trên *E. coli*. Phage λ tự điều chỉnh từ giai đoạn tiềm tan sang gây độc, làm tan tế bào hoặc ngược lại nhờ hoạt động của các gen C_I và gen Cro. Gen C_I tác dụng như một công tắc hai chiều, giúp phage λ ở trạng thái tiềm tan hoặc gây độc làm tan tế bào.



Hình 2.33. Điều hoà hoạt động gen phage λ ở giai đoạn tiềm tan.

Khi enzym RNA polymerase gắn với C_I promoter, gen C_I được phiên mã và dịch mã tạo nên C_I protein. C_I protein có hoạt tính, kìm hãm hoạt động của Cro promoter làm cho gen Cro không phiên mã và dịch mã. Bộ gen của phage λ gắn với bộ gen tế bào chủ tạo nên prophage, tồn tại ở dạng tiềm tan cùng với bộ gen tế bào chủ.



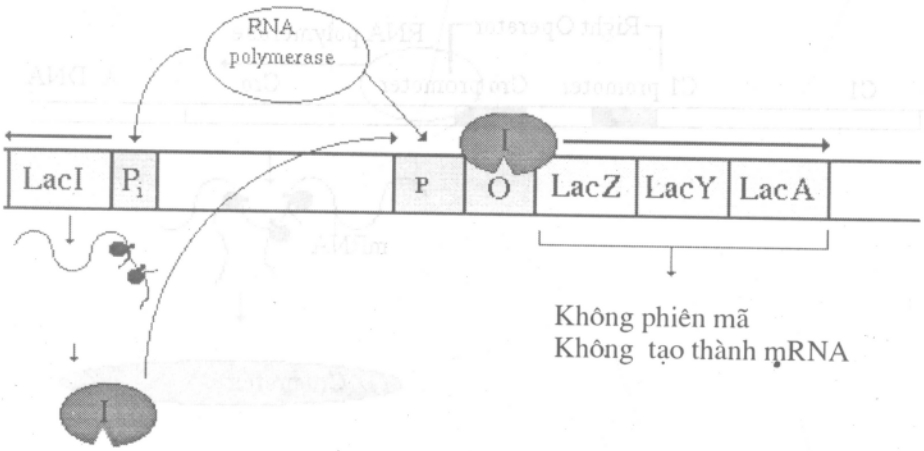
Hình 2.34. Điều hoà hoạt động gen phage λ gây độc .

Khi gặp các điều kiện bất lợi như tia UV, nhiệt độ cao, chất hoá học... C_I promoter "bị khoá" không kết hợp với enzym RNA polymerase. RNA polymerase gắn với Cro promoter làm cho gen Cro hoạt động phiên mã và dịch mã tạo nên Cro protein. Cro protein tác động làm cho bộ gen phage λ tách khỏi bộ gen tế bào. Bộ gen phage λ hoạt động tái bản, phiên mã và dịch mã tổng hợp các enzym cần thiết, protein vỏ, protein phần đuôi của phage λ. Các thành phần của phage tổng hợp ở các vị trí khác nhau trong tế bào, được lắp ghép trong tế bào chủ tạo nên vô số virion, các virion tạo nên các phage λ trưởng thành phá vỡ tế bào chủ, tiếp tục xâm nhiễm các tế bào khác.

2. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen ở vi khuẩn

2.1. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen của operon Lac ở E. coli

Bộ gen vi khuẩn gồm nhiều operon khác nhau. Mỗi operon có vùng điều khiển chung cho tất cả các cistron. Năm 1961 F. Jacob và cộng sự nghiên cứu sự kiểm soát di truyền hấp phụ đường lactose của *E. coli*, phát hiện cơ chế cảm ứng tổng hợp các enzym hấp phụ đường lactose. Các tác giả là những người đầu tiên khám phá cơ chế điều hoà hoạt động gen, được giải Nobel về Y học 1965.



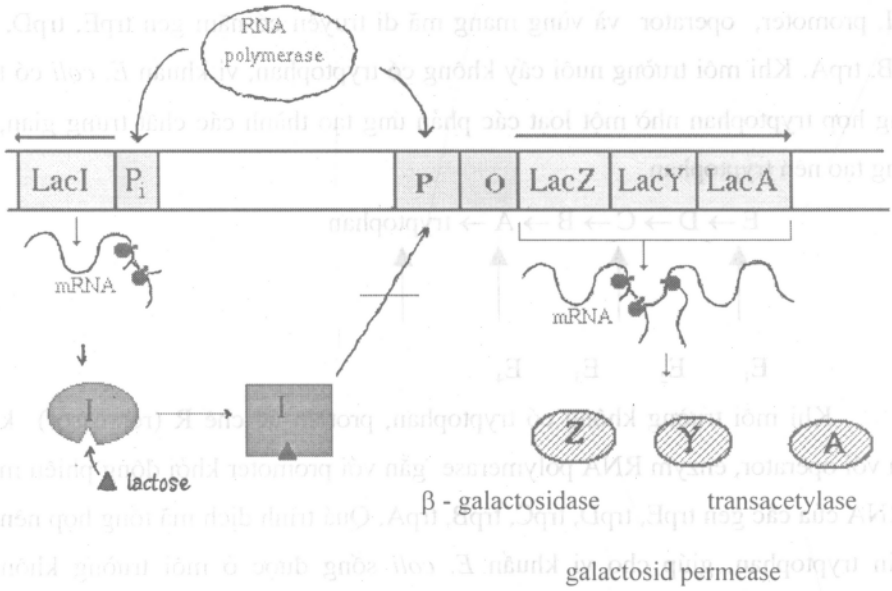
Hình 2.35. Hoạt động của operon Lac khi môi trường có glucose.

Vi khuẩn *E. coli* khi nuôi cấy trên môi trường có đường glucose, hấp phụ glucose cho quá trình sinh trưởng và phân chia tế bào. Khi môi trường chỉ có đường lactose, sau một thời gian thích ứng các tế bào vi khuẩn *E. coli* có thể hấp phụ đường lactose sinh trưởng và phân chia.

Sự thích ứng của các tế bào *E. coli* với đường lactose liên quan đến hoạt động của các gen trong operon Lac.

Vùng điều khiển của operon Lac gồm promoter (P), operator (O). Ngoài ra còn có gen điều hoà lacI ở gần operon Lac, gen lacI mã hoá một loại protein ức chế I còn gọi là nhân tố kìm hãm (repressor).

Vùng mang mã di truyền của operon Lac gồm 3 gen: gen lacZ mã hoá cho enzym β - galactosidase có tác dụng thuỷ phân đường lactose thành đường galactose và đường glucose, gen lacY mã hoá cho enzym galactosid permease giúp sự vận chuyển đường lactose qua màng tế bào vào trong tế bào và gen lacA mã hoá enzym transacetylase, chức năng chưa được biết rõ, không tham gia vào chuyển hoá đường lactose.



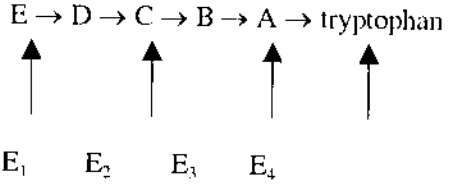
Hình 2.36. Hoạt động của Lac operon khi môi trường có đường lactose.

Trong môi trường nuôi cấy có đường glucose, gen ức chế lacI phiên mã và dịch mã tạo protein ức chế (I). Protein ức chế I kết hợp với operator làm cho enzym RNA polymerase không gắn vào vị trí của promoter (P), ngăn cản phiên mã của các gen lacZ, lac Y, và lacA, các mRNA của các gen trong operon Lac không được tổng hợp.

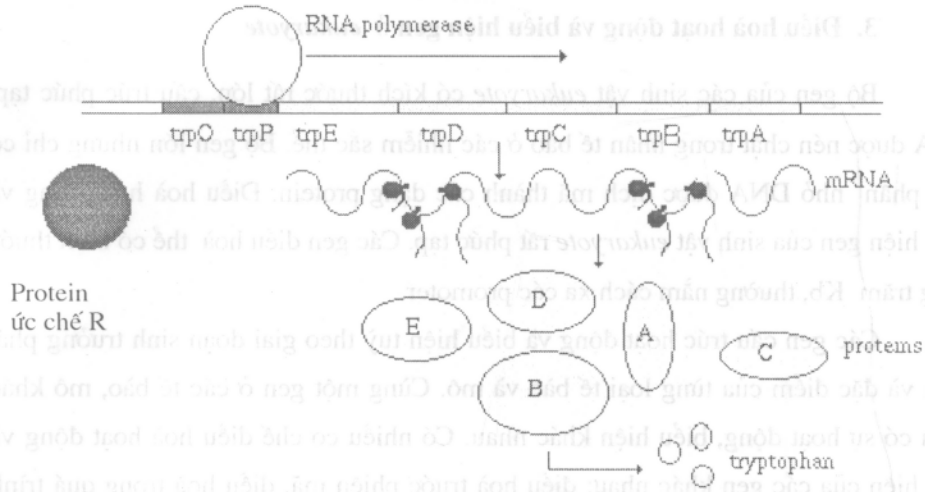
Trong môi trường không có đường glucose, đường lactose là nhân tố cảm ứng (inductor), lactose kết hợp với protein ức chế I, thay đổi đặc tính của protein ức chế, làm cho protein ức chế I không kết hợp với operator. Operator được khởi động làm cho enzym RNA polymerase gắn vào vị trí promoter, các gen lac Z, lacY, lac A được phiên mã và dịch mã, tạo nên các enzym cần thiết cho sự chuyển hoá đường lactose. Tế bào *E. coli* có khả năng chuyển hoá và hấp phụ đường lactose cần thiết cho quá trình sinh trưởng và tiếp tục phân chia.

2.2. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen operon Trp ở E. coli

Nghiên cứu ở vi khuẩn *E. coli* cho thấy acid amin tryptophan là nhân tố ức chế trong điều hoà hoạt động gen. Operon tryptophan gồm vùng điều khiển có gen trpI, promoter, operator và vùng mang mã di truyền có năm gen trpE, trpD, trpC, trpB, trpA. Khi môi trường nuôi cấy không có tryptophan, vi khuẩn *E. coli* có thể tự tổng hợp tryptophan nhờ một loạt các phản ứng tạo thành các chất trung gian, cuối cùng tạo nên tryptophan.

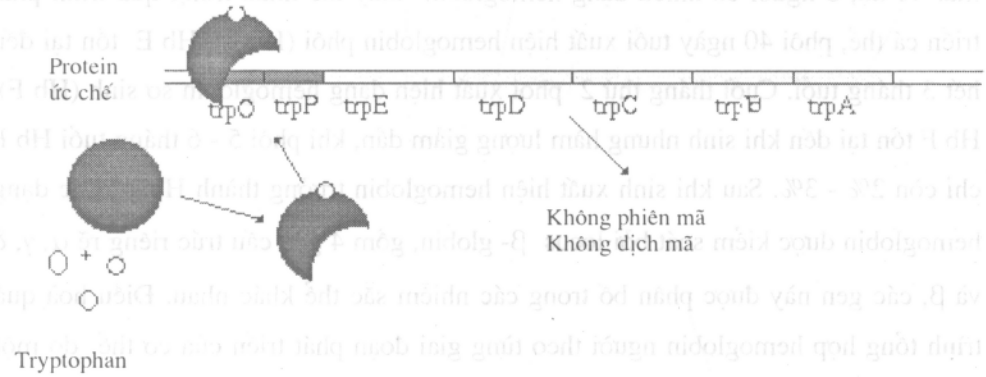


Khi môi trường không có tryptophan, protein ức chế R (repressor) không gắn với operator, enzym RNA polymerase gắn với promoter khởi động phiên mã tạo mRNA của các gen trpE, trpD, trpC, trpB, trpA. Quá trình dịch mã tổng hợp nên acid amin tryptophan, giúp cho vi khuẩn *E. coli* sống được ở môi trường không có tryptophan.



Hình 2.37. Hoạt động của Trp operon khi không có tryptophan.

Môi trường nuôi cấy có tryptophan, tryptophan gắn với protein ức chế R (repressor) tạo thành phức hợp. Phức hợp này thay đổi tính chất gắn chặt với operator gây ức chế phiên mã. Enzym RNA polymerase không nhận biết promoter, các gen cấu trúc trpE, trpD, trpC, trpB, trpA không được phiên mã, không tạo nên các mRNA, tryptophan không được tổng hợp.



Hình 2.38. Hoạt động của Trp operon khi có tryptophan.

3. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen ở *eukaryote*

Bộ gen của các sinh vật *eukaryote* có kích thước rất lớn, cấu trúc phức tạp, DNA được nén chặt trong nhân tế bào ở các nhiễm sắc thể. Bộ gen lớn nhưng chỉ có một phần nhỏ DNA được dịch mã thành các dạng protein. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen của sinh vật *eukaryote* rất phức tạp. Các gen điều hoà thể có kích thước hàng trăm Kb, thường nằm cách xa các promoter.

Các gen cấu trúc hoạt động và biểu hiện tuỳ theo giai đoạn sinh trưởng phát triển và đặc điểm của từng loại tế bào và mô. Cùng một gen ở các tế bào, mô khác nhau có sự hoạt động, biểu hiện khác nhau. Có nhiều cơ chế điều hoà hoạt động và biểu hiện của các gen khác nhau: điều hoà trước phiên mã, điều hoà trong quá trình phiên mã hoặc điều hoà ở giai đoạn dịch mã, điều hoà bằng các trình tự DNA đặc hiệu...

3.1. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen bằng thay đổi cấu trúc DNA và nhiễm sắc thể

Tế bào sinh vật nhân chuẩn có sự sắp xếp trật tự các gen, phù hợp mức độ hoạt động của từng loại gen trong tế bào. Những gen hoạt động mạnh, hoạt động liên tục thường được xếp vào cùng một nhiễm sắc thể, tạo thuận lợi cho tái bản và phiên mã. Ví dụ, ở người có nhiều dạng hemoglobin thay thế nhau trong quá trình phát triển cá thể, phôi 40 ngày tuổi xuất hiện hemoglobin phôi (Hb E), Hb E tồn tại đến hết 3 tháng tuổi. Cuối tháng thứ 2 phôi xuất hiện dạng hemoglobin sơ sinh (Hb F), Hb F tồn tại đến khi sinh nhưng hàm lượng giảm dần, khi phôi 5 - 6 tháng tuổi Hb F chỉ còn 2% - 3%. Sau khi sinh xuất hiện hemoglobin trưởng thành Hb A. Các dạng hemoglobin được kiểm soát bởi locus β- globin, gồm 4 gen cấu trúc riêng rẽ α, γ, δ và β, các gen này được phân bố trong các nhiễm sắc thể khác nhau. Điều hoà quá trình tổng hợp hemoglobin người theo từng giai đoạn phát triển của cơ thể do một cấu trúc đặc biệt, gọi là vùng kiểm soát các locus LCR (Locus Control Region). Cấu trúc LCR chịu trách nhiệm điều hoà hoạt động và biểu hiện các gen của locus β-globin. Cấu trúc LCR có 4 vị trí tiếp nhận các loại protein điều hoà của các gen α, γ,

δ và β. Khi protein điều hoà của gen nào đó được gắn vào LCR làm cho cấu trúc của nhiễm sắc thể thay đổi, promoter tương ứng chuyển ra phía ngoài, thuận lợi cho sự phiên mã và dịch mã tạo nên dạng hemoglobin tương ứng với từng giai đoạn phát triển.

3.2. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen bằng chọn lọc promoter

Trong tế bào *eukaryote* gen mã hoá α - amylase do 2 promoter khác nhau điều khiển. Mỗi promoter chịu trách nhiệm khởi động phiên mã một loại mRNA nhất định đặc trưng cho từng loại mô.

3.3. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen bằng các của protein đặc hiệu

Các protein đặc hiệu (hormon) là các nhân tố tác động vào tế bào đích (tế bào mang thụ thể của hormon). Hormon làm thay đổi hoạt động và biểu hiện của một số gen hoặc nhóm gen tương ứng, thường làm tăng hoạt động gen. Chẳng hạn, hormon estrogen làm tăng phiên mã của gen mã hoá Ovalbumin.

3.4. Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen bằng các yếu tố tăng cường hay bất hoạt

Yếu tố tăng cường hay các trình tự khuếch đại (enhancer), điều khiển làm tăng biểu hiện của gen. Yếu tố tăng cường lần đầu tiên tìm thấy đầu tiên ở virus SV 40 gồm nhiều đoạn 72 bp lặp lại nhiều lần, có khả năng tăng cường độ tái bản và phiên mã của bộ gen virus nhiều lần. Yếu tố tăng cường cũng tìm thấy ở tế bào nấm men, động vật có vú, thực vật có thể làm tăng tốc độ phiên mã của một gen từ 50 - 1000 lần.

Yếu tố bất hoạt (silencer), tìm thấy ở tế bào nấm men đó là đoạn có 262 bp nằm trước hoặc sau gen, gây ngừng quá trình phiên mã.

Điều hoà hoạt động và biểu hiện gen ở *eukaryote* rất phức tạp, có sự tham gia của nhiều loại enzym, nhiều nhân tố tác động, cơ chế của quá trình này còn chưa được hiểu biết đầy đủ.

VI. CẤU TRÚC CỦA BỘ GEN

Bộ gen (genome) là tập hợp tất cả các gen bao gồm cả DNA và RNA trong tế bào, bao gồm các gen nhân (gen nằm trên nhiễm sắc thể) và các gen ngoài nhân (các gen của ti thể, lạp thể và gen trên plasmid...). Bộ gen mang toàn bộ thông tin di truyền đặc trưng của cá thể và của loài.

Bộ gen của virus, bacteriophage và các sinh vật *prokaryote* có cấu trúc đơn giản, chia thành nhiều nhóm tuỳ theo vật chất di truyền là DNA sợi kép, DNA sợi đơn hoặc RNA. Bộ gen của sinh vật *eukaryote* rất lớn, có cấu trúc phức tạp gồm nhiều nhóm DNA khác nhau tập trung trong các cấu trúc đặc biệt là nhiễm sắc thể. Bộ gen của sinh vật *eukaryote* cấu tạo từ các phân tử DNA xoắn kép có cấu trúc phức tạp gồm một số loại DNA đặc trưng.

1. DNA lặp lại

Nhóm DNA lặp lại nhiều chiếm khoảng 8% - 10% tổng lượng DNA của tế bào, thường là các đoạn DNA ngắn dưới 10 bp, mức độ lặp lại có thể tới 10^5 - 10^7 một trình tự DNA nào đó trong một tế bào. DNA lặp lại nhiều nằm quanh tâm động và hai đầu nhiễm sắc thể, không được phiên mã.

Nhóm DNA lặp lại ít chiếm khoảng 20% -25%, thường là các đoạn DNA ngắn khoảng 100 bp, mức độ lặp lại một trình tự nào đó từ 1000 lần đến 100.000 lần. Nhóm này bao gồm các gen chịu trách nhiệm tổng hợp tRNA và rRNA. DNA nhóm này được phiên mã, nhưng không được dịch mã.

Nhóm DNA không lặp lại chiếm khảng 65% - 70%, bao gồm DNA của các gen cấu trúc mã hoá các phân tử protein, DNA này được phiên mã và dịch mã.

Ví dụ, bộ gen người có 64% DNA không lặp lại, 25% DNA lặp lại ít và khoảng 10% DNA lặp lại nhiều; bộ gen của ếch xanh (*green frog*) chỉ có 22% DNA không lặp lại, 67% DNA lặp lại ít và khoảng 9% DNA lặp lại nhiều.

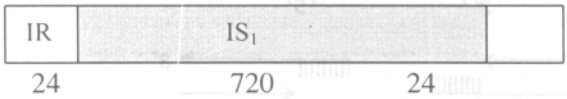
Các đoạn DNA lặp lại có thể chỉ là một trình tự nào đó, hoặc một đoạn cấu trúc của gen được lặp lại. Chẳng hạn, gen mã hoá rRNA lặp lại 450 lần ở ếch

Xenopus levis, 160 - 200 lần ở người, khoảng 3900 lần ở đậu vườn, gen mã hoá histon lặp lại trên 100 lần ở ruồi giấm, lặp lại từ 5 -20 lần trong bộ gen người.

2. Các yếu tố di truyền vận động TGE và gen nhảy

Bộ gen có thể bị biến đổi về cấu trúc hoặc trật tự sắp xếp của DNA do bị đột biến, do các yếu tố di truyền vận động TGE (transposable genetics elements) và các gen nhảy ((Transposon - Tn). TGE được phát hiện lần đầu tiên 1950 bởi Barbara Mc Clinlock khi nghiên cứu các gen chi phối sự hình thành sắc tố đỏ ở hạt ngô (giải Nobel 1983).

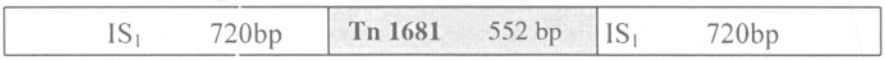
Có nhiều loại TGE khác nhau, loại đơn giản nhất là các đoạn xen IS (insertion sequencer). IS là những đoạn DNA có trình tự đặc hiệu, có thể gắn xen vào một số vị trí nào đó trong gen gây nên sự biến đổi di truyền. Khi các IS tách khỏi các vị trí gắn xen, sự biến đổi di truyền mất đi, bộ gen lại trở lại trạng thái bình thường.



Hình 2.39. Cấu trúc đoạn xen IS_1.

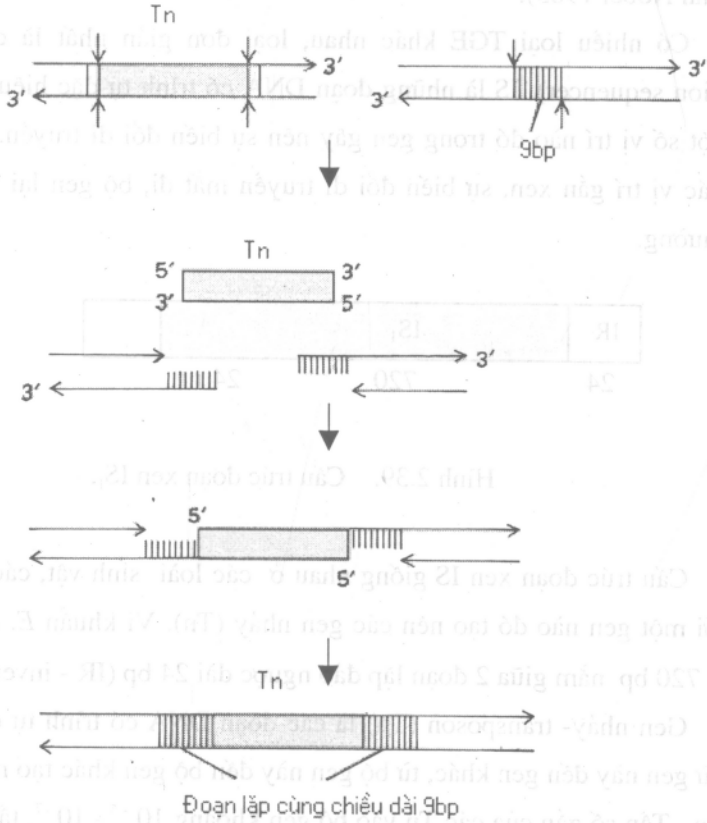
Cấu trúc đoạn xen IS giống nhau ở các loài sinh vật, các đoạn IS thường gắn với một gen nào đó tạo nên các gen nhảy (Tn). Vi khuẩn *E. coli* có đoạn xen IS_1 dài 720 bp nằm giữa 2 đoạn lặp đảo ngược dài 24 bp (IR - inverted repeats).

Gen nhảy- transposon (Tn) là các đoạn DNA có trình tự đặc trưng, có thể nhảy từ gen này đến gen khác, từ bộ gen này đến bộ gen khác tạo nên sự sắp xếp lại các gen. Tần số gắn của các Tn vào bộ gen khoảng 10^{-5} - 10^{-7}, tần số tách ra khỏi bộ gen của Tn là 10^{-6} - 10^{-10}.



Hình 2.40. Sơ đồ gen nhảy Tn 1681 ở *E. coli* .

Các gen nhảy thường gắn với đoạn xen IS tạo thành phức hợp Tn - IS. Phức hợp Tn- IS có thể chuyển vị trí từ đoạn này sang đoạn khác của nhiễm sắc thể, từ nhiễm sắc thể này sang nhiễm sắc thể khác. Ở *E. coli* gen nhảy Tn1681 dài 552 bp, mã hoá protein độc tố gây tiêu chảy và khả năng chịu nhiệt. Gen nhảy Tn1681 nằm giữa hai IS_1 có độ dài 720 bp. Gen nhảy có thể phát hiện qua kiểu hình, có chức năng như các gen. Đoạn xen là các đoạn DNA có cấu trúc giống nhau, không có khả năng tồn tại độc lập, chỉ tồn tại khi gắn với nhiễm sắc thể hoặc plasmid,



Hình 2.41. Sơ đồ gen nhảy (Tn) gắn vào bộ gen.

Một số gen kháng chất kháng sinh ở vi khuẩn là các transposon, có thể nhảy từ plasmid này sang plasmid khác. Các transposon cần đến các đoạn xen IS để di chuyển. Vị trí gắn của gen nhảy vào gen gọi là điểm đích (target sequences). Tại điểm đích có một vết cắt zigzag giống như kiểu cắt DNA của enzyme giới hạn, transposon nhảy vào giữa, hai đầu được gắn lại theo nguyên tắc bổ sung. Kết quả ở hai đầu của transposon tạo nên 2 đoạn lặp cùng chiều (direct repeats), các đoạn lặp cùng chiều giúp cho bộ gen trở lại trạng thái bình thường ban đầu khi gen nhảy tách khỏi vị trí gắn xen trên bộ gen.

3. Sự phân hoá các gen trong bộ gen của *eukaryote*

Mỗi loại tế bào, mỗi tổ chức của cơ thể có chức năng khác nhau do hoạt động và biểu hiện gen khác nhau. Hoạt động của các gen có tính đặc trưng, di truyền và ổn định là do có sự biệt hoá các gen. Cùng một gen giống nhau ở các tế bào khác nhau trong cơ thể, có chức năng và hoạt động khác nhau do sự biệt hoá của các gen. Hoạt động và biểu hiện của các gen khác nhau tuỳ theo giai đoạn phát triển của cơ thể, loại mô trong cơ thể, điều kiện sinh lý. Ví dụ, phôi gà có hai gen globin hoạt động khác nhau theo giai đoạn phát triển, gen β_1 globin hoạt động phiên mã ở giai đoạn phôi 5 ngày tuổi, gen β_2 globin hoạt động phiên mã ở giai đoạn phôi 14 ngày tuổi.

Mỗi tổ chức hoặc tế bào được biệt hoá đều có sản phẩm protein đặc trưng riêng, biểu thị mức biểu hiện khác nhau của các gen, tế bào hồng cầu có hemoglobin, tế bào tuỵ có protease, tế bào não có neuropeptit...

Chương 3

DI TRUYỀN VI SINH VẬT

Vi sinh vật là tên gọi chung chỉ các sinh vật nhỏ bé, có cấu tạo và đặc điểm hình thái thấy rõ khi quan sát dưới kính hiển vi. Vi sinh vật bao gồm các nhóm: virus là những thể sống chưa có cấu tạo tế bào, *prokaryote* - vi khuẩn, xạ khuẩn và vi nấm là dạng sinh vật trung gian giữa *prokaryote* và *eukaryote*. Nấm men đại diện của *eukaryote*, vi tảo, động vật nguyên sinh do có kích thước nhỏ, được xếp chung vào nhóm vi sinh vật. Chương 3 nghiên cứu đặc điểm cấu trúc bộ gen, cơ chế chuyển vật chất di truyền của virus, vi khuẩn và vi nấm.

A. DI TRUYỀN HỌC VIRUS

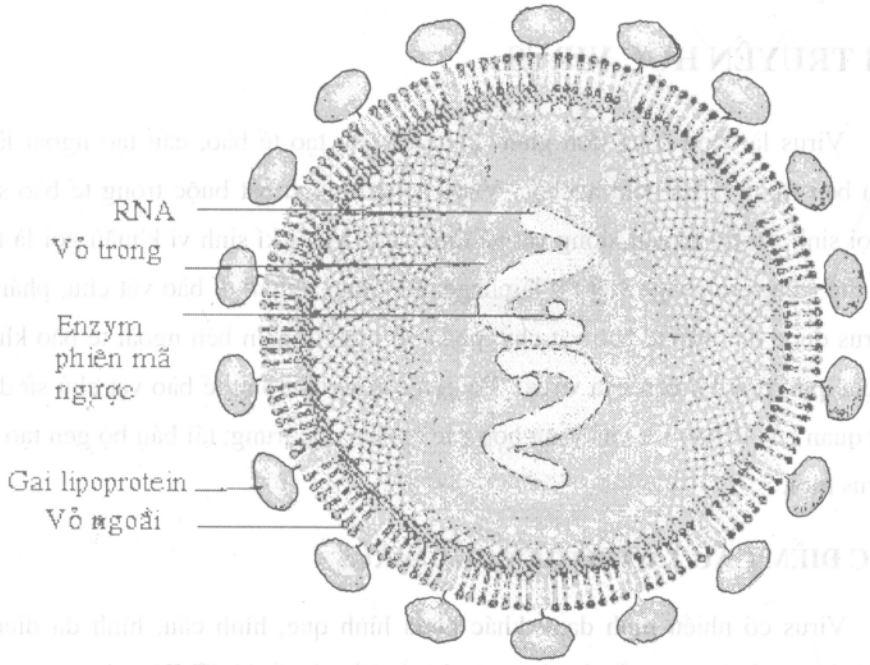
Virus là dạng sống đơn giản chưa có cấu tạo tế bào, cấu tạo ngoài là vỏ protein bên trong là lõi acid nucleic. Virus sống kí sinh bắt buộc trong tế bào sống của mọi sinh vật (vi khuẩn, động vật và thực vật). Virus kí sinh vi khuẩn gọi là thực khuẩn thể - bacteriophage viết tắt là phage. Khi xâm nhiễm tế bào vật chủ, phần lõi của virus được đưa vào tế bào vật chủ, phần vỏ protein nằm bên ngoài tế bào không tham gia quá trình tái bản của virus. Bộ gen của virus trong tế bào vật chủ sử dụng các cơ quan của tế bào vật chủ tổng hợp các enzym đặc trưng, tái bản bộ gen tạo nên các virus mới.

I. ĐẶC ĐIỂM CẤU TẠO BỘ GEN CỦA VIRUS

Virus có nhiều hình dạng khác nhau hình que, hình cầu, hình đa diện ... Dạng hình que thường gặp ở các virus gây bệnh đốm thuốc lá (TMV), virus gây xoăn lá khoai tây, cà chua... Adenovirus có hình đa diện nhiều mặt, virus kí sinh vi khuẩn

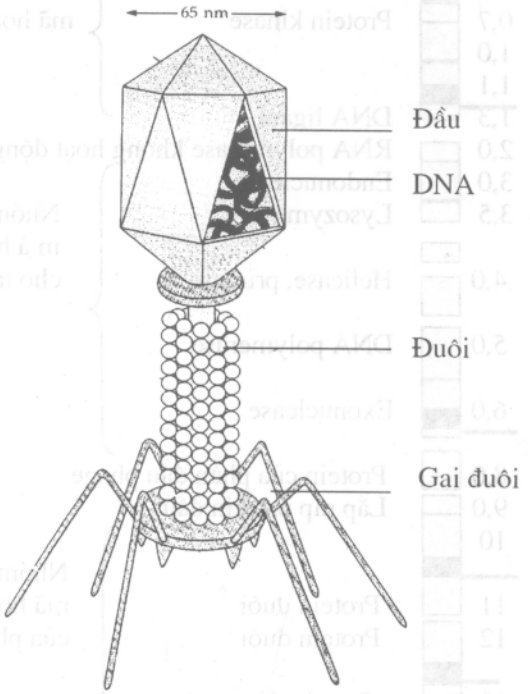
có phần đầu hình đa diện nhiều mặt, phần đuôi hình trụ. Kích thước virus rất khác nhau, virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV) hình cầu đường kính 28nm, virus gây bệnh viêm gan B ở người (HBV) đường kính 42nm...

Phần vỏ virus (capsid) cấu tạo bởi các capsom, mỗi capsom do một số phân tử protein tạo nên. Các virus khác nhau có số lượng capsom khác nhau, virus đốm thuốc lá (TMV) có vỏ capsid gồm hơn 1000 capsom tạo thành dạng hình que. Phần vỏ virus là nhân tố kích thích các tế bào bị xâm nhiễm sản sinh các kháng thể, chống lại sự xâm nhiễm của virus. Virus có thể có nhiều lớp vỏ khác nhau. Bên trong vỏ capsid có vỏ trong, bên ngoài có vỏ lipoprotein. Các virus khác nhau có hệ thống gen mã hoá protein vỏ virus khác nhau, virus lở mồm long móng (FMDV) có 3 gen vp_1, vp_2, vp_3 mã hoá 3 dạng protein vỏ khác nhau. Hiểu biết về cấu trúc phần vỏ virus, các gen mã hoá protein vỏ virus là cơ sở để sản xuất các vaccin bằng kỹ thuật gen như vaccin chống bệnh lở mồm long móng ở gia súc, vaccin viêm gan B và nhiều vaccin khác được sản xuất nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp.



Hình 3.1. Cấu trúc virus HIV.

Phần lõi của virus cấu tạo từ DNA hoặc RNA. Virus DNA gồm virus DNA mạch kép như virus dại, virus đậu mùa, virus *Herpes*, virus *Papilla* gây ung thư phổi, ung thư tử cung, phage T_4... và virus DNA mạch đơn như phage ϕX 174, phage M_{13}..

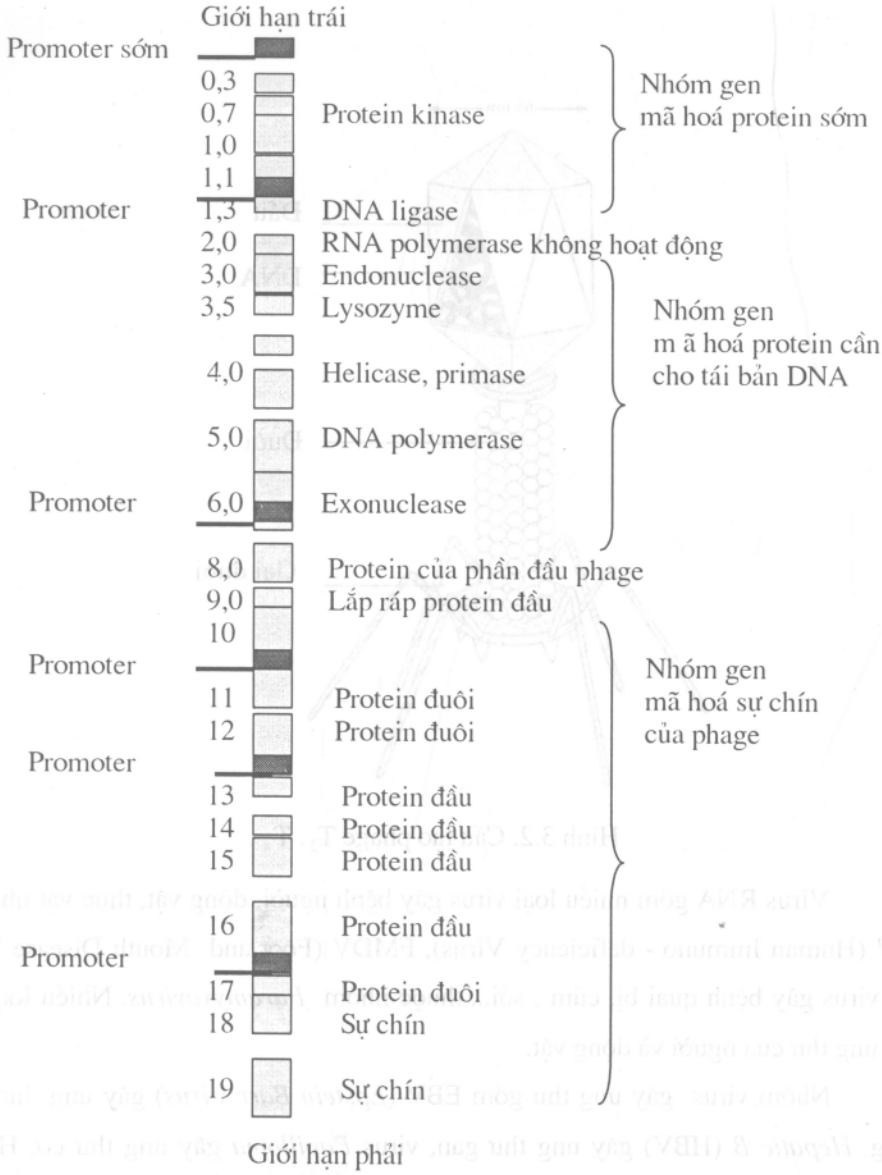


Hình 3.2. Cấu tạo phage T_2, T_4.

Virus RNA gồm nhiều loại virus gây bệnh người, động vật, thực vật như virus HIV (Human Immuno - deficiency Virus), FMDV (Foot and Mouth Disease Virus), các virus gây bệnh quai bị, cúm , sởi....thuộc nhóm *Paramyxovirus*. Nhiều loại virus gây ung thư của người và động vật.

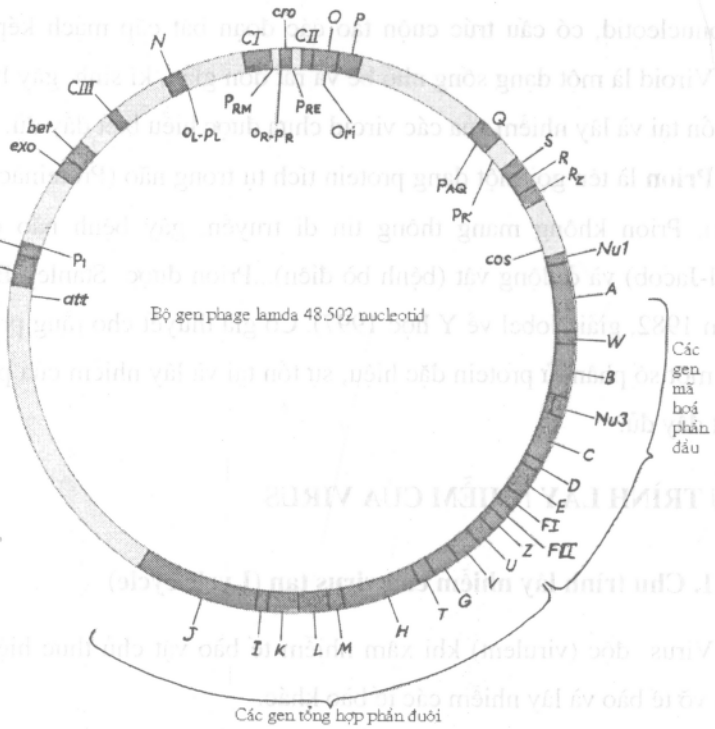
Nhóm virus gây ung thư gồm EBV (*Epstein Barr Virus*) gây ung thư vòm họng, *Hepatic B* (HBV) gây ung thư gan, virus *Papilloma* gây ung thư cơ, HTLV (*Human T cell Lymph tropic Virus*) gây ung thư máu, ngoài ra ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư giáp trạng có thể do virus gây nên. Virus gây ung thư có bốn nhóm

gen gồm gen gag tạo kháng nguyên đặc hiệu, gen pol tạo enzym phiên mã ngược, gen env tạo vỏ protein và gen oncogen (src, ras) gây các khối u (sarcoma).



Hình 3.3. Sơ đồ bộ gen của phage T_7.

Bộ gen phage T_7 là phân tử DNA xoắn kép gồm 39.936 cặp base, các gen của phage T_7 gồm 7 promoter chia làm ba nhóm gen: mã hoá protein sớm, protein trung bình và protein muộn. Protein sớm được tổng hợp 4 - 8 phút sau khi phage xâm nhiễm vào tế bào, protein trung bình được tổng hợp sau 6 phút phage xâm nhiễm vào tế bào, protein muộn được tổng hợp khoảng 6 phút trước khi tế bào bị phage phân giải. Protein muộn là protein tạo cấu trúc vỏ virus và các enzym cho sự lắp ráp virus, protein trung bình tạo các enzym cho sự tái bản gen virus còn protein sớm tạo enzym phiên mã ngược và các enzym hoạt hoá phiên mã.



Hình 3.4. Bộ gen của phage λ dạng vòng.

Bộ gen của phage λ có kích thước 48502 bp chia làm bốn nhóm gen: nhóm gen mã hoá các enzym của chu trình sinh tan hoặc gây độc, nhóm gen tái bản DNA,

nhóm gen mã hoá các thành phần cấu tạo của đầu và nhóm gen chịu trách nhiệm tổng hợp các thành phần cấu tạo của phần đuôi.

Phage T_4 gồm 160 gen ở dạng mạch thẳng, có 120 gen đã rõ chức năng. Các gen của phage T_4 mã hoá khoảng 20 loại protein khác nhau, gồm protein sớm và protein trung bình là các dạng enzym giúp cho tái bản DNA phage, protein muộn tham gia cấu tạo vỏ của phần đầu và phần đuôi của phage. Các phần đầu và đuôi của phage T_4 được hình thành ở các vị trí khác nhau trong tế bào chủ, DNA của phage được đóng gói trong phần đầu, sau đó gắn với đuôi tạo thành các virion.

Viroid cấu tạo từ các phân tử RNA mạch đơn trần, kích thước khoảng 250 - 350 ribonucleotid, có cấu trúc cuộn tạo các đoạn bắt cặp mạch kép, không có vỏ protein. Viroid là một dạng sống nhỏ bé và rất đơn giản, kí sinh, gây bệnh ở thực vật. Cơ chế tồn tại và lây nhiễm của các viroid chưa được hiểu biết đầy đủ.

Prion là tên gọi một dạng protein tích tụ trong não (Proteinaceous infectious particles). Prion không mang thông tin di truyền, gây bệnh não ở người (Bệnh Certified-Jacob) và ở động vật (bệnh bò điên)...Prion được Stanley B. Prusiner phát hiện năm 1982, giải Nobel về Y học 1997). Có giả thuyết cho rằng prion do sự tự tái bản của một số phân tử protein đặc hiệu, sự tồn tại và lây nhiễm của prion chưa được hiểu biết đầy đủ.

II. CHU TRÌNH LÂY NHIỄM CỦA VIRUS

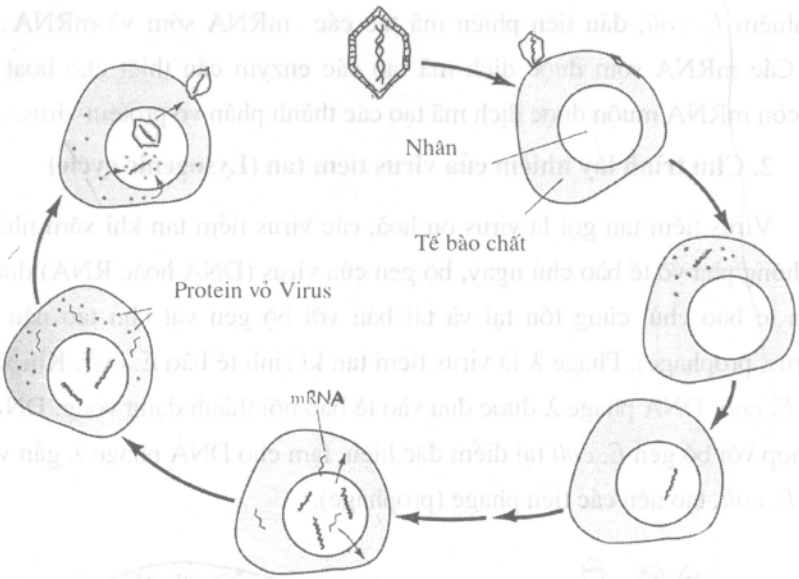
1. Chu trình lây nhiễm của virus tan (Lyric cycle)

Virus độc (virulent) khi xâm nhiễm tế bào vật chủ thực hiện quá trình tái bản, phá vỡ tế bào và lây nhiễm các tế bào khác.

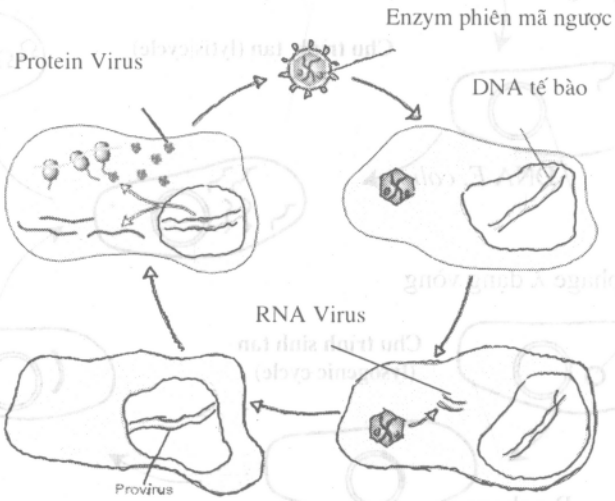
Virus độc xâm nhiễm tế bào, phần lõi acid nucleic của virus được đưa vào trong tế bào, phần vỏ protein nằm ngoài tế bào. Bộ gen virus sử dụng hệ enzym và các bào quan của tế bào chủ tổng hợp các thành phần của virus.

Các gen mã hoá protein enzym, protein vỏ virus được dịch mã nhờ ribosom của tế bào chủ, các thành phần vỏ virus hình thành trong tế bào chất của tế bào chủ.

Phần lõi DNA hoặc RNA virus tái bản trong nhân tế bào chủ nhờ các enzym virus. Sự lắp ghép vỏ protein với lõi acid nucleic thành các hạt virus gọi là virion.



Hình 3.5. Sơ đồ xâm nhiễm của *Adenovirus*.

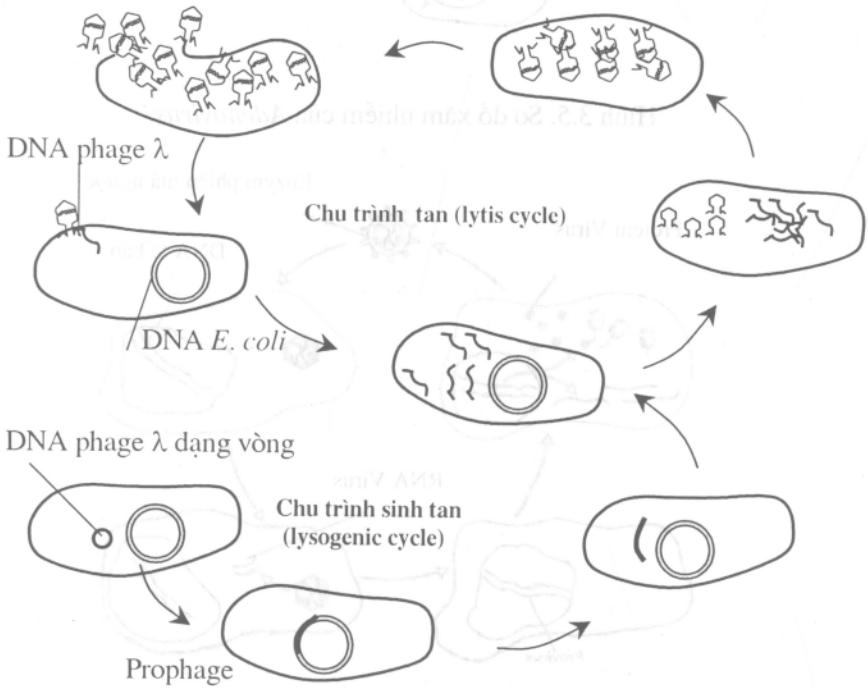


Hình 3.6. Sơ đồ lây nhiễm của *Retrovirus*.

Enzym lysozyme của virus phá vỡ tế bào vật chủ giải phóng virus, các virus tiếp tục xâm nhiễm các tế bào khác. Thời gian virus xâm nhiễm tế bào, đến khi virus phá vỡ tế bào chủi ra ngoài từ 10 - 30 phút tuỳ loại virus, và tế bào chủ. Khi phage T_4 xâm nhiễm *E. coli*, đầu tiên phiên mã tạo các mRNA sớm và mRNA muộn của virus. Các mRNA sớm được dịch mã tạo các enzym cần thiết cho hoạt động của virus, còn mRNA muộn được dịch mã tạo các thành phần vỏ protein virus.

2. Chu trình lây nhiễm của virus tiềm tan (Lysogenic cycle)

Virus tiềm tan gọi là virus ôn hoà, các virus tiềm tan khi xâm nhiễm tế bào chủ không phá vỡ tế bào chủ ngay, bộ gen của virus (DNA hoặc RNA) được gắn với bộ gen tế bào chủ, cùng tồn tại và tái bản với bộ gen vật chủ tạo nên tiền virus (provirus, prophage). Phage λ là virus tiềm tan kí sinh tế bào *E. coli*. Khi xâm nhiễm tế bào *E. coli*, DNA phage λ được đưa vào tế bào nối thành dạng vòng. DNA phage λ tái tổ hợp với bộ gen *E. coli* tại điểm đặc hiệu, làm cho DNA phage λ gắn vào bộ gen tế bào *E. coli*, tạo nên các tiền phage (prophage).



Hình 3.7. Sơ đồ lây nhiễm của phage λ.

Tế bào *E. coli* chứa prophage gọi là tế bào tiềm tan. Prophage tồn tại và tái bản cùng với sự tái bản của bộ gen vi khuẩn, phần lớn các gen của prophage không hoạt động, trừ một số ít gen mã hoá các enzym ức chế giữ cho bộ gen phage λ gắn với bộ gen *E. coli*.

Thời gian tồn tại của bộ gen virus trong tế bào chủ khác nhau tuỳ loại virus, điều kiện môi trường và giai đoạn phát triển của tế bào chủ. Trong một điều kiện nào đó (có thể là tia UV, nhiệt độ cao, hoá chất độc...) bộ gen của virus tách ra khỏi bộ gen tế bào chủ, thực hiện quá trình tái bản bộ gen virus, phiên mã và dịch mã tổng hợp các thành phần vỏ protein và lắp ghép thành các hạt virion, sau một thời gian ngắn chuyển thành virus độc phá vỡ tế bào, tiếp tục xâm nhiễm các tế bào khác.

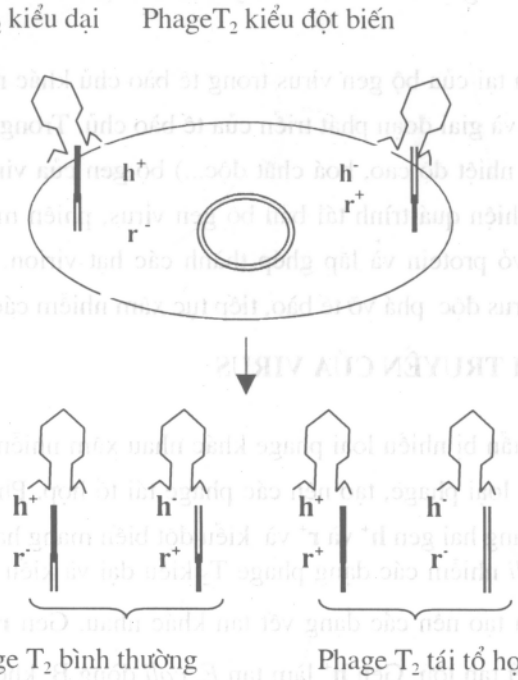
III. TÁI TỔ HỢP DI TRUYỀN CỦA VIRUS

Tế bào vi khuẩn bị nhiều loại phage khác nhau xâm nhiễm, có thể xảy ra tái tổ hợp DNA giữa các loại phage, tạo nên các phage tái tổ hợp. Phage T_2 có kiểu dại (kiểu bình thường) mang hai gen $\mathbf{h^+}$ và $\mathbf{r^+}$ và kiểu đột biến mang hai gen $\mathbf{h^-}$ và $\mathbf{r^-}$.

Tế bào *E. coli* nhiễm các dạng phage T_2 kiểu dại và kiểu đột biến, nuôi cấy trên môi trường thạch tạo nên các dạng vết tan khác nhau. Gen $\mathbf{r^+}$ tạo vết tan nhỏ, gen đột biến $\mathbf{r^-}$ tạo vết tan lớn. Gen $\mathbf{h^+}$ làm tan *E. coli* dòng B không làm tan *E. coli* dòng B_2 và tạo các vết tan mờ, gen đột biến $\mathbf{h^-}$ gây tan tế bào cả hai dòng *E. coli* B và B_2 và tạo các vết tan trong. Các tế bào *E. coli* bị nhiễm phage T_2 kiểu dại ($\mathbf{r^+ h^+}$) tạo vết tan nhỏ, mờ. Các tế bào *E. coli* bị nhiễm phage T_2 kiểu đột biến ($\mathbf{r^- h^-}$) tạo vết tan lớn, trong.

Tiến hành thực nghiệm gây nhiễm tế bào vi khuẩn *E. coli* cả hai loại phage T_2 kiểu dại và T_2 kiểu đột biến. Nuôi cấy các tế bào *E. coli* đã nhiễm phage T_2 một thời gian trong môi trường dinh dưỡng dạng lỏng, rồi chuyển sang nuôi trên môi trường thạch. Trên thảm vi khuẩn phát triển phát hiện bốn dạng vết tan, vết tan nhỏ - mờ, vết tan lớn - mờ, vết tan nhỏ - trong và vết tan lớn - trong. Do tái tổ hợp di truyền giữa bộ gen phage T_2 kiểu dại và phage T_2 kiểu đột biến, tạo nên hai chủng phage T_2 tái tổ hợp $\mathbf{r^- h^+}$ và $\mathbf{r^+ h^-}$ và hai chủng ban đầu $\mathbf{r^+ h^+}$ và $\mathbf{h^- r^-}$. Tái tổ hợp giữa bộ gen

phage T_2 kiểu dại và phage T_2 kiểu đột biến xảy ra ngẫu nhiên, với tần số tái tổ hợp rất thấp.



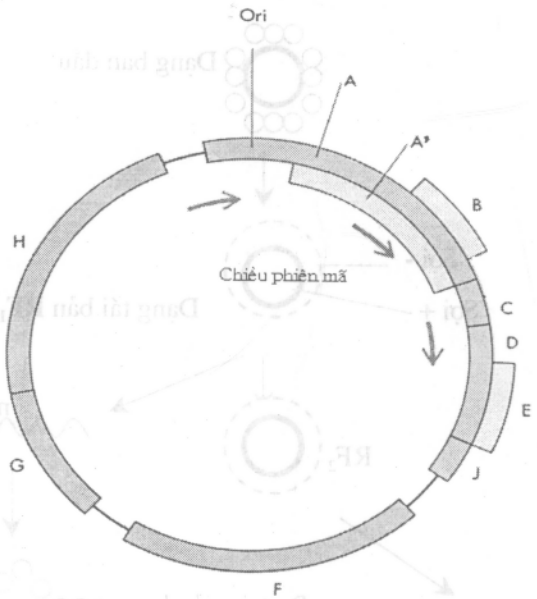
Hình 3.8. Tái tổ hợp của phage T_2 .

IV. TÁI BẢN VẬT CHẤT DI TRUYỀN CỦA VIRUS

1. Tái bản vật chất di truyền của virus DNA

1.1. Tái bản vật chất di truyền của virus DNA xoắn kép

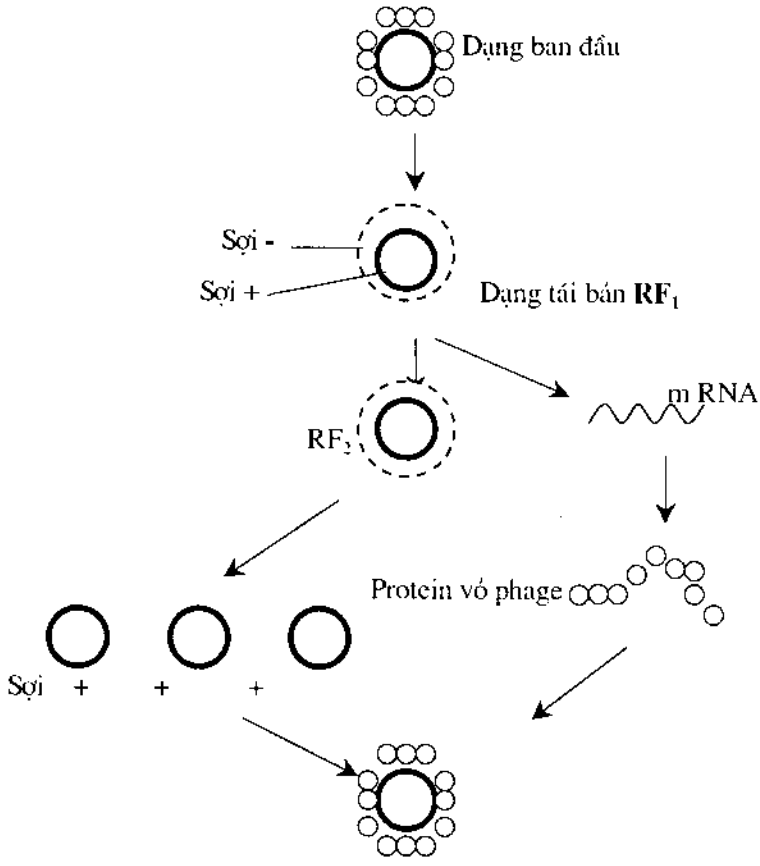
Nhiều loại virus và phage có bộ gen là một phân tử DNA xoắn kép như virus đậu mùa, virus dại, phage T_4, T_7, phage λ... Bộ gen của các loại virus và phage thuộc nhóm này tái bản DNA theo cơ chế bán bảo thủ, kiểu Okazaki.



Hình 3.9. Sơ đồ vị trí sắp xếp các gen trong bộ gen phage φ X174.

1.2. Tái bản vật chất di truyền của virus DNA mạch đơn

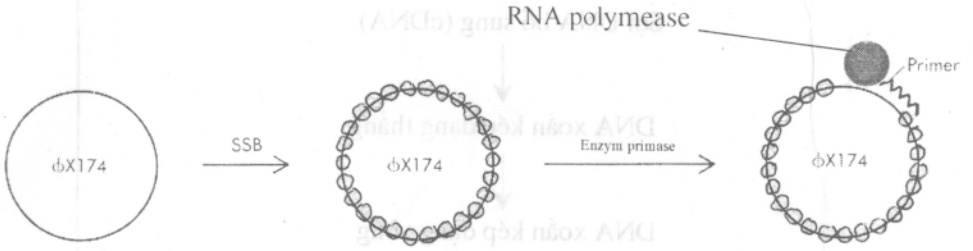
Phage φ X 174 kí sinh trên *E. coli* có cấu tạo phần vỏ protein hình đa diện 20 mặt, phần lõi là phân tử DNA một sợi đơn dạng vòng gồm 5386 nucleotid. Bộ gen phage φ X 174 mang 9 gen. Khung đọc mã khác nhau, tạo các gen có vị trí trùm lên nhau: gen B ít hơn gen A 85 nucleotid nằm gọn nằm trong gen A, gen E nằm trong gen D. Các gen A, B, C và D chỉ huy tái bản DNA của phage, gen E mã hoá tổng hợp enzym lysozyme làm tan tế bào vi khuẩn. Các gen J, F, G và gen H mã hoá các protein cấu tạo vỏ phage. Giữa gen A và gen H là gen đệm gồm 66 nucleotid. Giữa gen F và gen J là gen đệm dài 39 nucleotid, giữa gen F và gen G là gen đệm dài 111 nucleotid.



Hình 3. 10. Các bước tái bản gen của phage φ X 174.

Sau khi xâm nhiễm tế bào *E. coli*, DNA của phage φ X 174 đưa vào tế bào vi khuẩn dạng sợi đơn thẳng gọi là sợi dương (+). Sợi dương phiên mã tạo mRNA của virus, quá trình dịch mã tạo nên protein sớm là các enzym của virus. Sau đó nhờ các "đầu dính" nối thành vòng kín, được sử dụng làm khuôn tổng hợp một sợi đơn mới theo nguyên lí Chargaff gọi là sợi âm (-) tạo nên vòng DNA kép gọi là dạng tái bản RF_1 (RF_1 - Replicating Form). Dạng tái bản RF_1 sử dụng hệ enzym virus và các bào quan của tế bào *E. coli* tái bản tạo nên hàng loạt dạng tái bản RF_2.

Các RF_2 tái bản tạo các đoạn DNA của phage mạch thẳng. Vỏ protein lắp ráp với lõi DNA tạo nên các phage mới phá vỡ tế bào, tiếp tục xâm nhiễm các tế bào khác.



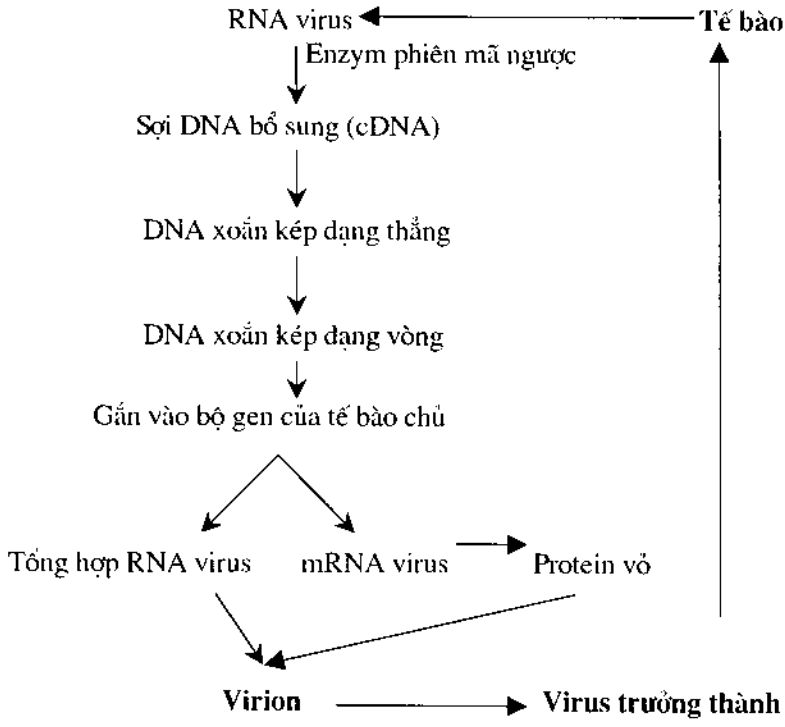
Hình 3. 11. Sơ đồ tái bản gen của phage φ X 174.

2. Tái bản vật chất di truyền của virus RNA

Phần lớn virus gây bệnh thực vật như virus đốm thuốc lá, xoăn lá khoai tây, xoăn lá cà chua, và các virus khác như HIV, FMDV, *retrovirus*....có bộ gen RNA. Sau khi xâm nhiễm RNA của virus được đưa vào tế bào chủ.

Virus sử dụng hệ thống enzym phiên mã ngược tổng hợp một mạch đơn cDNA, sau đó tạo thành cDNA xoắn kép của virus. Phân tử cDNA virus có thể tái tổ hợp với bộ gen tế bào chủ và gắn vào bộ gen tế bào chủ tạo nên các tiền virus (provirus). Tế bào chủ phân chia, tạo nên vô số provirus. Khi gặp một điều kiện bất lợi, provirus tách ra khỏi bộ gen tế bào chủ thực hiện quá trình tái bản RNA, tổng hợp protein vỏ và lắp ghép các thành phần của virus tạo thành các virion. Sau một thời gian ngắn virion chuyển thành virus trưởng thành, phá vỡ tế bào tiếp tục xâm nhiễm các tế bào mới.

Thời gian provirus tồn tại cùng với bộ gen tế bào chủ là thời gian ủ bệnh. Tuỳ từng loại virus và sức đề kháng của cơ thể bị virus xâm nhiễm, thời gian tồn tại của provirus trong các tế bào khác nhau.



Hình 3.12. Sơ đồ xâm nhiễm và tái bản của virus RNA.

HIV (Human Immuno - deficiency Virus) chứa phân tử RNA gồm 9749 ribonucleotid. HIV xâm nhiễm chủ yếu các tế bào bạch cầu Lympho T_4. Virus HIV gây chết các tế bào miễn dịch, tế bào màng ruột, tế bào tuỷ xương dẫn đến hội chứng suy giảm miễn dịch.

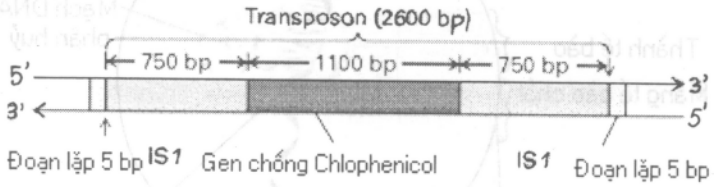
B. DI TRUYỀN HỌC VI KHUẨN

I. ĐẶC ĐIỂM CẤU TẠO BỘ GEN VI KHUẨN

Vi khuẩn (*Bacteria*) thuộc nhóm *prokaryote*, chưa có màng nhân phân biệt nhân với tế bào chất. Bộ gen của vi khuẩn là một phân tử DNA trần, xoắn kép, dạng vòng. Kích thước bộ gen có độ lớn khác nhau đặc trưng cho từng loài như: vi khuẩn

E. coli bộ gen gồm 4,7 x 10^6 bp, vi khuẩn lao *Mycobacterium* 3, 2 x 10^6 bp. Trong cùng một họ, các loài vi khuẩn khác nhau có cấu trúc và tỷ lệ G - C khác nhau. Ví dụ, trong họ *Mycobacterium* loài *M. leprae* có G - C chiếm 58%, loài *M. tuberculosis* tỷ lệ G - C 65 %.

Vi khuẩn có các đoạn xen IS và gen nhảy (Tn), các gen nhảy có thể nằm trên DNA genom hoặc trên các plasmid. Vi khuẩn lao *M. tuberculosis* có 3 đoạn xen IS là IS 6110, IS 1081 và IS myco có kích thước khoảng 968 đến 1381 bp. Vi khuẩn *E. coli* có gen nhảy Tn 9 dài 1100 bp, mang gen kháng chloramphenicol, Tn 1681 mang gen sinh độc tố gây bệnh tiêu chảy...



Hình 3.13. Gen nhảy Tn 9 ở vi khuẩn *E. coli*.

Ngoài các gen nằm trong nhân tế bào, vi khuẩn có một số gen nằm trên plasmid, ti thể và lạp thể. Plasmid của vi khuẩn rất đa dạng, mang các gen đặc trưng khác nhau tạo nên các dạng plasmid khác nhau như plasmid giới tính, plasmid độc tố, plasmid sinh kháng sinh, plasmid kháng chất kháng sinh ...

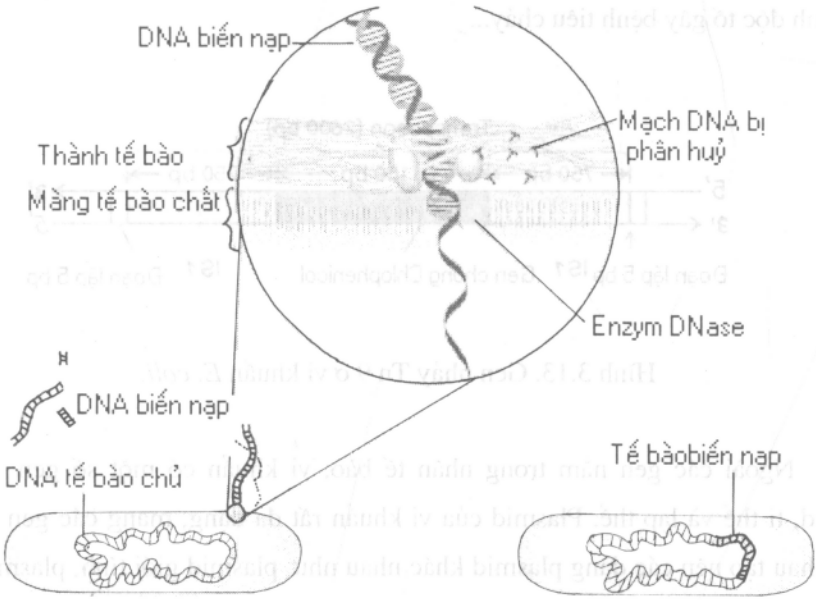
Vi khuẩn có ba phương thức chuyển vật chất di truyền chủ yếu là biến nạp, tải nạp và giao nạp.

II. BIẾN NẠP (TRANSFORMATION)

Biến nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền trực tiếp từ tế bào thể cho D (Donor) sang tế bào thể nhận R (Reception), không cần sự tiếp xúc giữa hai tế bào hoặc có nhân tố trung gian là phage hoặc virus.

1. Thí nghiệm biến nạp ở vi khuẩn *Staphylococcus pneumoniae*

Năm 1928, Frederick Griffith tiến hành thí nghiệm với chủng vi khuẩn gây bệnh viêm phổi, viêm màng não (*Staphylococcus pneumoniae*). *S. pneumoniae* có hai chủng khác nhau. Chủng S có vỏ nhầy chứa độc tố, trên môi trường thạch tạo các khuẩn lạc ướt, bóng (S - Smooth). Chủng R không có vỏ nhầy, không có độc tố trên môi trường thạch tạo khuẩn lạc khô, sù sì (R - Rough).



Hình 3.14. Cơ chế biến nạp .

Tiêm vi khuẩn *S. pneumoniae* chủng S vào chuột làm chuột bị chết, tiêm chủng R chuột vẫn sống; khi đun nóng chủng S rồi tiêm, chuột vẫn sống. Trộn chủng S đã đun nóng với chủng R còn sống tiêm vào chuột làm chuột bị chết. Lấy máu chuột chết, đem phân tích thấy có hai loại vi khuẩn R và S còn sống. Thí nghiệm chứng tỏ đã có một yếu tố từ vi khuẩn chủng S đã chết được chuyển sang vi khuẩn

chủng R sống, tạo nên các tế bào chủng R mang gen hình thành vỏ nhầy, có khả năng hình thành vỏ nhầy, có độc tố gây bệnh làm chuột bị chết, yếu tố này gọi là nhân tố biến nạp. Năm 1944 Avery và McLeod chứng minh nhân biến nạp là DNA.

Biến nạp ở vi khuẩn *S. pneumoniae* là biến nạp tự nhiên, rất ít xảy ra, tần số biến nạp tự nhiên rất thấp. Hiểu biết cơ chế biến nạp, người ta chủ động tạo biến nạp nhân tạo. Sử dụng sốc nhiệt, xung điện, súng bắn gen... gây biến nạp nhân tạo được ứng dụng rộng rãi trong chuyển gen ở động vật, thực vật và vi sinh vật.

Trên bộ gen của tế bào vi khuẩn có một số điểm đặc hiệu cho gắn các DNA lạ (DNA biến nạp) gọi là điểm hấp thụ (uptake site). Số lượng điểm hấp thụ khác nhau ở các tế bào thuộc các loài khác nhau. Vi khuẩn *S. pneumoniae* có 30 - 80 điểm hấp phụ, vi khuẩn *Hemophilus influenzae* có khoảng 600 điểm hấp phụ đối với DNA của vi khuẩn cùng loài và 4 - 8 điểm hấp phụ đối với các DNA khác loài.

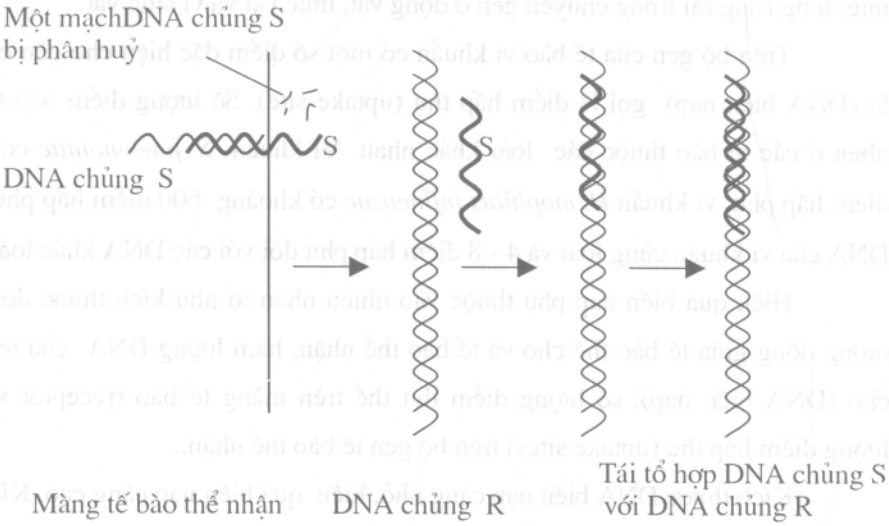
Hiệu quả biến nạp phụ thuộc vào nhiều nhân tố như kích thước đoạn DNA tương đồng giữa tế bào thể cho và tế bào thể nhận, hàm lượng DNA của tế bào thể cho (DNA biến nạp), số lượng điểm thụ thể trên màng tế bào (receptor sites), số lượng điểm hấp thụ (uptake sites) trên bộ gen tế bào thể nhận...

Kích thước DNA biến nạp càng nhỏ, hiệu quả biến nạp càng cao. Kích thước DNA biến nạp thích hợp cho các tế bào vi khuẩn bằng khoảng 1/200 kích thước bộ gen vi khuẩn. Hiệu quả biến nạp phụ thuộc vào số lượng số lượng điểm hấp phụ, nồng độ DNA biến nạp, và mức độ tương đồng giữa DNA biến nạp với DNA tế bào nhận. Số lượng tế bào được biến nạp lúc đầu tăng tỷ lệ thuận với nồng độ, kích thước thích hợp của DNA biến nạp và số lượng điểm thụ thể trên màng tế bào, sau đó giảm dần.

2. Cơ chế biến nạp

Biến nạp ở vi khuẩn gồm ba giai đoạn: xâm nhập của DNA biến nạp vào tế bào thể nhận, bắt cặp các đoạn tương đồng giữa DNA biến nạp và DNA thể nhận, tái bản DNA biến nạp trong tế bào nhận. DNA biến nạp có kích thước thích hợp, có thể qua màng vào trong tế bào tại những điểm thụ thể trên màng tế bào nhận.

Trong tế bào nhận một mạch DNA biến nạp bị phân huỷ bởi các enzym nuclease của tế bào tạo thành các nucleotid tự do. Mạch DNA biến nạp còn lại bắt cặp với các đoạn tương đồng của bộ gen tế bào nhận, quá trình tái tổ hợp giữa mạch đơn DNA biến nạp với DNA của bộ gen tế bào được thực hiện, làm cho mạch đơn DNA biến nạp gắn với bộ gen tế bào chủ ở đoạn tương đồng.



Hình 3.15. Sơ đồ cơ chế biến nạp ở vi khuẩn *S. pneumoniae*.

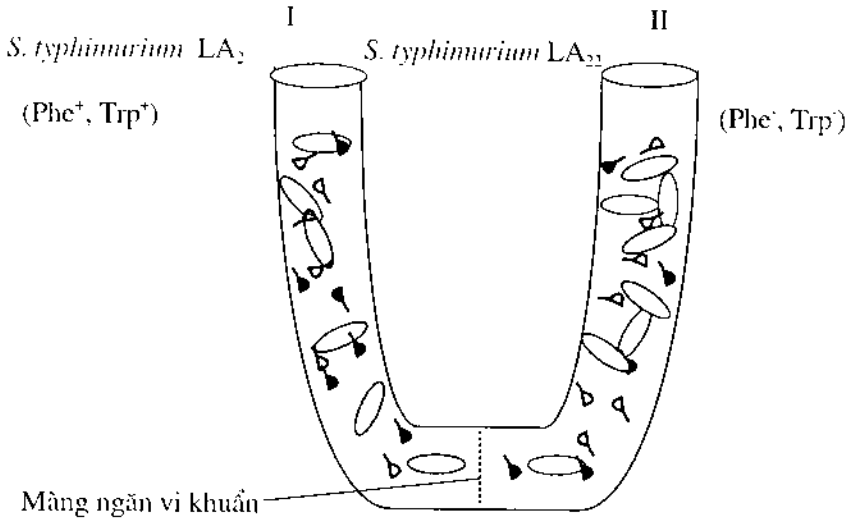
Khi tế bào phân chia, bộ gen tế bào và đoạn DNA biến nạp được tái bản, làm cho tế bào nhận có các đặc điểm mới do gen của đoạn DNA biến nạp mã hoá.

III. TẢI NẠP (TRANSDUCTION)

Tải nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền từ thể cho (D) sang thể nhận I qua nhân tố trung gian là virus, gồm hai loại tải nạp là tải nạp chung và tải nạp đặc hiệu.

1. Tải nạp chung

Năm 1952, M. Zinder và J. Lederberg tiến hành thí nghiệm với vi khuẩn *Salmonella typhimurium*.



Hình 3.16. Sơ đồ thí nghiệm Lederberg và Zinder.

Trong ống thuỷ tinh hình chữ U có màng ngăn vi khuẩn (vi khuẩn không chui qua được). Nhánh thứ nhất nuôi chủng *S. typhimurium* LA2 bình thường (Phe^+, Trp^+), có khả năng tổng hợp acid amin phenylalanin và tryptophan. Nhánh thứ hai nuôi chủng đột biến LA22, không có khả năng tổng hợp acid amin phenylalanin và tryptophan (Phe^-, Trp^-). Sau một thời gian nuôi cấy chung, lấy một ít dịch nuôi cấy ở nhánh nuôi chủng đột biến LA22, đem nuôi cấy ở môi trường tối thiểu (không có tryptophan). Có một số tế bào phát triển được ở môi trường tối thiểu, như vậy đã có các tế bào LA22 (Phe^-, Trp^-) biến thành LA2 (Phe^+, Trp^+). Kiểm tra dịch nuôi cấy ở ống thủy tinh hình chữ U có phage P_1, chứng tỏ phage P_1 đã làm chuyển các gen mã hoá tổng hợp phenylalanin và tryptophan từ chủng LA2 sang LA22.

Đầu tiên, có sự tái tổ hợp di truyền giữa bộ gen phage P_1 với bộ gen vi khuẩn *Salmonella typhimurium* chủng LA2, có khả năng tổng hợp phenylalanin và tryptophan tạo nên các phage P_1 tái tổ hợp mang gen mã hoá khả năng tổng hợp phenylalanin và tryptophan. Phage P_1 tái tổ hợp chui qua màng lọc vi khuẩn xâm nhiễm vào tế bào *Salmonella typhimurium* chủng LA22. Tái tổ hợp lần thứ 2 làm cho gen mã hoá tổng hợp phenylalanin và tryptophan được chuyển từ LA2 (Phe^+, Trp^+) sang LA22 (Phe^-, Trp^-), làm cho chủng LA22 có gen Phe^+, Trp^+ có thể phát triển được ở môi trường tối thiểu không có phenylalanin và tryptophan. Hiện tượng virus (hoặc) phage có thể chuyển một gen bất kì từ tế bào thể cho (D) sang tế bào thể nhận (R) gọi là tải nạp chung.

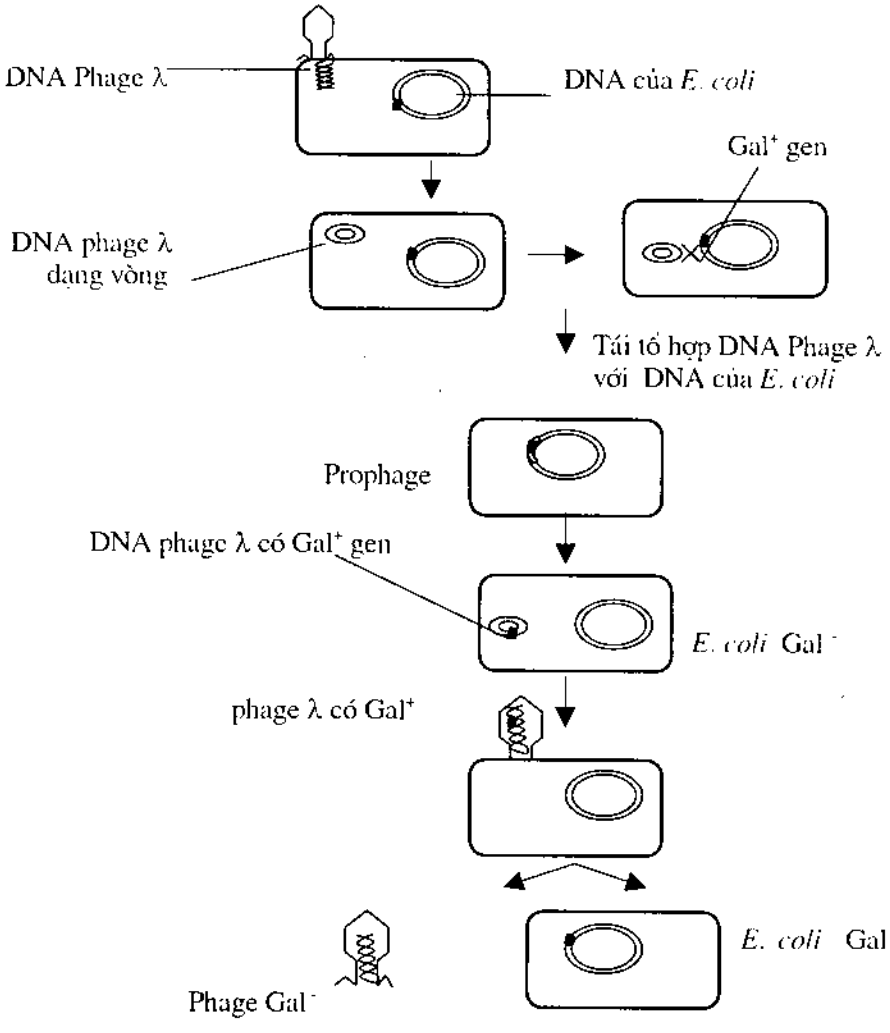
2. Tải nạp đặc hiệu

Tải nạp đặc hiệu là hiện tượng virus (hoặc) phage chỉ chuyển một số gen đặc hiệu nhất định, từ tế bào thể cho (D) sang tế bào thể nhận (R). Tải nạp đặc hiệu giữa các chủng *E. coli* nhờ phage λ đã được nghiên cứu kỹ.

Phage λ có bộ gen là DNA xoắn kép, dạng thẳng, khoảng 48.502 bp. Khi xâm nhiễm vào tế bào vi khuẩn, nhờ các trình tự cos DNA của phage λ nối lại thành dạng vòng. DNA của phage λ có thể tái bản, hoặc gắn với DNA của vi khuẩn *E. coli* tạo thành dạng tiền phage (prophage). DNA dạng vòng của phage λ có thể tái tổ hợp với DNA của vi khuẩn ở một điểm đặc hiệu nằm giữa gen ***gal*** $^+$ (gen mã hoá enzym thuỷ phân đường galactoza) và gen ***bio*** $^+$ (gen tổng hợp biotin) tạo thành prophage.

Khi prophage tách ra khỏi DNA vi khuẩn, thường mang theo một đoạn DNA của vi khuẩn là đoạn có chứa gen ***gal*** $^+$. Sau khi tách khỏi bộ gen vi khuẩn *E. coli* tạo nên dạng tái bản mang gen ***gal*** $^+$. Sau tái bản tạo nên thế hệ phage λ con đều có chứa gen ***gal*** $^+$. Các phage λ con xâm nhiễm vi khuẩn *E. coli* không có khả năng thuỷ phân đường galactoza (***gal*** $^-$), có sự trao đổi đoạn giữa phage λ ***gal*** $^+$ với bộ gen của vi khuẩn *E. coli* (***gal*** $^-$) làm cho gen ***gal*** $^+$ được gắn trở lại vào bộ gen vi khuẩn. Hiện

tượng phage λ chỉ chuyển đặc hiệu gen ***gal***$^+$ từ tế bào cho sang tế bào nhận được gọi là tái nạp đặc hiệu.



Hình 3.17. Tải nạp đặc hiệu ở phage λ.

IV. GIAO NẠP (CONJUGATION)

1. Khái niệm giao nạp và đột biến khuyết dưỡng

Hiện tượng giao nạp (còn gọi là tiếp hợp) được J. Lederberg và E. Tatum phát hiện 1946. Giao nạp là hiện tượng truyền vật chất di truyền từ vi khuẩn thể cho (D) sang vi khuẩn thể nhận (R) thông qua ống giao nạp.

Đột biến khuyết dưỡng là những đột biến về mặt dinh dưỡng, tạo nên các chủng vi khuẩn không có khả năng sử dụng hoặc tổng hợp một chất nào đó. Các chủng vi khuẩn mang đột biến khuyết dưỡng chỉ phát triển được trong môi trường có đầy đủ các nhân tố dinh dưỡng cần thiết. Môi trường có bổ sung các chất dinh dưỡng cần thiết, đảm bảo sự phát triển của các thể đột biến khuyết dưỡng, gọi là môi trường chọn lọc. Ví dụ ở vi khuẩn *E. coli* có chủng đột biến Met^- chỉ phát triển được trên môi trường có bổ sung thêm methionin, đột biến Lac^- chỉ phát triển được ở môi trường có bổ sung đường lactose. Tần số đột biến từ dạng bình thường trở thành thể đột biến khuyết dưỡng khoảng 10^{-6}.

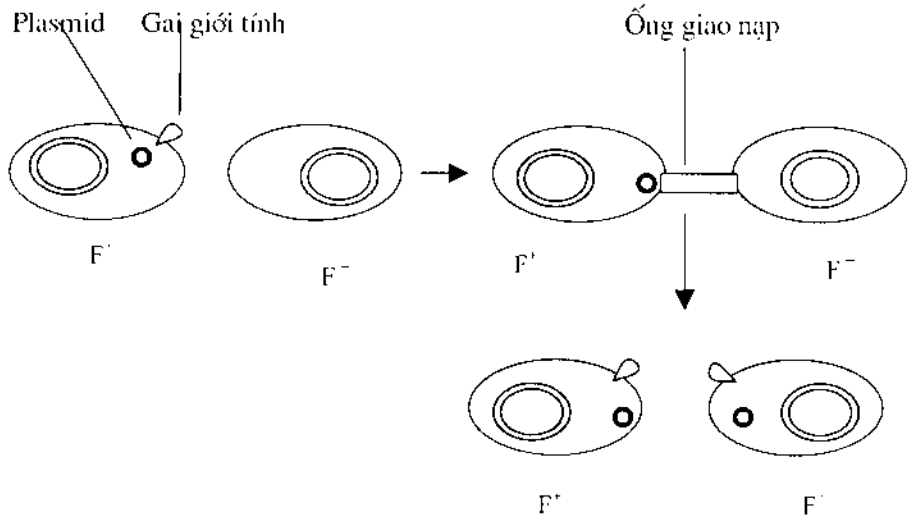
2. Cơ chế giao nạp

2.1. Nhân tố giới tính và giao nạp giữa tế bào E. coli F^+ và tế bào F^-

Hiện tượng giao nạp ở vi khuẩn *E. coli* được nghiên cứu tương đối đầy đủ. Vi khuẩn *E. coli* có hai nhóm phân chia theo nhân tố giới tính F (Fertility). Tế bào có nhân tố giới tính F gọi là tế bào F^+, tế bào không có nhân tố giới tính là F^-. Nhân tố giới tính F là một loại plasmid giới tính của tế bào *E. coli*, là một phân tử DNA kép dạng vòng khoảng 10.000 - 100.000 bp.

Nhân tố giới tính mang các gen qui định sự hình thành ống giao nạp và các gai giới tính làm cho tế bào F^+ có một số lông tiêm mao xung quanh. Trong cùng môi trường nuôi cấy dạng lỏng, ở điều kiện thích hợp hai tế bào *E. coli* tiếp cận với nhau, ống giao nạp được hình thành nối tế bào cho F^+ và tế bào nhận F^-. Tế bào *E. coli* F^+ có sự cắt vòng DNA của nhân tố giới tính (plasmid giới tính) tại điểm **ori** (origin

replication), một mạch đơn DNA của plasmid theo ống giao nạp chui sang tế bào F^-. Mỗi tế bào F^+ và F^- chỉ có một mạch đơn của DNA plasmid, ngay sau đó mạch đơn bổ xung được tổng hợp, thành mạch kép dạng vòng. Kết quả, tế bào *E. coli* F chuyển thành tế bào *E. coli* F^+.



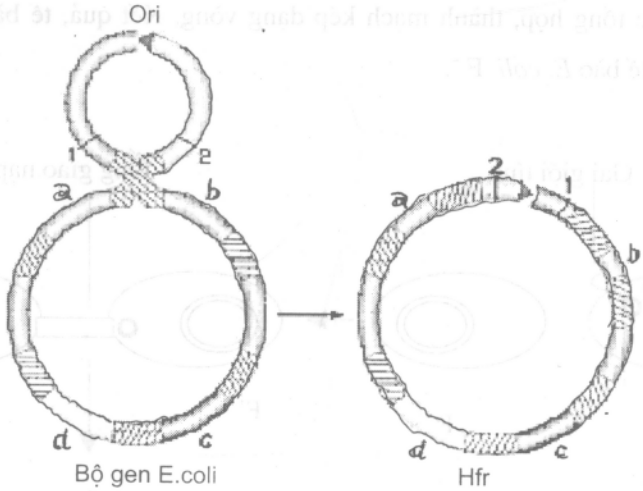
Hình 3.18. Sơ đồ giao nạp giữa tế bào *E. coli* F^+ và tế bào *E. coli* F^-.

2.2. Giao nạp ở E. coli chủng Hfr

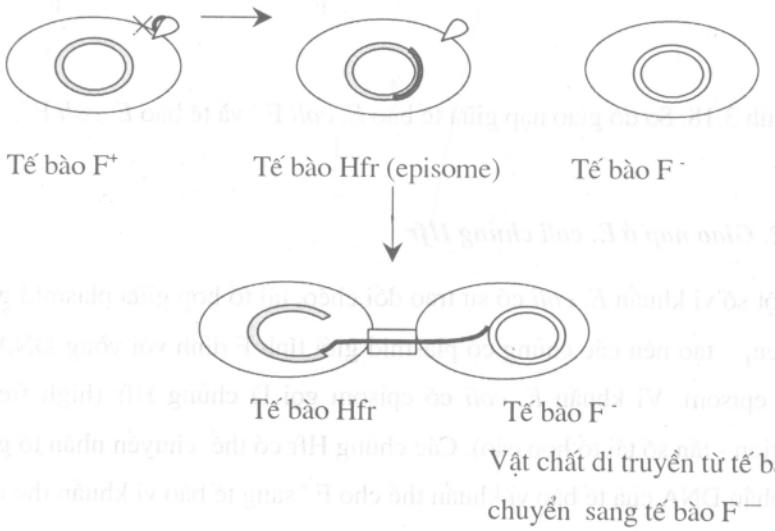
Một số vi khuẩn *E. coli* có sự trao đổi chéo, tái tổ hợp giữa plasmid giới tính F với bộ gen, tạo nên các chủng có plasmid giới tính F dính với vòng DNA của tế bào gọi là episom. Vi khuẩn *E. coli* có episom gọi là chủng Hfr (high frequency recombination - tần số tái tổ hợp cao). Các chủng Hfr có thể chuyển nhân tố giới tính F, và một phần DNA của tế bào vi khuẩn thể cho F^+ sang tế bào vi khuẩn thể nhận F^- thông qua ống giao nạp.

Khi ống giao nạp hình thành nối hai tế bào với nhau, ở tế bào F^+ xảy ra đứt vòng DNA tại điểm **ori** (origin replication) của episome, hai mạch đơn DNA tách rời

nhau một mạch đơn theo ống giao nạp chui sang tế bào F⁻, bắt đầu từ các gen của nhân tố F tiếp đến các gen của vi khuẩn thể cho.



Hình 3.19. Episom ở tế bào vi khuẩn *E. coli*.



Hình 3.20. Sơ đồ giao nạp của *E. coli* chủng Hfr.

Tuỳ theo thời gian giao nạp dài hay ngắn, số gen được chuyển từ tế bào thể cho sang tế bào thể nhận nhiều hay ít. Trong lúc một mạch đơn DNA được chuyển sang tế bào F^-, ở tế bào Hfr phân tử DNA tái bản theo kiểu vòng xoay.

Từ mạch đơn DNA, sự tổng hợp mạch bổ sung ở cả tế bào,tạo thành dạng DNA vòng kép. Thường chỉ có một phần nhiễm sắc thể của Hfr chuyển sang tế bào F^- nên rất ít khi tế bào F^- có thể trở thành Hfr. Tế bào F^- nhận được các gen của nhân tố giới tính F, và một số gen trên nhiễm sắc thể của tế bào thể cho gọi là hợp tử từng phần (*mezozigote*).

2.3. Lập bản đồ gen ở vi khuẩn E. coli bằng giao nạp

Dùng kỹ thuật giao nạp ngắt quãng (làm đứt ống giao nạp) ở từng thời điểm nhất định, có thể xác định số lượng gen được chuyển từ thể cho F^+ hoặc Hfr sang thể nhận F^-, các kết quả thu được để lập bản đồ gen của vi khuẩn *E. coli*.

Nuôi các tế bào F^+ hoặc Hfr cùng với tế bào F^- ở môi trường có điều kiện và mật độ tế bào thích hợp, để các tế bào tiếp xúc và giao nạp với nhau. Sau từng thời gian nhất định lấy các ống có các tế bào đang giao nạp, đưa vào máy rung để tách riêng các tế bào và kiểm tra kích thước đoạn DNA từ thể cho (D) đã chuyển qua tế bào nhận (R). Tiếp tục làm như vậy, ở mỗi thời điểm có thể xác định được chiều dài mạch DNA và số lượng gen từ tế bào Hfr chuyển qua tế bào F^-. Bằng các kết quả thu được, lập được bản đồ gen trên nhiễm sắc thể tính bằng đơn vị phút.

Wallman và F. Jacob 1957 nghiên cứu trên *E. coli*, đã lập được bản đồ gen trên nhiễm sắc thể của *E. coli*. Các ông cho tế bào *E. coli* dòng Hfr bình thường giao nạp với dòng F^- mang 7 gen đột biến: F^-(thr^- leu^- azi^- $tonA^-$ lac^- gal^- Str^R). Trong đó: đột biến mất khả năng tổng hợp hai acid amin threonin (thr^-) và leucin (leu^-); đột biến mẫn cảm với acid (azi), mẫn cảm với phage T_1 ($tonA^-$); đột biến mất khả năng thuỷ phân đường lactoza (lac^-) và đường galactoza (gal^-), đột biến bền vững với chất kháng sinh streptomycin (Str^R).

Sau khi các tế bào có hiện tượng giao nạp, lấy mẫu ở từng thời gian xác định cho vào máy rung rồi pha loãng môi trường để không hình thành các giao nạp mới. Kết quả thí nghiệm, cho thấy các gen của nhân tố giới tính F được chuyển sang tế bào

F^- sớm nhất, sau đó là các gen thr^+ và leu^+. Gen mẫn cảm với acid (azi^R) được chuyển sang F^- sau 8 phút, gen ton A mẫn cảm với phage T_1 được chuyển sau 10 phút, gen lac^+ sau 17 phút, gen gal^+ sau 23 phút. Thí nghiệm để toàn bộ DNA của tế bào *E. coli* dòng Hfr chuyển hết sang F^- mất 90 phút.

C. DI TRUYỀN VI NẤM

Vi nấm là những sinh vật thuộc nhóm *eukaryote*, có nhân điển hình, nhân phân biệt với tế bào chất bởi màng nhân. Vi nấm có thể sinh sản vô tính hoặc hữu tính.

I. CHU TRÌNH SỐNG CỦA VI NẤM

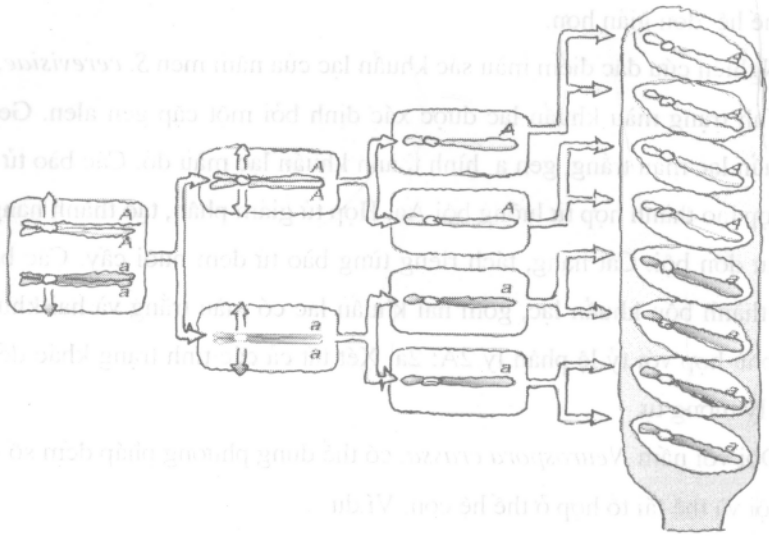
1. Chu trình sống của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Nấm men có hai giới tính a và α. Tế bào đơn bội sinh sản nguyên phân bằng cách nảy chồi. Các tế bào đơn bội a và α kết hợp với nhau tạo thành tế bào lưỡng bội a/α. Tế bào lưỡng bội a/α ở điều kiện bình thường, sinh sản nguyên phân bằng nảy chồi, khi môi trường thiếu nguồn nitơ, các tế bào thực hiện quá trình phân bào giảm phân. Mỗi tế bào giảm phân hình thành một nang chứa bốn bào tử đơn bội, gồm hai bào tử có giới tính a và hai bào tử có giới tính α. Các bào tử khi thoát khỏi nang, nảy chồi tạo thành các tế bào sinh dưỡng đơn bội. Bốn bào tử sắp xếp ngẫu nhiên gọi là bộ bốn không xếp hàng.

2. Chu trình sống của *Neurospora crassa*

Neurospora crassa là sinh vật đơn bội, sinh sản dinh dưỡng bằng cách hình thành các khuẩn ty theo cơ chế nguyên phân. Mỗi đoạn khuẩn ty hay bào tử đính (bào tử vô tính) khi gặp môi trường thuận lợi phát triển thành khuẩn ty. Các vách ngăn tế bào giữa các sợi có lỗ cho nội chất và nhân có thể di chuyển dọc theo khuẩn ty.

Neurospora crassa có hai giới tính A và a, giới tính do một cặp gen alen qui định. Các bào tử nang đơn bội mang hai giới tính khác nhau A hoặc a. Bào tử có hình dạng giống nhau mỗi bào tử mang một trong 2 giới tính A hoặc a



Hình 3.21. Sơ đồ hình thành bào tử đơn bội ở nấm *Neurospora crassa*.

Quá trình sinh sản hữu tính xảy ra khi có sự hợp nhân của các nhân có giới tính khác nhau. Dòng A chỉ giao phối được với a hoặc ngược lại. Kết quả thụ tinh, hình thành các hợp tử lưỡng bội A/a. Hợp tử tồn tại một thời gian ngắn, phân chia thành một nang hình ống. Trong nang có hai lần giảm phân liên tiếp cho bốn nhân đơn bội 2A và 2a. Mỗi nhân nguyên phân liên tiếp, tạo thành nang có 8 bào tử đơn bội. Các bào tử sắp xếp chính xác theo trình tự phân ly của bốn nhiễm sắc tử, bắt nguồn từ mỗi bộ bốn trong pha đầu của giảm phân I: AA, AA, aa, aa. Khi các bào tử nang đơn bội thoát ra khỏi nang, nảy mầm phát triển thành các khuẩn ty sinh dưỡng.

II. PHÂN TÍCH DI TRUYỀN BẰNG GIẢM PHÂN

Vi nấm có cấu trúc di truyền đơn giản, nhiên cứu sự di truyền một số tính trạng của vi nấm cho phép ứng dụng vi nấm trong sinh học và đời sống có hiệu quả.

Các bào tử nang của vi nấm, sau khi tách khỏi nang được thu thập, cho nảy mầm riêng rẽ để nghiên cứu kiểu hình của mỗi bào tử. Các bào tử tương đương với các cá thể thế hệ con. Do bản chất đơn bội của các bào tử, khi phân tích đặc điểm di truyền của các thế hệ đơn giản hơn.

Nghiên cứu đặc điểm màu sắc khuẩn lạc của nấm men *S. cerevisiae*, cho thấy có cặp tính trạng màu khuẩn lạc được xác định bởi một cặp gen alen. Gen A hình thành khuẩn lạc màu trắng, gen a hình thành khuẩn lạc màu đỏ. Các bào tử A và bào tử a kết hợp tạo thành hợp tử lưỡng bội Aa. Hợp tử giảm phân, tạo thành nang có chứa bốn bào tử đơn bội. Cắt nang, tách riêng từng bào tử đem nuôi cấy. Các bào tử nảy mầm tạo thành bốn khuẩn lạc, gồm hai khuẩn lạc có màu trắng và hai khuẩn lạc có màu đỏ, phù hợp với tỷ lệ phân ly 2A: 2a. Xét tất cả các tính trạng khác đều cho kết quả phân ly tương tự.

Đối với nấm *Neurospora crassa*, có thể dùng phương pháp đếm số lượng các thể đơn bội và thể tái tổ hợp ở thế hệ con. Ví dụ

Cặp bố mẹ P : +++ x abc ⟶ Hợp tử +++ / abc

Hợp tử giảm phân tạo nên 8 kiểu giao tử , hình thành 8 loại bào tử khác nhau. Kết quả giảm phân tạo nên các bào tử giống bố mẹ (+++ và abc), và các bào tử tái tổ hợp (a++, +bc, ++c, ab+, a+c, +b+). Đây là các cá thể đơn bội nên kiểu gen đơn bội hoàn toàn biểu hiện ra kiểu hình.

Chương 4

CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

Kỹ thuật di truyền (hay kỹ thuật gen- genetic engineering) là thuật ngữ chung cho nhiều kỹ thuật cơ bản trong nghiên cứu di truyền phân tử. Thuật ngữ genetic engineering gọi là công nghệ gen hay kỹ thuật gen vấn đề cốt lõi của công nghệ sinh học hiện đại.

Năm 1983 Rudleg và Seidel nêu khái niệm: kỹ thuật di truyền là các kỹ thuật dẫn đến khả năng biến đổi định hướng gen, tần số kiểu gen của một quần thể, hoặc làm tăng căn bản khả năng sinh sản của cá thể để góp phần nâng cao vốn gen (genopol), và tăng số lượng hợp tử của quần thể.

Kỹ thuật gen được bắt đầu từ 1977, bao gồm các thao tác kỹ thuật trên gen, nhằm điều chỉnh và biến đổi gen hoặc tạo ra các gen mới từ đó tạo ra các cơ thể mới. Kỹ thuật gen bao gồm một số kỹ thuật cơ bản là kỹ thuật DNA tái tổ hợp (recombinant DNA technology), phân lập gen (isolation of gene), chuyển ghép gen (transfer of gene), dung hợp gen (gene fusion), vi thao tác gen (gene micro manipulation)...

DNA tái tổ hợp (recombinant DNA) là DNA được tạo ra từ hai hoặc nhiều nguồn vật liệu di truyền khác nhau. Phân tử DNA lai nhau được ghép nối từ các đoạn DNA của các cá thể khác nhau trong loài, hoặc các loài khác nhau gọi là DNA tái tổ hợp.

Thực chất của công nghệ DNA tái tổ hợp là tập hợp nhiều kỹ thuật trên một gen hoặc bộ gen, cải biến cấu trúc của gen, bộ gen tạo ra các gen mới trong bộ gen. Công nghệ DNA tái tổ hợp bao gồm bốn bước cơ bản:

- Tách chiết DNA, RNA (phân lập gen- isolation of gen)

- Tạo vectơ tái tổ hợp (recombinant DNA bao gồm chuẩn bị các vectơ tách dòng, sử dụng enzyme giới hạn cắt và nối các gen).
- Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ và nhân dòng.
- Sàng lọc, theo dõi hoạt động và biểu hiện của gen.

I. TÁCH CHIẾT ACID NUCLEIC

1. Tách chiết DNA của vi sinh vật

1.1. Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn

Nuôi vi khuẩn thu sinh khối, tạo môi trường nuôi cấy có nhiệt độ, pH và điều kiện dinh dưỡng thích hợp đảm bảo cho vi khuẩn được phân chia ở giữa log phase OD_{600} (A_{600} = 0,6). Li tâm lạnh với tốc độ 4000 vòng x gr để thu cặn tế bào, thường từ 1 lít dịch nuôi cấy thu lấy khoảng 10ml cặn vi khuẩn.

Phá màng tế bào vi khuẩn: có nhiều cách phá màng tế bào vi khuẩn khác nhau, có thể đông khô cặn vi khuẩn rồi nghiền nhỏ cùng với SDS (sodium dodecyl sunphat), SDS có tác dụng làm vỡ màng tế bào, tách các phân tử lipid và giải phóng DNA, hoặc nghiền cặn vi khuẩn cùng với EDTA (Etylendiamine tetracetic acid), EDTA hấp thu các ion Mg^{++} làm vỡ thành tế bào, đồng thời ức chế các enzym phân huỷ DNA. Có thể phá tế bào bằng cách ủ cặn tế bào vi khuẩn với enzym lysozyme ở nhiệt độ thích hợp, để phân huỷ màng tế bào vi khuẩn.

Loại bỏ protein trong tế bào vi khuẩn: dịch nghiền cặn tế bào vi khuẩn được ủ với enzym protease K ở nhiệt độ 37 °C trong 1 - 2 giờ, thêm vào hỗn hợp phenol : clorophoc (1:1), lắc nhẹ để protein kết tủa.

Tủa DNA: Dùng 4/10 thể tích ethanol 100% lạnh với 1/10 thể tích natri acetat 3M và 5/10 thể tích dịch chiết DNA ở - 20 °C trong 2 - 3 giờ để tủa DNA. Ly tâm lạnh tốc độ 12. 000 - 14. 000 vòng/ phút trong 15 phút thu tủa DNA. Trong ống ly tâm lớp protein tủa ở giữa, lớp DNA và RNA trên cùng. Tinh sạch dịch chiết có thể lấy phần dịch chứa DNA tiếp tục làm như trên 2-3 lần, sau đó ủ với enzym RNase để tinh sạch DNA. Thu phần tủa DNA, rửa tủa bằng ethanol 70%. Để tủa khô tự nhiên

hoặc trong buồng sấy chuyên dụng, hoà tan tủa DNA trong 10 ml nước sạch, mẫu có thể đem sử dụng hoặc giữ ở - 20°C trong thời gian 1- 2 tháng .

Tách chiết DNA từ các loại vi sinh vật khác được tiến hành theo các bước trên, hoá chất, dung môi và các dung dịch chiết có thể khác nhau.

1.2. Tách chiết DNA từ mô, tế bào động vật và thực vật

Nguyên tắc tách chiết DNA từ mô, tế bào động vật và thực vật giống như tách chiết DNA của vi khuẩn, không phải nuôi cấy để thu sinh khối tế bào. Tuỳ từng loại mẫu phẩm sinh học (lông, tóc, thịt, trứng, máu, nước bọt...), tuỳ mục đích nghiên cứu và điều kiện phòng thí nghiệm có thể sử dụng các kỹ thuật tách chiết với các loại hoá chất, dung môi khác nhau.

2. Tách chiết RNA

Tách chiết RNA tổng số của vi khuẩn, tế bào động vật, thực vật gồm các bước thực hiện như tách chiết DNA. Tuỳ theo đặc điểm cấu tạo khác nhau giữa các loại RNA, sử dụng các kỹ thuật tách chiết các loại RNA khác nhau. Dịch chiết sau khi đã làm sạch protein, được ủ với enzym DNase để phân huỷ DNA, gây tủa để tách chiết RNA tổng số. Với mRNA có thể được tách bằng sắc ký ái lực trên cột oligo T - cellulose. Dựa vào cấu trúc phân tử mRNA có đuôi poly A người ta chế ra các bộ mẫu thử chuyên dụng (kit), sử dụng các viên bi từ có mang oligo T trên bề mặt. Các mRNA bám vào bề mặt các viên bi từ qua liên kết bổ sung với oligo T, sau đó bằng kỹ thuật li tâm thu lại các viên bi và tách riêng mRNA.

3. Phương pháp định tính, định lượng acid nucleic

3.1. Phương pháp đo quang phổ

Trên nguyên tắc sự hấp thu ánh sáng khác nhau của các bazơ nitơ của phân tử DNA mạch kép và mạch đơn, có thể xác định hàm lượng của DNA trong dung dịch. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm ($OD_{260\,nm}$ - Optical Density) của các mẫu DNA cho phép xác định nồng độ DNA trong dung dịch. Một đơn vị OD ở bước sóng 260 nm ký hiệu là $A_{260\,nm}$.

$A_{260\,nm}$ = 1,0 = 50 µg/ml DNA sợi đôi

$A_{260\,nm}$ = 1,0 = 33 µg/ml DNA sợi đơn

$A_{260\,nm}$ =1,0 = 40 µg/ml RNA

Khi tính nồng độ DNA cần lưu ý đến hệ số pha loãng của dịch chiết. Công thức tính chung: C_{DNA} (µg/ml) = $A_{260\,nm}$ x 50 x (Độ pha loãng)

Ví dụ, dịch chiết DNA mạch kép có giá trị $A_{260\,nm}$ = 0,7 nghĩa là dung dịch có nồng độ DNA là C_{DNA} = 0,7 x 50 = 35µg/ ml. Giá trị C_{DNA} xác định đúng khi dịch chiết DNA, RNA đã tinh sạch. Để kiểm tra độ sạch của dung dịch DNA, thường đo giá trị $A_{280\,nm}$. Do protein có phổ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280 nm, đồng thời hấp thụ ở bước sóng 260 nm gây nên sự sai lệch khi tính nồng độ của acid nucleic. Để đảm bảo chính xác nồng độ C_{DNA} người ta sử dụng giá trị $A_{260\,nm}/A_{280\,nm}$. Khi giá trị $A_{260\,nm}/A_{280\,nm}$ = 1,8 ÷ 2,0 dịch chiết DNA được coi là tinh sạch.

3.2. Phương pháp điện di

Acid nucleic là các đại phân tử tích điện âm, trong điện trường có điện thế và cường độ thích hợp, các phân tử DNA, RNA di chuyển về phía cực dương của điện trường. Tuỳ theo mục đích nghiên cứu và kích thước các đoạn gen cần phân tích, cần chọn môi trường, nồng độ gel phù hợp. Có nhiều phương pháp điện di khác nhau được sử dụng trong nghiên cứu DNA là điện di trên gel agar, gel polyacrylamid...

II. VECTƠ TÁCH DÒNG (cloning vector)

1. Đặc điểm của vectơ tách dòng

Vectơ tách dòng còn gọi là phương tiện vận chuyển gen. Vectơ tách dòng thường là các phân tử DNA có kích thước nhỏ, cho phép cài (gắn) các gen cần thiết, và có khả năng tái bản không phụ thuộc vào sự phân chia của tế bào. Vectơ tách dòng phải có khả năng tồn tại trong tế bào vật chủ qua nhiều thế hệ, ít gây biến đổi bộ gen của tế bào vật chủ. Các vectơ tách dòng phải mang các gen "tín hiệu" để dễ dàng nhận biết các tế bào mang vectơ tái tổ hợp. Vectơ tách dòng được sử dụng để

khuếch đại số lượng bản sao của một gen hay trình tự DNA nhất định, chuyển các gen ngoại lai vào tế bào hoặc sản xuất protein với số lượng lớn từ các gen tách dòng.

Đặc điểm cần thiết của các vectơ tách dòng:

- Kích thước vectơ càng nhỏ càng tốt để có thể "cài, gắn" DNA có kích thước tối đa, kích thước vectơ nhỏ dễ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn và càng được sao chép nhanh.

- Vectơ tách dòng phải có các đặc điểm cho phép dễ dàng phát hiện, nhận biết chúng trong tế bào vật chủ. Thường các vectơ có gen kháng chất kháng sinh hoặc gen tổng hợp chất màu, dễ dàng phát hiện trên môi trường thạch.

- Vectơ tách dòng có vị trí nhận biết duy nhất của một số lượng tối đa các enzym giới hạn.

Tách dòng (cloning) nhằm thu nhận một gen hay một trình tự DNA với hàm lượng lớn ở một dòng tế bào chủ nhất định. Thực chất của tách dòng là cài gắn một gen, hay một trình tự DNA vào vectơ tách dòng tạo các vectơ tái tổ hợp, và chuyển vectơ tái tổ hợp vào các tế bào chủ. Trong các tế bào chủ, các vectơ tái tổ hợp được nhân lên thành một số lượng lớn bản sao của gen (đoạn DNA) ban đầu. Một dòng tế bào chứa gen cần thiết được gọi là tách dòng gen hay tạo dòng gen.

2. Các loại vectơ tách dòng

Vectơ tách dòng (cloning vector) gồm nhiều loại như plasmid, phage, cosmid, phagemid, virus, nhiễm sắc thể nhân tạo của bào nấm men... Mỗi loại vectơ tách dòng có những ưu điểm, nhược điểm nhất định. Tuỳ thuộc kích thước của gen cần tách dòng và đặc điểm của loại tế bào chủ để chọn loại vectơ tách dòng thích hợp.

2.1. Vectơ tách dòng là plasmid

Plasmid là những phân tử DNA có kích thước nhỏ (2 - 5kb) dạng vòng, nằm trong tế bào chất của tế bào vi khuẩn, nấm men... Plasmid có khả năng tái bản độc lập, không phụ thuộc vào sự tái bản của bộ gen tế bào. Mỗi tế bào vi khuẩn có khoảng 1- 50 plasmid (trung bình 20 plasmid). Trong môi trường nuôi cấy có chất kháng sinh, số lượng plasmid trong tế bào tăng nhanh. Ví dụ, nuôi cấy vi khuẩn *E.*

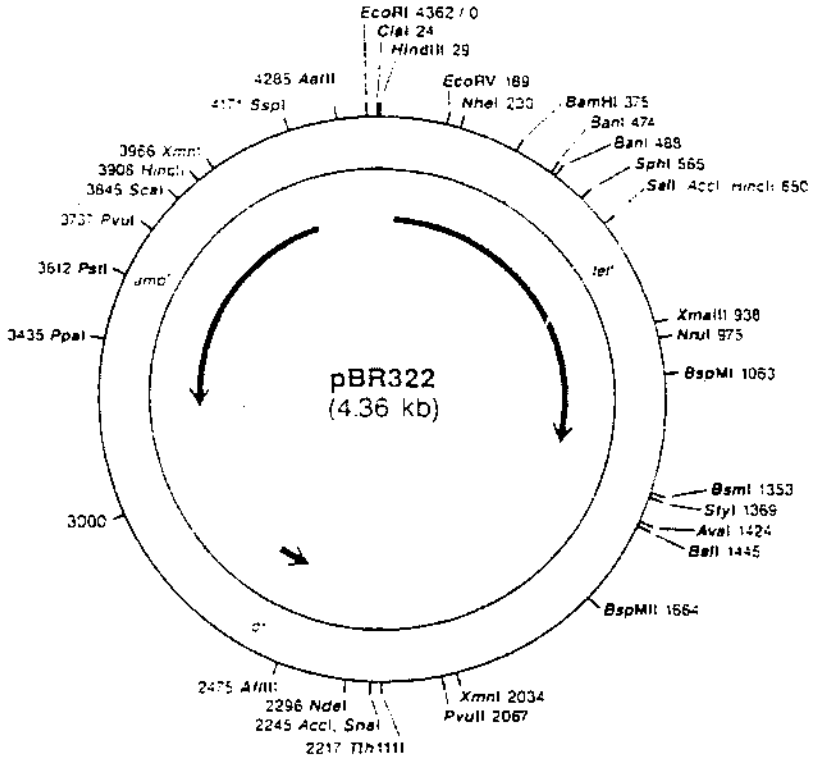
coli trong môi trường bổ sung chloramphenicol, số lượng plasmid trung bình trong một tế bào từ 20 plasmid, tăng lên 3500 - 4000 trong vòng 12 giờ. Kích thước plasmid từ 1- 250 kb. Mỗi plasmid có một số ít gen, thường là các gen có hoạt tính chống chất kháng sinh, gen sinh độc tố, gen sinh kháng sinh, gen giới tính... Plasmid tái bản theo cơ chế bán bảo thủ, kiểu Okazaki.

Theo chức năng và các gen trên plasmid, người ta chia plasmid thành nhiều loại khác nhau như plasmid giới tính (F), plasmid kháng chất kháng sinh (R), plasmid col (có gen mã hoá colicin giết các vi khuẩn khác). Plasmid phát hiện đầu tiên ở *E. coli* kí hiệu ColE1. Từ các plasmid tự nhiên đã phân lập, cải tiến tạo nên nhiều thế hệ plasmid nhân tạo khác nhau, mang nhiều đặc tính quí, thuận lợi cho kỹ thuật tách dòng gen.

Plasmid thế hệ thứ nhất là những plasmid đầu tiên được sử dụng làm cloning vectơ pSC101(Stanley và Cohen, 1973), ColE1(Hershfield và cộng sự 1974)...

Plasmid thế hệ thứ hai được tạo bằng cách tập hợp các đặc tính quí của nhiều plasmid tự nhiên, hoặc gắn thêm các gen chỉ thị tạo nên một plasmid mới. Điển hình cho plasmid thế hệ 2 là pBR322 (Bolivar và cộng sự, 1977). Ký hiệu một plasmid gồm chữ đầu: p - viết tắt chữ plasmid, một hoặc hai ba chữ tiếp theo chỉ chữ đầu tên tác giả hoặc tên vi khuẩn phát hiện plasmid đó, một chữ số chỉ thứ tự chủng. Ví dụ, pBR322 : B - Bolivar, R - Rodriguez là tên hai tác giả thuộc 2 phòng thí nghiệm khác nhau tạo nên, 322 chỉ số thứ tự.

Plasmid pBR322 có kích thước 4363 bp, mang 2 gen kháng chất kháng sinh Ap^R - kháng ampicilin, Tc^R - kháng tetracyclin và 20 vị trí nhận biết của các enzym giới hạn (RE - Restriction Enzyme), trong số đó 11 vị trí nằm trong các gen kháng chất kháng sinh. Khi một gen lạ (hoặc trình tự DNA) được gắn tại vị trí các gen đó, làm mất khả năng kháng chất kháng sinh tương ứng. Plasmid pBR322 có khả năng tái bản cao, cho phép gắn đoạn DNA kích thước 6 kb vẫn hoạt động bình thường.



Hình 4.1. Plasmid pBR322.

Plasmid nhân tạo thế hệ thứ ba là những plasmid mạnh, có kích thước rất nhỏ và một polylinker (polycloning site), được ưa chuộng trong kỹ thuật gen. Polylinker là một đoạn polynucleotid tổng hợp mang một chuỗi các vị trí nhận biết duy nhất của nhiều loại RE.

Nhóm các plasmid pUC điển hình là pUC18 được cải tiến từ pBR322, kích thước khoảng 2.686 bp mang gen Ap^R và một phần gen lacZ, xen vào giữa gen lacZ là polylinker, các plasmid trong nhóm này khác nhau ở độ dài của polylinker. Ưu điểm của plasmid nhóm pUC có kích thước nhỏ, vùng polylinker cho phép gắn bất kỳ một trình tự DNA lạ nào. Gen lacZ giúp dễ dàng phát hiện vectơ tái tổ hợp một cách rất đơn giản, bằng quan sát màu sắc khuẩn lạc trên môi trường thạch. Bình thường

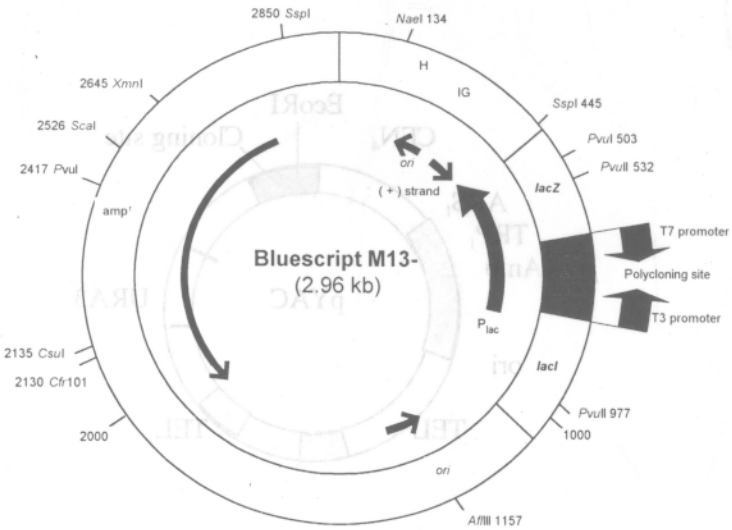
các khuẩn lạc có màu xanh do enzym β-galactosidase được tổng hợp, nếu khuẩn lạc có màu trắng chứng tỏ, gen cần thiết đã gắn vào vectơ ở vị trí gen LacZ làm cho enzym β-galactosidase không được tổng hợp.

Nhóm các plasmid pSP và Gemini có kích thước khoảng 3.000 bp, mang các gen Ap^R và polylinker, không mang gen lacZ. Vectơ pSP mang promoter đặc trưng cho RNA ở hai bên vùng polylinker (pSP64, pSP56, Gemini...). Ưu điểm của các plasmid trong nhóm này cho phép phiên mã các đoạn DNA ngắn trong vectơ tạo thành rất nhiều RNA, các RNA này được dùng làm mẫu dò hay để nghiên cứu cấu trúc, chức năng của RNA.

2.2. Vectơ tách dòng là phage

Các phage sử dụng làm vectơ tách dòng hiện nay phần lớn bắt nguồn từ phage λ. Phage λ có DNA mạch kép kích thước 48.502 bp, nằm trong phần đầu của phage λ. Các phage EMBL3, EMBL4, λGEM 11, λGEM12, λgt11, Phage M13... thường được sử dụng làm vectơ tách dòng. Phage M13 có DNA sợi đơn có 10 gen, kích thước 6,4 kb, chỉ xâm nhiễm đặc trưng các *E. coli*. Phage M13 có DNA mạch đơn, được sử dụng trong xác định trình tự của acid nucleic bằng phương pháp Sanger. Sử dụng phage làm vectơ tách dòng có lợi hơn các loại plasmid khác vì phage có hệ thống gen giúp xâm nhập vào vi khuẩn nhanh, tái bản rất mạnh. Mặt khác sử dụng phage có thể gắn xen đoạn DNA lớn hơn nhiều so với sử dụng các plasmid, có thể cài gắn các đoạn DNA kích thước đến 30 kb. Phage được sử dụng làm vectơ tách dòng hiệu quả với tế bào chủ *prokaryote* và *eukaryote*, còn các plasmid sử dụng với tế bào *eukaryote* thường không có kết quả. Phage M13 chỉ có một đoạn ở giữa sợi đơn gồm 507 nucleotid cho phép gắn xen DNA lạ, không gây hỏng chức năng của phage. Từ phage M13 người ta gắn thêm gen lacZ vào đoạn giữa sợi đơn DNA tạo nên vectơ M13mp1. Vectơ M13mp1 được cải tiến tạo M13mp2, là vectơ đơn giản nhất có một vị trí cắt của enzym giới hạn EcoRI. Từ vectơ M13mp2 cải tiến tạo nên vectơ M13mp7 có 4 vị trí cắt đặc trưng cho các enzym giới hạn (EcoRI, BamHI, SalI và PstI) tiện lợi và có hiệu quả cao trong tách dòng gen. Hiện nay có rất nhiều vectơ tách

dòng được tạo nên từ phage M13, bluescript M13 là một trong những vectơ được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật gen



Hình 4.2. Plasmid bluescript M13.

2.3. Vectơ tách dòng là cosmid

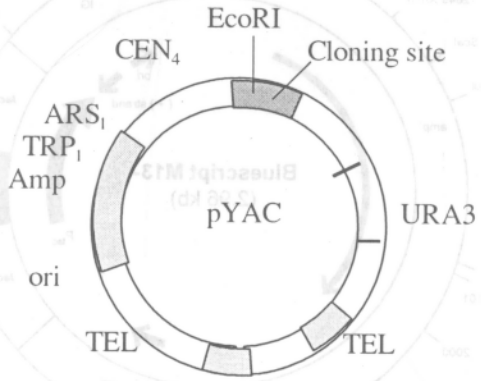
Cosmid là vectơ nhân tạo, ghép nối từ một plasmid với đoạn trình tự cos của phage λ. Trình tự cos điều khiển đóng gói DNA của phage vào phần đầu của phage. Vectơ tách dòng là cosmid cho phép cài gắn đoạn DNA có kích thước lớn 40 - 50 kb.

2.4. Vectơ tách dòng là phagemid

Phagemid là các cloning vectơ được cấu tạo trên cơ sở pBR322 được gắn thêm đoạn khởi đầu tái bản (Ori) của phage f1, một đoạn có chứa promoter của phage T_3, T_7 và polycloning site. Điển hình cho phagemid là nhóm plasmid bluescript là loại plasmid mạnh được sử dụng nhiều trong công nghệ DNA tái tổ hợp.

2.5. Vectơ tách dòng là nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men

Nấm men là đối tượng quan trọng trong công nghệ sinh học. Plasmid có nguồn gốc từ vi khuẩn khi đưa vào tế bào nấm men hoạt động yếu không hiệu quả, ngược lại plasmid có nguồn gốc từ nấm men đưa vào tế bào vi khuẩn cũng không hoạt động.



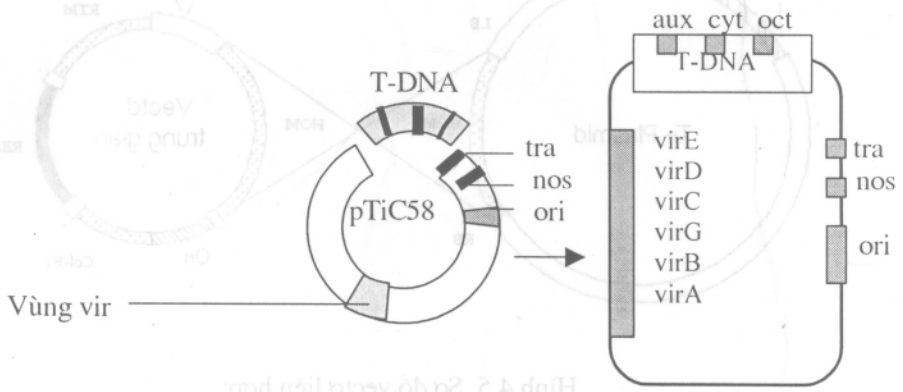
Hình 4.3. Sơ đồ vectơ pYAC.

Plasmid nhân tạo của nhiễm sắc thể nấm men là những plasmid lai, được ghép nối từ các đoạn DNA của bộ gen nấm men với các đoạn DNA của bộ gen vi khuẩn. Plasmid Integrative Yeast (YLps) là plasmid nguồn gốc vi khuẩn mang một số gen nấm men. Plasmid Replicate Yeast (YRps) là plasmid nguồn gốc vi khuẩn mang đoạn gen mã hoá sự tái bản của nhiễm sắc thể nấm men. Plasmid pJDB219 phát triển được cả trong tế bào nấm men và tế bào vi khuẩn. Các vectơ tách dòng là plasmid nhân tạo của nhiễm sắc thể nấm men, được ứng dụng nhiều trong tách dòng gen, lập các ngân hàng genom và trong tạo các giống động vật, thực vật chuyển gen.

2.6. Vectơ tách dòng là Ti plasmid

Agrobacterium tumefaciens có plasmid lớn, kích thước khoảng 200 kb, thường gây khối u ở thực vật gọi là Ti plasmid (tumor inducing). A. *Tumefaciens* xâm

nhiễm qua các vết xước rễ thực vật, chuyển một đoạn DNA của Ti plasmid (T-DNA) vào trong cây, đoạn T-DNA của Ti plasmid khoảng 10- 20 kb được gắn vào bộ gen của cây bị bệnh tạo nên các khối u ở cây.

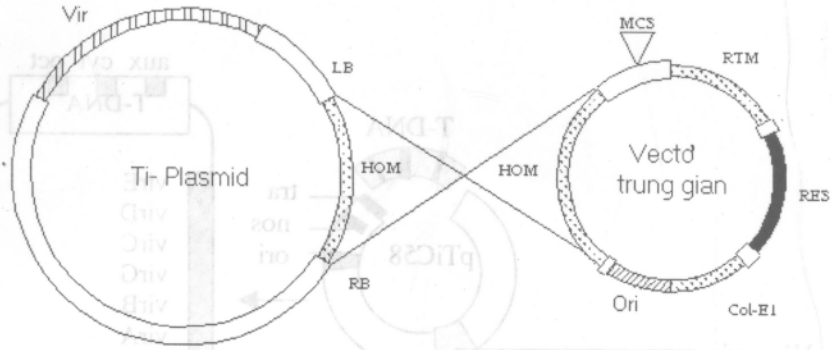


Hình 4.4. Sơ đồ plasmid pTiC58.

Ti plasmid gồm đoạn T-DNA mang gen mã hoá sinh tổng hợp auxin, xytokin, opin, các gen gây khối u (oncogen), gen tái bản plasmid (Ori) và vùng vir. Vùng vir kích thước khoảng 40 kb mang các gen cần thiết cho sự xâm nhiễm và chuyển T-DNA vào cây. Khi T-DNA được đưa vào trong cây, các gen hoạt động sản sinh auxin, xytokin và opin làm cho các tế bào phân chia không kiểm soát, tạo nên các khối u. Các dòng A. *Tumefaciens* khác nhau có các Ti plasmid kích thước khác nhau, dòng A. *Tumefaciens* C58 có pTiC58 kích thước khoảng 194.000 bp (Depicker và cộng sự 1980), dòng A. *Tumefaciens* Ach5 có pTiAch5 kích thước khoảng 213.000 bp (Devos và cộng sự 1981). Ti plasmid kích thước quá lớn không thuận lợi cho tách dòng gen, từ Ti plasmid tạo nên nhiều dạng plasmid nhân tạo như vectơ nhị thể, vectơ liên hợp... sử dụng có hiệu quả trong tách dòng và chuyển gen ở thực vật.

Vùng vir của Ti plasmid bị kích hoạt bởi các hợp chất có trong mô tế bào bị thương tổn. Vùng vir có 6 gen A, B, C, D, E, G liên quan đến sự cắt chuyển T-DNA vào cây. Vùng T- DNA mang các gen mã hoá tổng hợp auxin, xytokin, opine và oncogen. Khi thiết kế vectơ nhân tạo từ Ti plasmid cần thay T-DNA bằng một đoạn

của plasmid pBR322, có gen chỉ thị kháng chất kháng sinh tạo nên các vectơ liên hợp, vectơ nhị thể...



Hình 4.5. Sơ đồ vectơ liên hợp:

HOM: vùng DNA tái tổ hợp ;

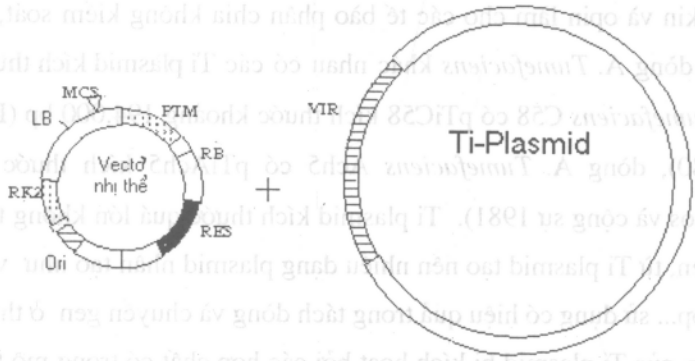
MCS: polycloning site;

RB: bờ phải, LB: bờ trái ;

PTM: gen chỉ thị chọn lọc biến nạp thực vật;

RES: gen chỉ thi kháng chất kháng sinh để chọn lọc vi khuẩn;

Ori: điểm khởi đầu tái bản.



Hình 4.6. Sơ đồ vectơ nhị thể.

2.7. Vectơ tách dòng là virus của tế bào eukaryote

Thường sử dụng là các loại virus SV40 (*Simian virus*), *adenovirus*, *retrovirus*, *baculovirus* và *virus herpes*... Các vectơ trong nhóm này sử dụng trong tách dòng và chuyển gen ở tế bào động vật, thực vật bậc cao.

III. ENZYM GIỚI HẠN VÀ MỘT SỐ ENZYM THƯỜNG SỬ DỤNG TRONG KỸ THUẬT GEN

1. Enzym giới hạn

Tế bào vi khuẩn bị nhiễm phage thường bị phage phá huỷ. Có một số chủng vi khuẩn bị nhiễm phage không bị phage tiêu diệt, do DNA của phage bị cắt thành từng đoạn nhỏ nhờ một số loại enzym trong tế bào, những enzym đó được gọi là enzym giới hạn có khả năng cắt DNA phage ở những vị trí nhất định thành những đoạn ngắn.

Hiện tượng giới hạn và enzym giới hạn do Hamilton Smith phát hiện đầu tiên (1970) ở vi khuẩn *Hemophilus influenzae*, chủng R_d đặt tên là Hind II. Enzym giới hạn (Restriction Enzyme - RE) thuộc nhóm enzym endonuclease, cắt các liên kết trong phân tử DNA.

Ví dụ, Hae III cắt DNA ở giữa 4 cặp nucleotid GG CC
CC GG

Sma I cắt DNA bằng giữa 6 cặp nucleotid CCC GGG
GGG CCC

EcoR I cắt DNA lệch giữa 6 cặp nucleotid G AATTC
CTTAA G

Các RE có đặc tính cắt DNA không đặc hiệu loài, nghĩa là RE tách chiết từ vi khuẩn có thể cắt DNA của tế bào động vật, thực vật và vi khuẩn khác ở cùng vị trí giới hạn hay điểm giới hạn. Số lượng và kích thước đoạn cắt dài hay ngắn, tuỳ thuộc vào số lượng điểm giới hạn trên phân tử DNA. Bản đồ trình tự các vị trí cắt bởi enzym giới hạn gọi là bản đồ giới hạn.

Mỗi loại enzym giới hạn hoạt động tốt trong những điều kiện nhất định về nhiệt độ và dung dịch đệm thích hợp. Tiến hành phản ứng của các enzym giới hạn cần thực hiện trong một thể tích càng nhỏ càng tốt để RE tiếp xúc tốt với cơ chất. Tuy nhiên thể tích của enzym giới hạn thích hợp khoảng 1/10 thể tích phản ứng.

1.1. Tên gọi các enzym giới hạn

Qui ước quốc tế các enzym giới hạn kí hiệu như sau: chữ đầu viết chữ in hoa chỉ tên chi hoặc loài vi khuẩn mà từ đó các enzym giới hạn được tách chiết. Hai chữ tiếp theo viết chữ in thường chỉ giống của vi khuẩn. Một chữ viết hoa chỉ chủng vi khuẩn, cuối cùng là chữ số la mã chỉ số thứ tự dòng vi khuẩn enzym giới hạn được phát hiện.

Ví dụ

	Chi, Loài	Giống	Chủng	Thứ tự dòng
	Escherichia	*Coli*	Ry13	
EcoR I	E	co	R	I
EcoR V	E	co	R	V
Sma I	*Serratia*	*marcesens*		
	S	ma		I
Hae III	*Hemophilus*	*aegypticus*		
	H	ae		III

1.2. Các loại enzym giới hạn

Hiện nay phát hiện có hàng nghìn enzym giới hạn được li trích từ vi khuẩn. Dựa vào khả năng nhận biết và cắt các trình tự đặc hiệu khoảng 4 - 7 cặp nucleotid người ta chia enzym giới hạn làm ba loại:

Loại thứ nhất gồm các enzym giới hạn nhận biết được trình tự đặc hiệu (vị trí giới hạn) di chuyển dọc theo DNA, đến cách vị trí giới hạn khoảng 1000 - 5000 nucleotid cắt tại đó và giải phóng độ vài chục nucleotid.

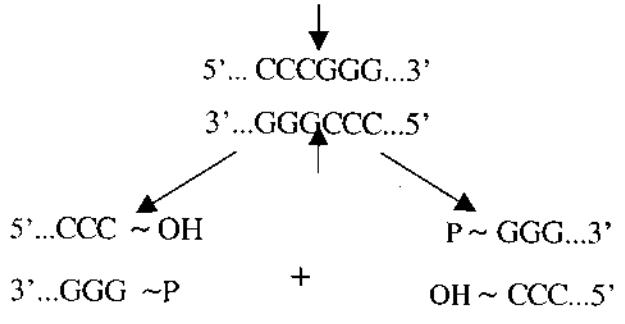
Loại thứ hai gồm các enzym giới hạn nhận biết vị trí giới hạn cắt ngay tại đó. Loại này được sử dụng nhiều trong kỹ thuật gen và công nghệ DNA tái tổ hợp.

Loại thứ ba gồm các enzym giới hạn nhận biết vị trí giới hạn và cắt ở vị trí cách đó khoảng 20 nucleotid về phía trước.

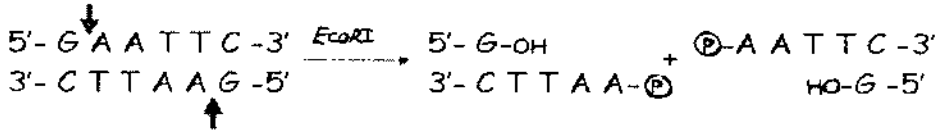
1.3. Các kiểu cắt của enzym giới hạn

Mỗi enzym giới hạn nhận biết và cắt đặc hiệu một đoạn DNA từ 4 - 6 cặp nucleotid. Nếu 4 loại nucleotid của phân tử DNA sắp xếp ngẫu nhiên có bốn kiểu sắp xếp khác nhau. Trường hợp enzym giới hạn nhận biết trình tự DNA đặc hiệu gồm bốn cặp nucleotid, cứ $4^4 = 256$ cặp nucleotid có một vị trí cắt. Khi các enzym giới hạn nhận biết trình tự DNA đặc hiệu có 6 cặp nucleotid, cứ $4^6 = 4096$ cặp nucleotid có một chỗ bị cắt. Mỗi enzym giới hạn nhận biết và cắt đặc hiệu một đoạn DNA ở những vị trí nhất định. Có hai kiểu cắt khác nhau là cắt tạo đầu bằng và cắt tạo đầu so le.

Ví dụ, enzym Sma I cắt tạo đầu bằng giữa các đoạn 6 bp

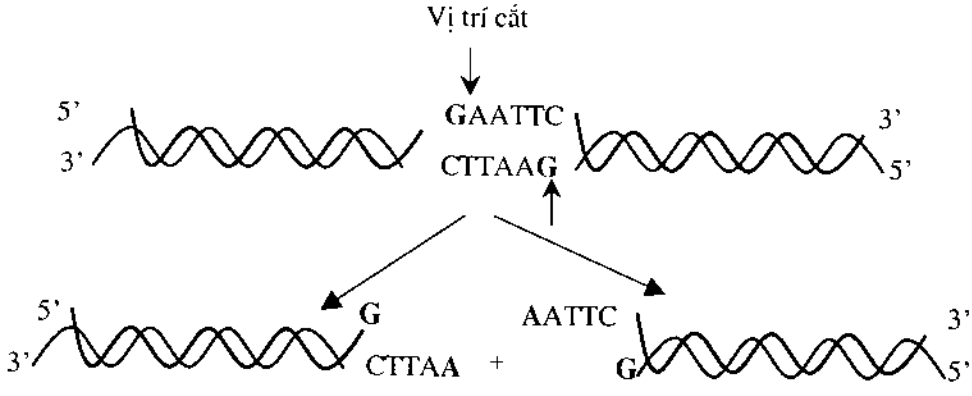


Enzym giới hạn cắt cả 2 mạch DNA cùng một điểm tạo các đầu bằng (blunt ends), các đầu bằng bị cắt của phân tử DNA không có khả năng tự kết hợp lại với nhau. Để nối các đoạn DNA với nhau cần sử dụng enzym nối - DNA ligase, hoặc các adaptor chuyên dụng cho mỗi loại enzym. Nhiều enzym giới hạn nhận biết và cắt phân tử DNA ở các vị trí lệch nhau giữa hai mạch đơn, tạo nên các đầu so le (hay đầu dính - cohesive ends). Các đầu so le tạo nên sau khi cắt có thể tự nối lại với nhau không cần sự có mặt của enzym nối DNA ligase, nhờ đặc tính này enzym giới hạn cắt đầu so le được sử dụng nhiều trong công nghệ DNA tái tổ hợp.



Hình 4.7. Vị trí cắt phân tử DNA của enzym EcoRI.

Các phân tử DNA khác nhau, được cắt bởi cùng một enzym giới hạn, có khả năng kết hợp với nhau tạo nên các phân tử DNA tái tổ hợp qua các đầu so le. Các enzym giới hạn cắt đầu so le tạo ra những đoạn DNA có các đầu so le có thể tự nối lại với nhau, hoặc nối với các đoạn DNA có các đầu tương tự nên được sử dụng rất nhiều trong công nghệ DNA tái tổ hợp.



Hình 4.8. Các đoạn DNA cắt bằng enzym EcoRI.

Khi sử dụng từng enzym giới hạn, cần có các điều kiện nhiệt độ, độ pH và dung môi thích hợp. Ví dụ, khi sử dụng enzym EcoRI để cắt DNA của tế bào động vật có thể sử dụng dung dịch đệm gồm 100mM Tris - HCl pH 7,5; 5mM $MgCl_2$; 100mg BSA/ml; 0,15% TritonX-100.

2. Một số enzym thường sử dụng trong kỹ thuật gen

2.1. Enzym polymerase

Enzym polymerase là các enzym xúc tác quá trình tái bản DNA, phiên mã tổng hợp RNA. Có nhiều loại enzym polymerase, mỗi loại có tính chất đặc trưng riêng.

Enzym DNA polymerase I (pol I) là enzym được tách chiết từ *E. coli*, xúc tác gắn vào chỗ trống (lỗ hổng) trên phân tử DNA hoặc mạch đơn DNA ngắn. Enzym Pol I xúc tác tổng hợp một mạch đơn DNA mới, đồng thời có vai trò trong sự sửa chữa sai sót trong tái bản DNA. Ngoài hoạt tính tổng hợp, enzym DNA polymerase I còn có hoạt tính exonuclease, có khả năng thuỷ phân các liên kết giữa các nucleotid từ đầu phân tử DNA, cắt rời từng nucleotid theo cả chiều 5'→ 3' và 3' → 5'. Ứng dụng của enzym DNA polymerase I chủ yếu để xác định trình tự DNA bằng phương pháp dideoxynucleotid, tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao, thiết kế các vectơ mạch đơn...

Trong thực tế enzym DNA polymerase I ít sử dụng, mà thường sử dụng một sản phẩm thuỷ phân của nó tạo thành, gọi là đoạn Klenow (Klenow fragment). Đoạn Klenow giữ được hoạt tính polymerase và exonuclease 3'→ 5', mất hoạt tính exonuclease 5'→ 3'.

Enzym T_4 DNA polymerase có nguồn gốc từ phage T_4 xâm nhiễm *E. coli*. Hoạt tính của enzym T_4 DNA polymerase tương tự đoạn Klenow, do có hoạt tính exonuclease 3'→ 5' mạnh nên được sử dụng nhiều khi tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao.

Enzym Taq polymerase li trích từ vi khuẩn *Thermus aquaticus*. Enzym Taq không hoạt động trên các phân tử RNA, có tác dụng khuếch đại sự bắt cặp tạo

cDNA (complementary DNA). Enzym Taq polymerase thường sử dụng trong nhân gen nhân tạo bằng máy PCR.

Enzym RNA polymerase: Có ba loại enzym RNA polymerase khác nhau. Được sử dụng nhiều nhất là SP_6 RNA polymerase, enzym SP_6 RNA polymerase tách chiết từ phage xâm nhiễm *Salmonella Typhimurium*. Enzym T_3 RNA polymerase và T_7 RNA polymerase được tách chiết từ phage xâm nhiễm *E. coli*, các enzym này xúc tác phiên mã tổng hợp RNA từ mạch khuôn của phân tử DNA kép theo chiều 5'→ 3', ứng dụng trong tổng hợp mẫu dò RNA và nghiên cứu phiên mã tổng hợp mRNA.

2.2. Enzyme DNA ligase

Enzym ligase là các enzym xúc tác hình thành các liên kết, nối hai đoạn acid nucleic với nhau. DNA ligase xúc tác nối hai đoạn DNA, RNA ligase xúc tác nối các đoạn RNA. Trong kỹ thuật tách dòng gen, enzym T_4 DNA ligase kết hợp với hai enzym T_4 polynucleotid kinase và Alkaline phosphatase được sử dụng rộng rãi nhất. Ngoài ra enzym *E. coli* DNA ligase được li trích từ *E. coli*, xúc tác phản ứng nối hai trình tự DNA có đầu so le.

Enzym T_4 DNA ligase tách chiết từ phage T_4 xâm nhiễm *E. coli*, chức năng giống như *E. coli* DNA ligase, có khả năng nối hai trình tự DNA đầu bằng, được ưa chuộng nhất trong kỹ thuật tách dòng gen.

Enzym T_4 RNA ligase tách chiết từ phage T_4 xâm nhiễm *E. coli*, có khả năng nối hai trình tự RNA bằng các liên kết phosphodieste.

Ngoài các dạng enzym kết nối DNA ligase, hiện nay còn sử dụng các "đầu dính" cho các enzym cắt đầu bằng, gọi là adaptor. Adaptor xúc tác nối các đoạn DNA do các enzym giới hạn cắt đầu bằng tạo nên các đầu so le, mỗi enzym cắt đầu bằng có các loại adaptor đặc trưng riêng.

2.3. Các enzym nuclease

Enzym nuclease là enzym cắt DNA (DNase), và enzym cắt RNA (RNase). Gồm những loại chủ yếu sau:

Enzym DNase I tách chiết từ tuỵ của bò, xúc tác phản ứng thuỷ phân các liên kết ngay sau một base nitơ pirimidin (T, C) trên cả mạch đơn và mạch kép, thường sử dụng để loại bỏ DNA tạp nhiễm trong các nghiên cứu RNA và nghiên cứu protein.

Nuclease S1 được trích li từ nấm *Aspegillus oryzae*. Nuclease S1 có khả năng phân cắt DNA mạch đơn và mạch kép, không có khả năng phân huỷ các phân tử lai DNA- RNA. Nuclease S1 được dùng để phân tích cấu trúc các phân tử lai DNA-RNA. Nuclease S1 còn được sử dụng để loại bỏ một đoạn đơn ở đầu so le để tạo đầu bằng, và loại bỏ các cấu trúc vòng bậc 2 (nút thòng lọng) trên phân tử RNA trong quá trình phiên mã ngược tạo cDNA.

RNase A là enzym có hoạt tính cao, có ở mọi nơi bền vững với nhiệt độ cao (ở 90^0 C không bị mất hoạt tính), enzym RNase A được li trích từ tuỵ bò. Enzym RNase A có khả năng cắt đặc trưng các liên kết phosphodieste ngay sau một base nitơ pirimidin (C và U) của RNA. Enzym RNase A thường được dùng để loại bỏ RNA trong chế phẩm DNA, hay chế phẩm protein, hoặc để loại bỏ các vùng không bắt cặp của RNA trên phân tử lai DNA- RNA.

RNase H là enzym có tác dụng loại bỏ RNA trong các phân tử lai DNA-RNA, thường được sử dụng để loại bỏ RNA sau các phản ứng phiên mã ngược, để hình thành mạch thứ hai của cDNA tạo nên phân tử DNA kép.

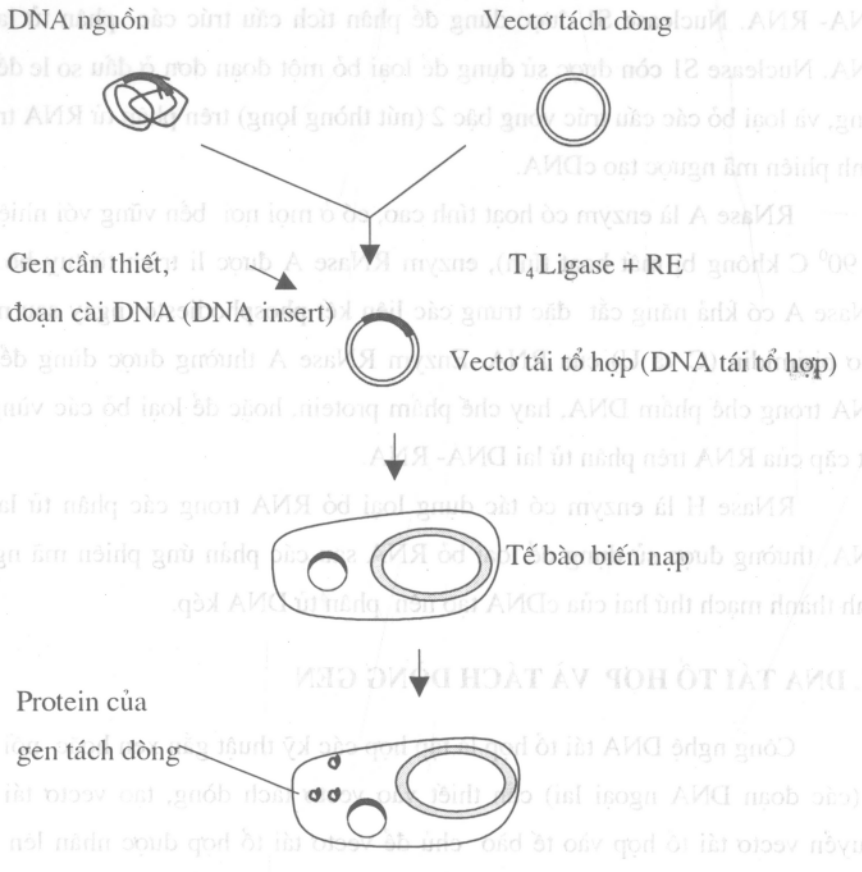
IV. DNA TÁI TỔ HỢP VÀ TÁCH DÒNG GEN

Công nghệ DNA tái tổ hợp là tập hợp các kỹ thuật gắn xen hoặc nối các gen lạ (các đoạn DNA ngoại lai) cần thiết vào vectơ tách dòng, tạo vectơ tái tổ hợp, chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ để vectơ tái tổ hợp được nhân lên với một lượng lớn bản sao trong tế bào chủ. Mỗi tế bào chủ tạo nên một dòng các tế bào chứa bản sao của một gen cần thiết, gọi là tách dòng gen (gene cloning).

1. Tách dòng gen (gene cloning)

Thực chất tách dòng gen là gắn một gen, một trình tự DNA cần thiết (DNA insert) vào vectơ tách dòng, tạo các vectơ tái tổ hợp và đưa vào tế bào nhận (tế bào chủ), nhằm thu một số lượng lớn các bản sao của gen hoặc trình tự DNA cần thiết.

Tách dòng gen còn được gọi là phân lập gen, có nhiều phương pháp tách dòng gen khác nhau. Tách dòng in vitro (in vitro gene cloning) là tách chiết các gen cần thiết từ bộ gen vi sinh vật, động vật, thực vật. . . tạo vectơ tái tổ hợp và nhân các gen đó trong tế bào chủ. Ví dụ, tách dòng gen Cry IA mã hoá protein chống một số loài sâu bệnh từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*.



Hình 4.9. Sơ đồ tổng quát công nghệ DNA tái tổ hợp và tách dòng gen.

Tách dòng in silico (in silico gene cloning) là sự tổng hợp, phân tích các kết quả tách dòng gen in vitro, dựa vào cơ sở dữ liệu từ các ngân hàng gen để chọn lựa các dòng gen ưu việt nhất, đưa vào ứng dụng trong thực tiễn sản xuất hoặc nghiên cứu tiếp.

Tách dòng in vitro gồm tách dòng gen đã biết và tách dòng gen chưa biết. Tách dòng gen đã biết là tách dòng các gen đã biết kích thước hoặc vị trí của gen trong bộ gen. Tách dòng gen chưa biết là tách dòng gen từ các sản phẩm của gen, chủ yếu từ các loại mRNA.

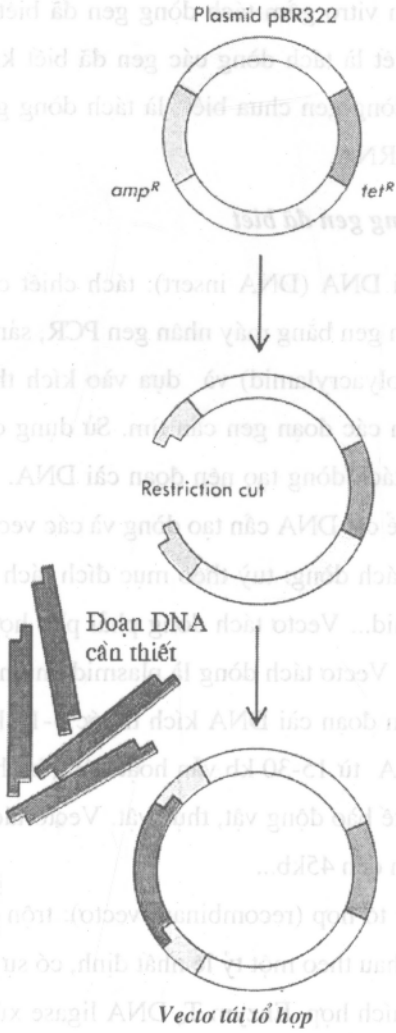
1.1. Tách dòng gen đã biết

Tạo đoạn cài DNA (DNA insert): tách chiết các gen cần tách dòng từ các mẫu nghiên cứu, nhân gen bằng máy nhân gen PCR, sản phẩm PCR được điện di trên gel agar (hoặc gel polyacrylamid) và dựa vào kích thước của gen và thang DNA chuẩn đã biết để tách các đoạn gen cần tìm. Sử dụng các cặp enzym giới hạn thích hợp cắt các gen cần tách dòng tạo nên đoạn cài DNA. Thường sử dụng cùng một cặp enzym giới hạn để cắt DNA cần tạo dòng và các vectơ tách dòng.

Chọn vectơ tách dòng: tuỳ theo mục đích tách dòng có thể chọn vectơ tách dòng là phage, plasmid... Vectơ tách dòng phải phù hợp với loại tế bào chủ và kích thước đoạn cài DNA. Vectơ tách dòng là plasmid phù hợp với tế bào chủ là tế bào vi khuẩn, có thể cho gắn đoạn cài DNA kích thước 3-10 kb. Vectơ tách dòng là phage cho gắn đoạn cài DNA từ 15-30 kb vẫn hoạt động bình thường, thích hợp với các tế bào chủ là vi khuẩn, tế bào động vật, thực vật. Vectơ tách dòng là cosmid có thể gắn các đoạn cài DNA lớn đến 45kb...

Tạo vectơ tái tổ hợp (recombinant vectơ): trộn vectơ tách dòng và các đoạn cài DNA chung với nhau theo một tỷ lệ nhất định, có sự tham gia của enzym T_4 DNA ligase hoặc adaptor thích hợp. Enzym T_4 DNA ligase xúc tác phản ứng gắn các đoạn cài DNA với vectơ tách dòng tạo nên vectơ tái tổ hợp. Chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ, bằng các phương pháp biến nạp. Trong tế bào chủ các vectơ tái tổ hợp được nhân lên số lượng rất lớn các bản sao. Thường sử dụng tế bào chủ là vi khuẩn, do vi khuẩn sinh sản nhanh, thao tác dễ và ít tốn kém.

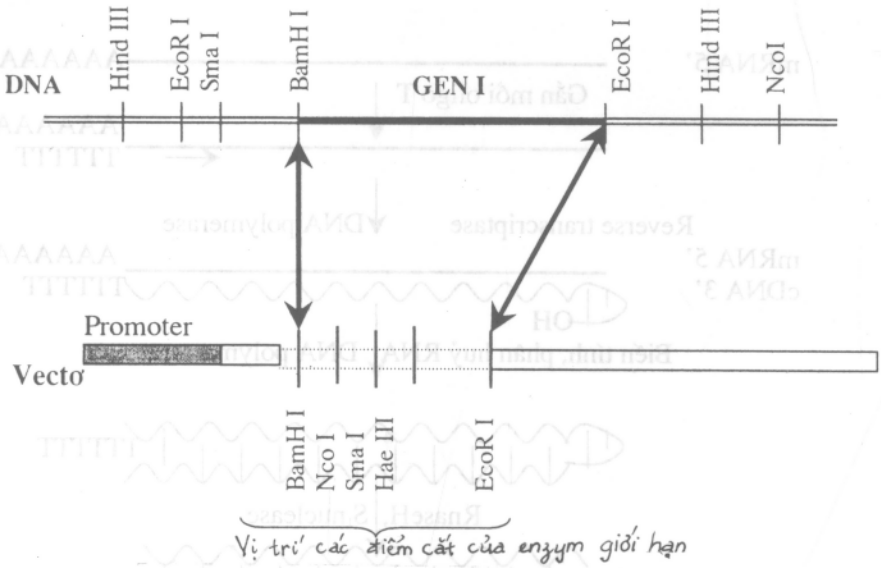
Chọn và sàng lọc các thể tái tổ hợp: Nuôi cấy vi khuẩn có vectơ tái tổ hợp được trong môi trường thích hợp, tạo nên các khuẩn lạc trên mặt thạch. Sử dụng các gen chỉ thị (marker) là chất kháng sinh, X-gal và IPTG (chất cảm ứng của operon Lac) để chọn các khuẩn lạc mang vectơ tái tổ hợp.



Hình 4.10. Sơ đồ tạo vectơ tái tổ hợp.

Ví dụ, sử dụng plasmid pBR322, gắn một gen lạ vào giữa gen Tc^R làm mất hoạt tính của kháng tetracyclin, có thể nhận biết dễ dàng. Khi sử dụng các vectơ tách dòng thuộc nhóm pUC có gen lacZ mã hoá enzym β- Galactosidase, dễ dàng nhận biết các dòng mang vectơ tái tổ hợp qua màu sắc khuẩn lạc. Bình thường tế bào vi

khuẩn phát triển trên môi trường có X- Gal tạo khuẩn lạc có màu xanh. Nếu có gen lạ gắn vào vị trí gen lacZ làm gen bị mất hoạt tính, không tạo enzym β- Galactosidase làm cho các khuẩn lạc có màu trắng dễ phân biệt. Tách và nuôi cấy riêng khuẩn lạc có vectơ tái tổ hợp đã chọn lựa, kiểm tra bằng điện di với thang DNA chuẩn hoặc giải trình tự gen, để xác định dòng vi khuẩn tái tổ hợp có mang đúng gen cần thiết tách dòng hay không. Tiếp tục nuôi cấy tạo dòng DNA tái tổ hợp mong muốn, sử dụng tuỳ mục đích nghiên cứu.



Hình 4.11. Sơ đồ cắt gắn và gen vào vectơ.

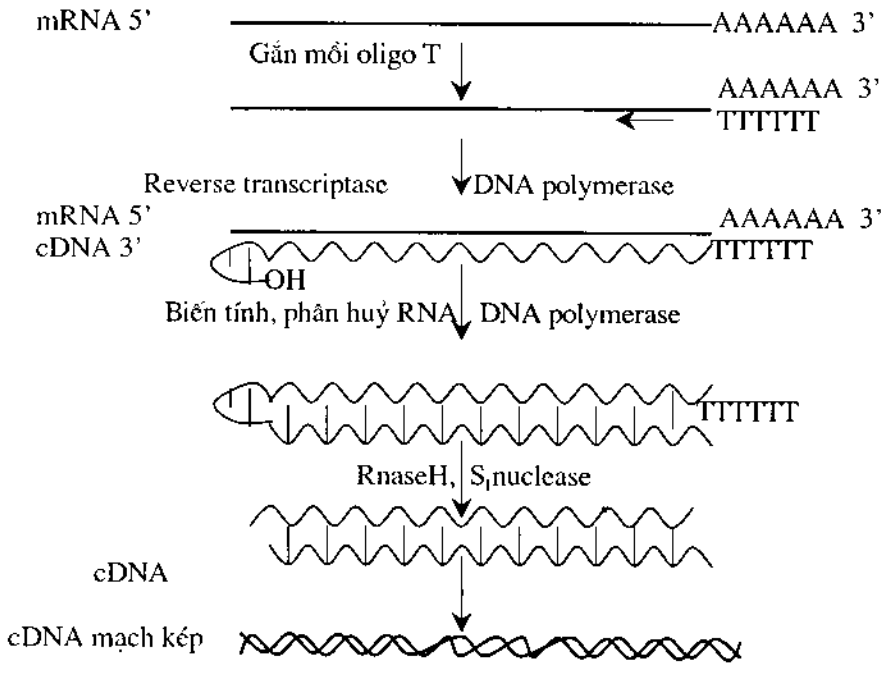
1.2. Tách dòng gen chưa biết

Protein là sản phẩm hoạt động và biểu hiện của gen. Protein có hoạt tính thường ở dạng tiền enzym, sau đó được biến đổi thành các enzym. Protein không hoạt tính là những protein dự trữ trong hạt.

Tách dòng gen chưa biết là các kỹ thuật từ mRNA, tạo nên các gen tương ứng. Dự đoán cấu trúc protein do gen chỉ huy tổng hợp, kết hợp phân tích thành phần

và trình tự sắp xếp của các acid amin trong phân tử protein do gen mã hoá trong tế bào, so sánh và xác định gen cần nghiên cứu. Tách dòng gen chưa biết từ mRNA là một quá trình phức tạp, có thể thực hiện theo các bước sau:

Tách chiết RNA tổng số bằng các phương pháp thông dụng, mRNA thường được tách bằng sắc ký ái lực trên cột oligo T- cellulose. Đuôi poly A của mRNA làm cho các phân tử mRNA bám trên bề mặt các viên bi từ có mang oligo T- cellulose. Li tâm tách mRNA ra khỏi các viên bi từ, giữ mRNA ở môi trường thích hợp nhiệt độ - 85 ^{0}C cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4.12. Sơ đồ tách dòng gen chưa biết.

Tạo DNA bổ sung (cDNA - complementary DNA), tiến hành giống như tách dòng gen. Dùng enzym phiên mã ngược RT (Reverse transcriptase) và enzym DNA polymerase để tổng hợp DNA trên khuôn mẫu mRNA. Kỹ thuật RT - PCR, từ một

lượng nhỏ mRNA ban đầu bằng PCR tạo nên một lượng lớn cDNA gọi là tách dòng cDNA.

Hiện nay, sử dụng bộ kit RACE - nhân nhanh vùng cuối của cDNA (Rapid Amplification of cDNA End) và các bộ kit đặc hiệu, có thể nhân nhanh cDNA. Nhân gen từ cDNA mạch kép bằng máy PCR để tạo dòng cDNA. Tạo vectơ tái tổ hợp với cDNA, gắn cDNA vào vectơ tách dòng thích hợp để tạo vectơ tái tổ hợp có cDNA. Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn, nuôi cấy và kiểm tra gen đó có hoạt động hay không.

2. Ngân hàng cDNA (cDNA bank)

Bộ gen của sinh vật nhân chuẩn có kích thước rất lớn, gồm DNA mã hoá các protein, enzym, một phần DNA rất lớn không mang mã thông tin di truyền và một số gen chưa rõ chức năng. Trong mỗi tế bào của cơ thể có tất cả các gen trong bộ gen. Các tế bào, mô khác nhau có các gen hoạt động ở từng giai đoạn khác nhau. Một số gen chỉ hoạt động ở những nhóm tế bào, hoặc mô nhất định như gen mã hoá hormon sinh trưởng chỉ hoạt động trong các tế bào thuỳ trước tuyến yên...

Tách chiết mRNA của các tế bào, các mô khác nhau thu được các nhóm mRNA khác nhau. Do mỗi gen hoạt động và biểu hiện ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển cá thể, cùng một loại tế bào tách chiết mRNA ở các thời điểm khác nhau cũng thu được các mRNA khác nhau.

Từ mRNA sử dụng enzym phiên mã ngược và các kit chuyên dụng để tổng hợp cDNA. Tập hợp toàn bộ mRNA thu được từ một tế bào, ở các giai đoạn phát triển khác nhau để tạo tập hợp cDNA gọi là ngân hàng cDNA. Ngân hàng cDNA được thiết lập từ gen hoạt động, được phiên mã thành mRNA nên có tính đặc trưng cao. ở các giai đoạn phát triển khác nhau mRNA được biểu hiện khác nhau, do đó cần tiến hành tách chiết mRNA trong nhiều giai đoạn mới tập hợp được đầy đủ mRNA của tế bào. Thiết lập ngân hàng cDNA gồm nhiều giai đoạn:

- Tách chiết mRNA theo các phương pháp thông dụng.

- Tổng hợp DNA bổ sung (cDNA): sử dụng kỹ thuật RT - PCR với enzym phiên mã ngược và các bộ kit chuyên dụng, sau đó tổng hợp các loại cDNA từ các loại mRNA tương ứng.

- Tạo vectơ tái tổ hợp: xử lí cDNA và vectơ tách dòng cùng một cặp enzym giới hạn thích hợp, enzym T_4 DNA ligase gắn cDNA vào vectơ tách dòng tạo nên các vectơ tái tổ hợp. Các plasmid thế hệ thứ 3 như pUC, Gemini, Bluescript... thường được dùng làm vectơ tách dòng.

- Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ: dòng vi khuẩn được chọn làm tế bào chủ được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để tăng mật độ tế bào, ủ các tế bào vi khuẩn với cDNA và $CaCl_2$ trong điều kiện lạnh, ở nhiệt độ lạnh màng tế bào vi khuẩn dễ thấm DNA lạ. Nuôi cấy các tế bào vi khuẩn đã được biến nạp một thời gian ngắn ở môi trường lỏng, sau đó cấy truyền trên môi trường thạch ở các nộp petri. Dùng phương pháp kháng thể hoặc các oligonucleotid tổng hợp để phát hiện các khuẩn lạc có mang vectơ tái tổ hợp.

Tập hợp tất cả các dòng vi khuẩn mang các đoạn cDNA khác nhau, tạo nên thư viện cDNA. Thư viện cDNA ứng dụng để nghiên cứu biểu hiện của một gen, quá trình điều hoà hoạt động gen, mối tương tác giữa các gen...

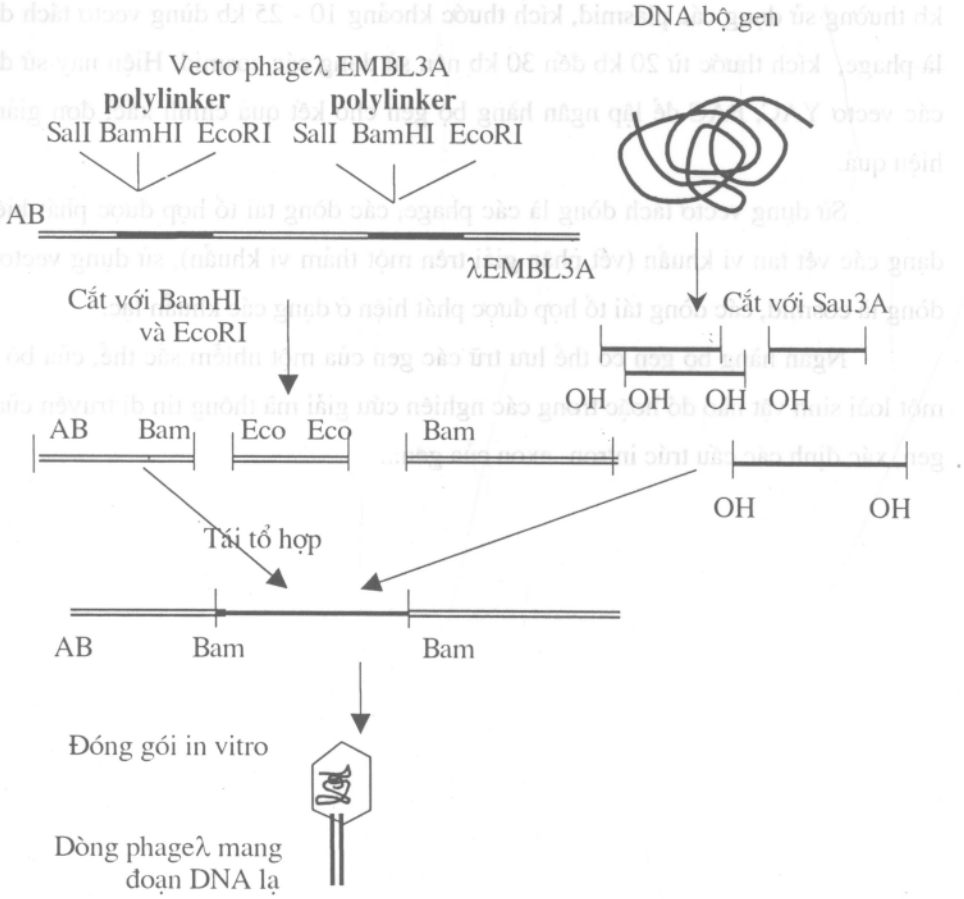
3. Ngân hàng bộ gen (genome bank)

Bộ gen được cắt bằng một số loại enzym giới hạn tạo các đoạn DNA khác nhau, mỗi đoạn DNA được gắn vào một vectơ tách dòng và nhân dòng trong một dòng vi khuẩn khác nhau. Mỗi dòng vi khuẩn mang một đoạn DNA bộ gen, tập hợp tất cả các dòng vi khuẩn gọi là ngân hàng bộ gen. Ngân hàng cDNA được hình thành từ các mRNA của mỗi gen, nên chỉ gồm các đoạn exon. Ngân hàng bộ gen bao gồm các đoạn DNA có các exon xen kẽ intron. Ví dụ, sử dụng enzym giới hạn EcoRI để cắt bộ gen vi khuẩn *E. coli* thành tập hợp các đoạn DNA. Giả thiết độ lớn trung bình mỗi đoạn là 4kb. Bộ gen *E. coli* có kích thước $4,7 \times 10^6$ có thể được cắt thành $(4,7 \times 10^6)/4 \times 10^3 = 1175$ đoạn, mỗi đoạn được gắn vào một vectơ và nhân trong 1 tế bào chủ (cần 1175 tế bào chủ) tạo thành ngân hàng bộ gen *E. coli* gồm 1175 dòng tế bào khác nhau.

Cùng một bộ gen xử lí bằng các enzym giới hạn khác nhau tạo nên số đoạn cắt khác nhau, hình thành các ngân hàng bộ gen khác nhau.

Thiết lập ngân hàng bộ gen gồm các bước cơ bản sau:

- Tách chiết DNA tổng số của tế bào.
- Tạo đoạn cài DNA (DNA insert) bằng các enzym giới hạn thích hợp (thường dùng BamHI và Sau3AI), cắt DNA bộ gen thành từng đoạn có kích thước xác định, và xử lí các đầu cắt để chúng không tự nối lại với nhau.



Hình 4.13. Sơ đồ thiết lập ngân hàng bộ gen .

- Tạo vectơ tái tổ hợp: gắn các đoạn DNA đã xử lý vào các vectơ tách dòng thích hợp hình thành các vectơ tái tổ hợp.

- Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào nhận, nuôi cấy các tế bào nhận trên môi trường có agar hình thành nên những dòng (clone).

- Chọn lọc (screening) các khuẩn lạc nhờ các gen chỉ thị (gen marker) được cài sẵn trong các vectơ, để lựa chọn các dòng tế bào mang vectơ tái tổ hợp.

Tuỳ theo kích thước của các đoạn cài DNA (đoạn DNA insert) có thể chọn vectơ tách dòng là plasmid, phage, cosmid. Đoạn cài DNA có kích thước nhỏ hơn 10 kb thường sử dụng các plasmid, kích thước khoảng 10 - 25 kb dùng vectơ tách dòng là phage, kích thước từ 20 kb đến 30 kb nên sử dụng các cosmid. Hiện nay sử dụng các vectơ YAC, BAC để lập ngân hàng bộ gen cho kết quả chính xác, đơn giản và hiệu quả.

Sử dụng vectơ tách dòng là các phage, các dòng tái tổ hợp được phát hiện ở dạng các vết tan vi khuẩn (vết phân giải trên một thảm vi khuẩn), sử dụng vectơ tạo dòng là cosmid, các dòng tái tổ hợp được phát hiện ở dạng các khuẩn lạc.

Ngân hàng bộ gen có thể lưu trữ các gen của một nhiễm sắc thể, của bộ gen một loài sinh vật nào đó hoặc trong các nghiên cứu giải mã thông tin di truyền của bộ gen, xác định các cấu trúc intron- exon của gen...

Chương 5

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP CƠ BẢN SỬ DỤNG TRONG KỸ THUẬT GEN

I. PHƯƠNG PHÁP NHÂN GEN BẰNG PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

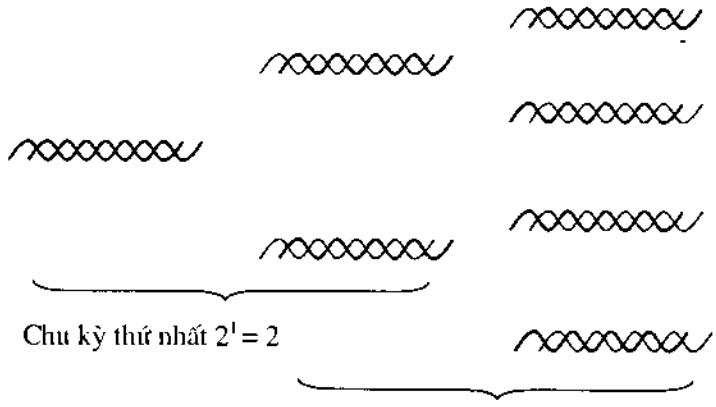
Phương pháp PCR (phản ứng chuỗi polymerase) do Karl Mullis và cộng sự phát minh 1985. Nhờ enzym DNA polymerase xúc tác, trên các mạch khuôn DNA tổng hợp nên các mạch đơn mới. Các mạch đơn mới được tổng hợp lại được sử dụng làm khuôn cho quá trình tổng hợp mạch mới của chu kỳ tiếp theo. Sự tổng hợp mạch đơn DNA mới cần có sự tham gia của DNA mồi tạo các nhóm 3' OH tự do. Các nucleotid được gắn ở vị trí nhóm OH kéo dài tạo thành mạch đơn mới.

Khi các đoạn DNA mồi bắt cặp bổ sung ở hai đầu của mạch khuôn, đoạn DNA nằm giữa hai DNA mồi có thể tổng hợp được. Các đoạn DNA mới được tổng hợp, được sử dụng làm khuôn tổng hợp đoạn DNA mới. Sau một số chu kỳ số lượng DNA được nhân lên theo cấp số nhân, từ một gen hoặc một trình tự DNA có thể được nhân lên vô số bản sao.

Đoạn khuôn có vai trò rất quan trọng trong kỹ thuật nhân gen qua PCR. Đoạn khuôn có thể là DNA mạch kép, mạch đơn hoặc RNA. Hàm lượng khuôn ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả PCR. Sử dụng khuôn là DNA tổng số tách chiết từ các tế bào nghiên cứu cần khoảng 1 microgram DNA (1 μg), nếu là DNA tách dòng cần khoảng 1 nanogram (1 ng = 10^{12} gram).

Mồi (primer) là những đoạn oligonucleotid mạch đơn có kích thước khoảng 6 - 100 bp, có trình tự bắt cặp bổ sung với trình tự ở hai đầu mạch khuôn. Mồi càng dài

khả năng tổng hợp mạch DNA mới càng chính xác. Ngược lại, khi mồi ngắn quá sự bắt cặp giữa mồi và khuôn thuận lợi, nhưng kết quả PCR kém độ chính xác. Có hai loại mồi là mồi xuôi (sense primer) và mồi ngược (antisense primer) tham gia phản ứng PCR.



... Chu kỳ thứ n tạo nên 2^n phân tử DNA

Hình 5.1. Sơ đồ phản ứng PCR.

Mồi xuôi bắt cặp và gắn ở đầu 3' của mạch khuôn 5'→3', mồi ngược bắt cặp bổ sung gắn ở đầu 3' của mạch khuôn 3'→5'. Mồi ảnh hưởng rất nhiều đến hiệu quả của phản ứng PCR, để đảm bảo hiệu quả PCR cần chọn các mồi xuôi và mồi ngược có các trình tự không bổ sung với nhau tránh xảy ra hiện tượng tự bắt cặp giữa các mồi. Các mồi có kích thước ít khác nhau, có Tm gần giống nhau hiệu quả PCR được tăng cường. Hiệu quả PCR cao khi có mồi phù hợp với khuôn (template) và khoảng cách giữa mồi xuôi và mồi ngược không quá 1kb.

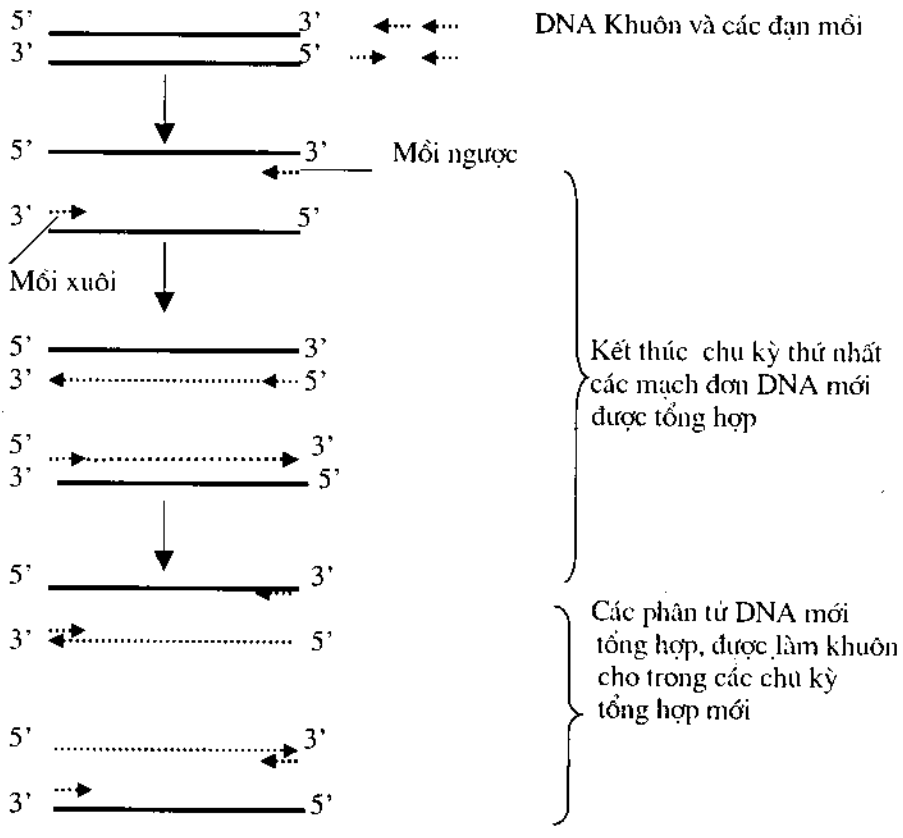
Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ (cycle) nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba giai đoạn:

- Giai đoạn biến tính: Dung dịch phản ứng (buffer) cần phải có đầy đủ các thành phần cần thiết cho tái bản DNA (dNTP, enzym DNA polymerase, Mg^{++}...). Phân tử DNA được biến tính ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nóng chảy (Tm) của DNA

khuôn một ít, thường là 94 - 95 °C trong 30 giây đến 1 phút. Nếu đoạn khuôn DNA có tỷ lệ G - C cao, chuỗi G, C liền nhau dài cần tính toán để có nhiệt độ phù hợp.

1. Các bước tiến hành PCR

- Giai đoạn lai: Nhiệt độ hạ thấp dưới Tm của các mồi, các mồi bắt cặp với khuôn. Thường ở chế độ nhiệt khoảng 60 °C - 70 °C, tuỳ thuộc độ lớn và Tm của các mồi, thời gian từ 30 giây đến 1 phút.



Hình 5.2. Sơ đồ phản ứng PCR.

- Giai đoạn tổng hợp: ở 72 °C các enzym DNA polymerase hoạt động tốt nhất (thường dùng Taq DNA polymerase tách chiết từ vi khuẩn suối nước nóng

Thermocellus aquaticus). Thời gian khoảng từ 30 giây đến vài chục phút, tuỳ thuộc kích thước của trình tự DNA cần khuếch đại. Sau 25 đến 35 chu kỳ từ một đoạn DNA khuôn, khuếch đại đến 2^{25}- 2^{35} bản sao. Trong quá trình PCR, sau những chu kỳ đầu, ở các chu kỳ cuối nhiệt độ cần tăng lên 1 - 2 °C. Do về sau lượng mồi giảm lượng khuôn tăng lên, mặt khác enzym Taq DNA polymerase hoạt động yếu dần do tác động của nhiệt độ, vì vậy tăng nhiệt độ ở các chu kỳ sau để làm tăng hiệu quả tổng hợp DNA.

2. Các nhân tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR

Khuôn DNA có vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả PCR. Phản ứng PCR tối ưu với các đoạn khuôn hoàn toàn tinh sạch, khi các đoạn khuôn không sạch còn lẫn protein, hiệu quả PCR giảm theo tỷ lệ thuận với độ tinh sạch của DNA khuôn.

Enzym DNA polymerase càng mạnh, phản ứng PCR càng triệt để. Tuỳ các đặc tính của enzym DNA polymerase, tuỳ thuộc nguồn gốc tách chiết enzym, hiệu quả các phản ứng PCR khác nhau. Enzym Th. polymerase có khả năng hoạt động như một enzym phiên mã ngược, còn enzym Taq polymerase xúc tác phản ứng khuếch đại DNA.

Mồi là yếu tố quan trọng nhất quyết định hiệu quả của phản ứng PCR. Chọn mồi cần tính toán bảo đảm Tm của mồi xuôi và mồi ngược không chênh lệch nhau quá lớn, các mồi phải có trình tự nucleotid để chỉ có thể bắt cặp bổ sung ở hai đầu của các mạch khuôn, nếu mồi bắt cặp giữa khuôn PCR không thành công. Trình tự DNA cần khuếch đại, là trình tự nằm giữa hai mồi không lớn quá 1kb. Hiện nay, các loại mồi chuyên dụng được sản xuất và bán ở nhiều công ty kỹ thuật sinh học. Ví dụ, sử dụng phản ứng PCR để nhân gen chống bệnh đạo ôn ở lúa (gen chống bệnh đạo ôn lúa nằm trên nhiễm sắc thể số 12), có thể dùng cặp mồi có trình tự như sau:

$$\begin{cases} \text{CAGCTGTTCAGTCGTTTGCAGCTGTTC} & \text{27 nucleotid} \\ \text{ATACCGTTATGGGCATTAAGGAAT} & \text{24 nucleotid} \end{cases}$$

Để nhân gen kháng bệnh bạc lá lúa nằm (gen kháng bệnh bạc lá, nằm trên nhiễm sắc thể 21 của cây lúa), thường sử dụng cặp mồi ký hiệu Xa21 (pTA-248):

$$\begin{cases} \text{AGACGCGGAAGGGTGGTTCCCGAG} & \text{24 nucleotid} \\ \text{AGCGCGGTGTAATCGAAAGATGAAA} & \text{25 nucleotid} \end{cases}$$

Nồng độ các loại nucleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) khoảng 20 - 200 μM/ mỗi loại, khi nồng độ nucleotid quá thấp giảm hiệu quả PCR giảm mạnh. Nồng độ Mg^{++}, $MgCl_2$ ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả PCR, để có hiệu quả PCR cao cần lưu ý đảm bảo các thành phần dung dịch đệm, nhiệt độ và các chất cần thiết khi thực hiện phản ứng PCR.

II. PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ GEN (DNA SEQUENCING)

1. Giải trình tự gen theo phương pháp hoá học

Năm 1977 Alan Maxam và Walter Gilbert lần đầu tiên phát minh phương pháp giải trình tự gen theo phương pháp hoá học. Phương pháp của Maxam và Gilbert dựa trên cơ sở biến tính phân tử DNA thành các mạch đơn không tự xoắn lại với nhau, đánh dấu đồng vị phóng xạ P^{32} đầu 5' của mạch đơn tạo các đoạn đánh dấu có thể được phát hiện bằng phóng xạ. Xử lí hoá học đặc hiệu phân huỷ đặc trưng một loại nucleotid của mạch DNA đã đánh dấu phóng xạ, tạo các đoạn oligonucleotid có chiều dài hơn kém nhau một nucleotid được phát hiện bằng điện di. Kết quả các phản ứng hoá học xử lí mạch DNA được phát hiện bằng điện di trên gel polyacrylamid, có thể xác định trình tự các mạch đơn.

Mạch đơn đã đánh dấu phóng xạ có thể xử lí theo bốn nhóm phản ứng:

- Nhóm phản ứng thứ nhất xử lý mạch đơn DNA bằng dimethyl sulfat làm đứt mạch đơn tại G.

- Nhóm phản ứng thứ hai xử lý mạch đơn DNA bằng acid pH = 2 gây đứt mạch đơn tại A hoặc G.

- Nhóm phản ứng thứ ba xử lý mạch đơn DNA bằng hydrazin gây đứt mạch đơn tại C và T

- Nhóm phản ứng thứ tư xử lý mạch đơn DNA bằng hydrazin với nồng độ muối cao làm mạch đơn bị đứt C.

Kết quả các phản ứng tạo thành các đoạn DNA cắt ngẫu nhiên, có kích thước khác nhau. Điện di kết quả được trên gel polyacrylamid, đọc kết quả điện di bằng phóng xạ tự ghi, thu được trình tự của các nucleotid của mạch đơn DNA.

Ví dụ, đoạn mạch đơn DNA đánh dấu phóng xạ P^{32} đầu 5' ở nucleotide A có trình tự: 5' P^{32} ACACTGCGTT GGAACC 3'

Kết quả phản ứng nhóm 1 cắt mạch đơn DNA tại G

P^{32} ACACT
P^{32} ACACTGC
P^{32} ACACTGCGTT
P^{32} ACACTGCGTTG
P^{32} ACACTGCGTTGGAACC
} Cắt tại G

Kết quả phản ứng nhóm 2 cắt mạch đơn DNA tại A hoặc G

P^{32} AC
P^{32} ACACTGCGTTGG
P^{32} ACACTGCGTTGGA
} Cắt tại A

P^{32} ACACT
P^{32} ACACTGC
P^{32} ACACTGCGTT
P^{32} ACACTGCGTTG
P^{32} ACACTGCGTTGGAACC
} Cắt tại G

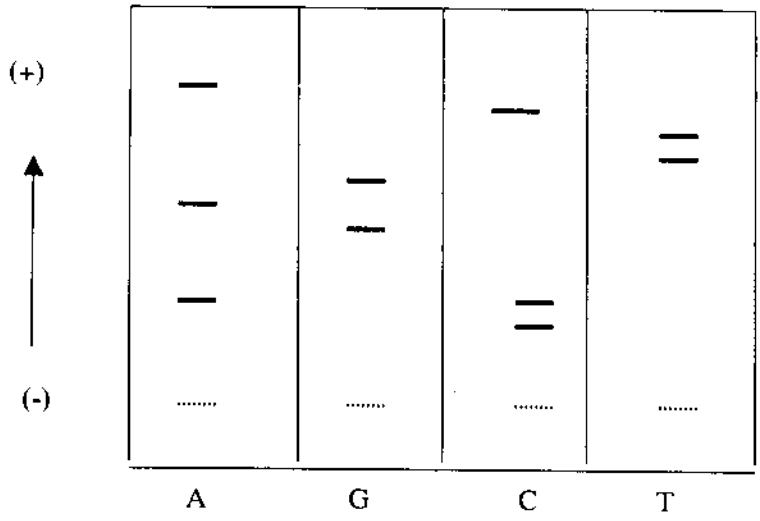
Kết quả phản ứng nhóm 3 cắt mạch đơn DNA tại C và T

P^{32} A
P^{32} ACA
P^{32} ACACTG
P^{32} ACACTGCGTTGGAA
} Cắt tại C

P^{32} ACACTGCGTTGGAAC

P^{32} ACAC
P^{32} ACACTGCG
P^{32} ACACTGCGT
P^{32} ACACTGCGTT GGAACC

} Cắt tại T



Hình 5.3. Giải trình tự gen theo phương pháp hoá học.

Kết quả phản ứng nhóm 3 cắt mạch DNA tại C

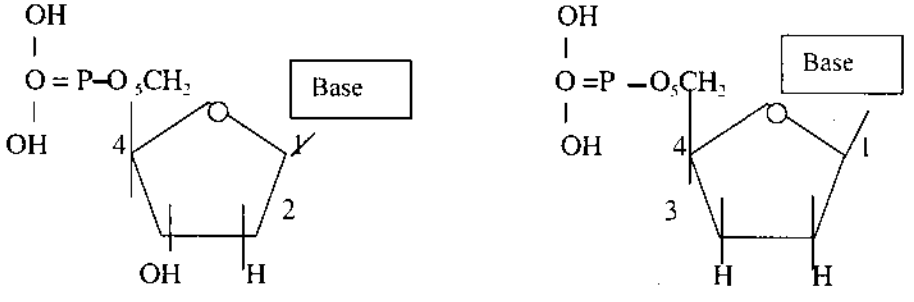
P^{32} A
P^{32} ACA
P^{32} ACACTG
P^{32} ACACTGCGTTGGAA
P^{32} ACACTGCGTTGGAAC
P^{32} ACACTGCGTT GGAACC

Tổng hợp các kết quả, thu được trình tự các nucleotid trên mạch đơn DNA, biết được trình tự sắp xếp các nucleotid của gen.

2. Giải trình tự gen theo phương pháp dideoxy

Frederick Sanger và cộng sự là phát minh phương pháp giải trình tự gen bằng enzym hay phương pháp dideoxy (1977), các tác giả lần đầu tiên giải trình tự hoàn chỉnh bộ gen của phage φ X174 xâm nhiễm tế bào *E. coli*, Frederick Sanger cùng với Maxam và Gilbert được nhận giải Nobel 1980.

Nguyên tắc cơ bản của phương pháp dideoxy dựa vào hoạt động của enzym DNA polymerase trong quá trình tổng hợp DNA. Enzym DNA polymerase xúc tác gắn các nucleotid vào mạch đơn DNA đang tổng hợp ở vị trí 3'OH, khi gặp nucleotid không có nhóm 3' OH phản ứng tổng hợp bị dừng lại.



Cấu trúc dNTP **Cấu trúc ddNTP**

Hình 5.4. Cấu trúc dNTP và ddNTP.

Đặc trưng của phương pháp dideoxy là sử dụng dideoxynucleotid để làm ngừng các mạch đơn DNA đang được tổng hợp một cách ngẫu nhiên . Trong phản ứng sử dụng đoạn DNA mồi là đoạn mạch đơn khoảng 20 nucleotid, bốn loại deoxynucleotid (dNTP) bình thường và bổ sung khoảng 1% một loại dideoxy-nucleotid ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) cho mỗi loại phản ứng. Các dideoxynucleotid mất hai nguyên tử oxy ở C_3 và C_2. Khi mạch đơn DNA đang tổng

hợp được gắn một ddNTP phản ứng tổng hợp ngừng lại, không có nhóm 3'OH ở nucleotid cuối cùng do đó mạch đang tổng hợp không được tiếp tục kéo dài.

Mỗi loại phản ứng được thực hiện riêng rẽ có DNA khuôn, DNA mồi, đầy đủ các loại dNTP, enzym Taq DNA polymerase, dung dịch đệm và các điều kiện thích hợp đồng thời có thêm khoảng 1% một loại ddNTP. Tương quan giữa hàm lượng dNTP và ddNTP làm cho quá trình tổng hợp DNA thỉnh thoảng mới có 1 ddNTP được sử dụng ngẫu nhiên, làm phản ứng tổng hợp DNA ngừng lại. Kết quả phản ứng tổng hợp nên các đoạn oligonucleotid dài ngắn khác nhau một nucleotid, có thể nhận biết nhờ phương pháp điện di.

Ví dụ, mạch đơn của gen 5' S^{35}**AGTCCCAGATCGG 3'**.

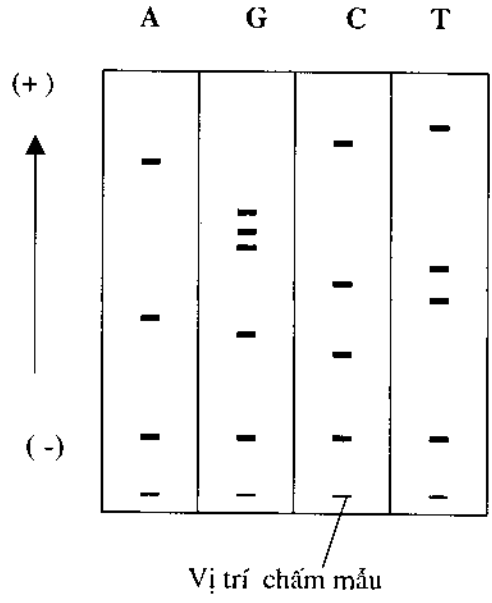
Kết quả phản ứng loại **A**

TCAdd
TCAGGGTCTAdd
TCAGGGTCTAGCC

Kết quả phản ứng loại **G**
TCAGdd
TCAGGdd
TCAGGGdd
TCAGGGTCTAGdd
TCAGGGTCTAGCC

Kết quả phản ứng loại **C**
TCdd
TCAGGGTCdd
TCAGGGTCTAGCdd
TCAGGGTCTAGCCdd

Kết quả phản ứng loại **T**
Tdd
TCAGGGTdd
TCAGGGTCTdd
TCAGGGTCTAGCC



Hình 5.5. Sơ đồ giải trình tự gen theo phương pháp F. Sanger.

Thực hiện bốn phản ứng trong 4 ống khác nhau (thường dùng các ống effpendof), mỗi ống có chứa khuôn, mồi, bốn loại dNTP có một loại được đánh dấu phóng xạ (S^{35}- dATP, dGTP, dCTP, dTTP), enzym và các điều kiện thích hợp. ống A thêm 1% ddATP, ống G thêm 1% ddGTP, ống C thêm 1% ddCTP, ống T thêm 1% ddTTP. Sau khi nhân gen qua PCR khoảng 25 — 30 chu kì, điện di kết quả thu được trên gel polyacrylamid. Các đoạn oligonucleotid kích thước khác nhau di chuyển với tốc độ khác nhau, tạo nên các vị trí khác nhau trên bản gel, thực hiện phản ứng hiện hình phóng xạ có thể quan sát được các đoạn mạch đơn DNA bằng các vạch trên bản gel. Tổng hợp kết quả phản ứng ở bốn ống thu được trình tự các nucleotid của mạch đơn, có thể biết trình tự sắp xếp các nucleotid trong gen.

Tuỳ theo mục đích giữ mẫu, người ta có thể sử dụng đồng vị phóng xạ S^{35} hoặc P^{32} để đánh dấu phóng xạ đoạn mạch khuôn. Sử dụng S^{35} thời gian mất hoạt tính khoảng 3 tháng, còn P^{32} khoảng 14 ngày.

3. Giải trình tự gen bằng máy giải trình tự gen tự động

Nguyên tắc chung của máy giải trình tự gen tự động dựa trên cơ sở phương pháp dideoxy. Máy đọc trình tự cả trên hai mạch đơn, do vậy có thể phát hiện và giảm các nhầm lẫn do kỹ thuật. Có hai loại mồi xuôi (primer forward) và mồi ngược (primer reverse) được sử dụng cho mỗi mạch đơn DNA. Tiến hành biến tính DNA trong môi trường có urea và nhiệt độ cao (khoảng 55 °C), hai mạch đơn DNA tách rời nhau không bắt cặp lại với nhau. Chùm tia laser đánh dấu vị trí và thời gian đi qua của các nucleotid, từ đó tổng hợp được trình tự sắp xếp của gen.

Các máy giải trình tự gen thông dụng của các hãng ALF II (Pharmacia), Simadu (Nhật)...có kèm phần mềm sử lý số liệu, kit hoá chất tiêu chuẩn bán sẵn. Giải trình tự gen cần tuỳ theo từng loại máy giải trình tự để tạo dung môi và các điều kiện thích hợp, đảm bảo độ chính xác của hết quả. Ví dụ, chuẩn bị giải trình tự gen trên máy ALFress II cần chuẩn bị các bước sau:

Bước 1: Chuẩn bị Master mix

- nước khử ion 3µl

- DNA khuôn	2µl (DNA tách chiết đã tinh sạch)
- Dung dịch đệm	2µl
- dNTP	5µl
- Mồi xuôi	2µl (0,5ml mồi+1,5ml đệm cho mồi)
- DMSO	2µl
- Taq DNA polymerase	2µl
	Tổng số 18µl

Bước 2: Thực hiện phản ứng nhân gen qua máy PCR

Dùng bốn ống effpendof đã đánh dấu các ống A, T, C, G cho vào mỗi ống 4µ Master mix đã chuẩn bị, thêm vào mỗi ống 2µl một loại ddNTP tương ứng với mỗi ống. Chuẩn bị tương tự, thay mồi xuôi bằng mồi ngược thu được 4 ống có mồi ngược. Đặt 8 ống đã có đầy đủ các thành phần cần thiết nhân gen trong máy PCR. Chu trình nhiệt cho PCR: 95°C trong 2 phút; 95°C trong 30 giây, 52 - 53 °C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút 30 giây. Số chu kỳ khoảng 24 — 25. Kết thúc PCR, cho thêm vào mỗi ống 4µl dung dịch kết thúc phản ứng (stop solution), để trong khay đá khoảng 30 phút.

Bước 3: Chạy máy giải trình tự và xử lí kết quả

Chuẩn bị bản gel polyacrylamid, đặt các chế độ cho máy, bơm mẫu vào các giếng trên bản gel và chạy máy. Kết thúc chạy máy thu kết quả, xử lí bằng các phần mềm thích hợp. Lưu ý so sánh kết quả giải trình tự cả hai mạch đơn để loại bỏ các sai sót do kỹ thuật.

III. CÁC PHƯƠNG PHÁP LAI PHÂN TỬ

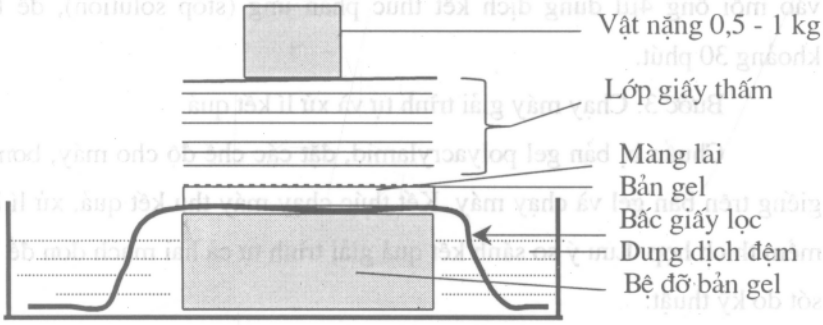
1. Phương pháp Southern blot

Phương pháp Southern blot do Edward Southern phát minh năm 1975, cho phép nghiên cứu DNA của bộ gen, kiểm tra kết quả chuyển gen hoặc kiểm tra có mặt một gen (một trình tự DNA) nào đó trong bộ gen của tế bào. Đầu tiên cần tách chiết

DNA bộ gen của tế bào, sử dụng các enzym giới hạn cắt phân tử DNA thành các đoạn nhỏ, điện di trên gel agar để tách các đoạn DNA theo kích thước. Gây biến tính DNA trên gel bằng dung dịch kiềm (thường dùng NaOH 0,5 M: NaCl 1,5 M), sau đó chuyển các đoạn DNA từ bản gel lên màng lai bằng sức mao dẫn (màng lai thường sử dụng là màng nitrocellulose). Vị trí của các đoạn DNA trên gel, được giữ nguyên khi chuyển lên màng lai.

Sử dụng các mẫu dò (probe) có đánh dấu phóng xạ lai với các đoạn DNA trên màng lai, tạo nên các phân tử DNA lai. Tiến hành lai phân tử bằng cách cho vào hộp lai chuyên dụng một lớp khoảng 0,2- 0,4 cm dịch lai, chứa mồi có đánh dấu phóng xạ. Đặt màng lai vào hộp lai ở nhiệt độ 65 °C trong 3- 8 giờ, sau đó thêm dịch lai với chế độ nhiệt 65 °C, lắc nhẹ để tăng tốc độ phản ứng. Rửa màng lai bằng dung dịch SSC (NaCl, natri citrat, và nước) ở nhiệt độ 65 °C hai đến ba lần, thấm khô bằng giấy lọc hoặc sấy khô ở 65 °C.

Thực hiện phóng xạ tự ghi bằng phim X quang nhạy ở nhiệt độ - 20 °C, xử lý dưới ánh sáng tử ngoại trong 4 giây để kiểm tra kết quả lai.



Hình 5.6. Sơ đồ phương pháp lai Southern blot.

Năm 1990, Ishii thuộc Viện Lúa Quốc tế đề nghị cải tiến phương pháp Southern blot không dùng đồng vị phóng xạ, bằng cách sử dụng digoxigenin. Các

phân tử lai được phát hiện bằng kháng thể của digoxigenin có gắn với enzym photphatase kiềm.

2. Phương pháp Northern blot

Phương pháp lai Northern blot là phương pháp lai RNA của tế bào với mẫu dò là DNA. Nguyên tắc thực hiện giống như lai Southern blot. Tách chiết và tinh sạch RNA của tế bào, gây biến tính RNA và chuyển lên màng lai. Sử dụng các mẫu dò là DNA có đánh dấu phóng xạ để lai với RNA tạo nên các phân tử lai RNA - DNA, phát hiện các phân tử lai bằng phim X quang nhạy.

3. Lai tại chỗ (in situ hybridization)

Lai tại chỗ là phương pháp lai phân tử ngay trong tế bào không cần tách chiết acid nucleic, dễ thực hiện và ít tốn kém hơn lai Southern blot. Lai tại chỗ thường sử dụng mẫu dò được đánh dấu bằng huỳnh quang thay cho mẫu dò đánh dấu phóng xạ. Tuỳ từng loại tế bào và mô có thể thực hiện các phương pháp lai tại chỗ khác nhau.

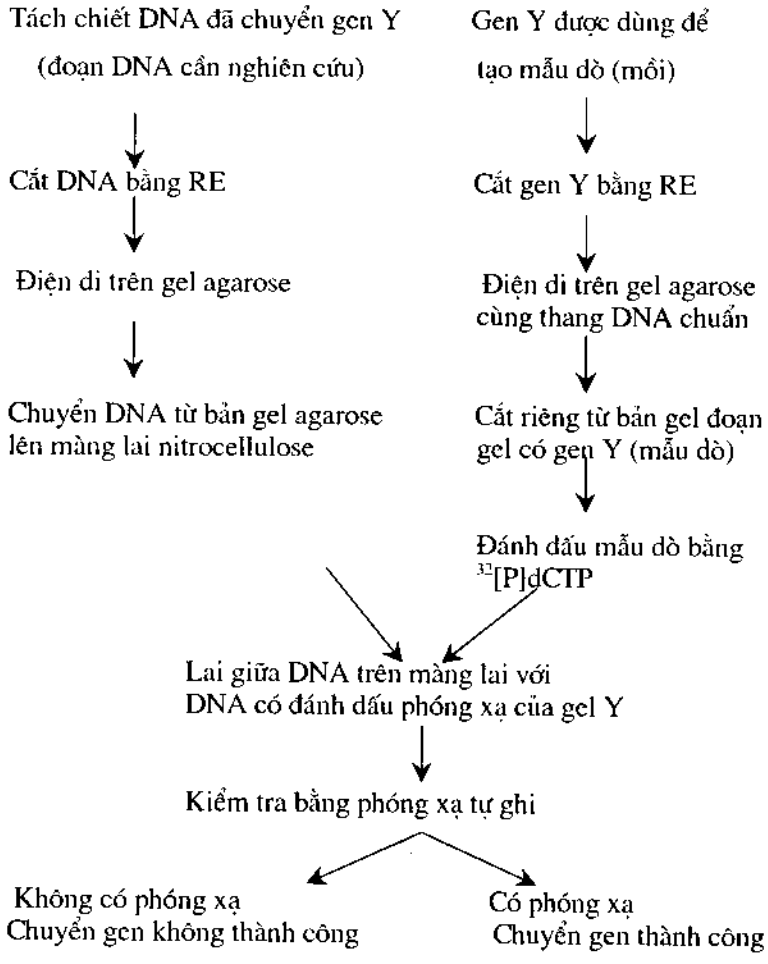
3.1. Lai trên nhiễm sắc thể

Chọn tế bào ở kỳ giữa của quá trình phân bào khi các nhiễm sắc thể có kích thước lớn nhất. Bằng các kỹ thuật xử lý cố định tế bào trên lam kính, định vị hình dạng và vị trí của nhiễm sắc thể. Sử dụng enzym RNase và protease để loại bỏ RNA và protein. Dùng các mẫu dò DNA hoặc RNA có đánh dấu huỳnh quang (có thể dùng mẫu dò đánh dấu đồng vị phóng xạ, tuỳ theo mục đích nghiên cứu) thực hiện phản ứng lai trên lam kính. Sau một khoảng thời gian nhất định, phủ lên lam kính một huyền dịch nhạy cảm với chất huỳnh quang hoặc chất phóng xạ. Quan sát kết quả trên kính hiển vi, tại các điểm có các phân tử lai xuất hiện các chấm đen trên lớp huyền dịch.

3.2. Lai trên tế bào và mô

Lai trên tế bào và mô thường sử dụng để phát hiện các mRNA. Các loại mRNA hoạt động ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển tế bào và cơ thể. Lai trên tế bào và mô nhằm nghiên cứu giai đoạn hoạt động của mRNA, từ đó

tìm hiểu hoạt động gen, mối liên quan giữa phiên mã và giải mã, định vị các gen cần nghiên cứu trên các nhiễm sắc thể...



Hình 5.7. Sơ đồ kiểm tra kết quả chuyển gen bằng lai Southern blot.

Tế bào và mô được xử lí bằng các kỹ thuật tế bào học phù hợp (tẩm paraffin, khử nước...), cắt thành các lát mỏng 7- 10 μm rồi cố định trên lam kính. Xử lý enzym protease để loại bỏ protein, sau đó xử lí bằng enzym DNase để loại bỏ DNA. Lai với mẫu dò có đánh dấu phóng xạ hoặc huỳnh quang. Sau đó phủ một lớp huyền dịch

nhạy với phóng xạ hoặc huỳnh quang để một thời gian thích hợp cho phản ứng xảy ra, quan sát kết quả lai dưới kính hiển vi. Trong tế bào những vị trí có phân tử lai được phát hiện bằng các chấm đen.

IV. MỘT SỐ KỸ THUẬT ỨNG DỤNG PCR TRONG PHÂN LOẠI PHÂN TỬ VÀ XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN

1. Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

RAPD - đa hình các đoạn DNA được khuếch đại ngẫu nhiên do William (1990), Welsh và cộng sự (1991) phát minh.

Các sinh vật có bộ gen giống nhau hoàn toàn khi nhân gen bằng máy PCR với các mồi ngẫu nhiên, kết quả thu được các đoạn DNA hoàn toàn giống nhau về kích thước và cấu trúc. Điện di kết quả nhân gen thu được điện di đồ gồm những băng, vạch DNA ở những vị trí giống nhau trên bản gel. Khi bộ gen của các mẫu kiểm tra có sự khác nhau (có đa dạng sinh học) cho kết quả khác nhau trên điện di đồ.

Mồi ngẫu nhiên là những đoạn oligonucleotid từ 5-12 nucleotid, các hãng sản xuất khác nhau có các mồi có ký hiệu, tên gọi và trình tự khác nhau. Chọn cặp mồi cần lưu ý sao cho các mồi chỉ bắt cặp và bám vào hai đầu của đoạn khuôn, để đoạn DNA giữa các mồi có thể được nhân lên. Mồi càng ngắn thì khả năng bắt cặp càng cao dễ thực hiện phản ứng PCR, mồi càng dài thì kết quả nhân gen càng chính xác. Nhiệt độ biến tính của các mồi (Tm) được chọn phải đảm bảo không cách biệt quá lớn với Tm của đoạn DNA khuôn. Hãng Operon Technology bán nhiều loại mồi ngẫu nhiên được ưa chuộng. Henry Nguyễn (Đại học Kỹ thuật Texas- Mỹ) dùng 43 mồi ngẫu nhiên do hãng Operon Technology sản xuất đã phát hiện nhiều khác biệt di truyền của 13 giống lúa có nguồn gốc khác nhau ở Châu Á, Châu Âu và Trung Á. Kỹ thuật RAPD được thực hiện theo các bước cơ bản sau:

- Tách chiết DNA tổng số, nhân DNA bằng máy PCR
- Điện di trên gel agarose hoặc gel polyacrylamid

- Xác định tính đa dạng di truyền bằng các phần mềm thông dụng (NTSYS - PC, UPGMA Cluster, Gelcompar..., lập dendrogram. Các số liệu thu được cho thấy sự gần gũi hoặc cách biệt di truyền của các mẫu nghiên cứu.

Hệ số đồng dạng di truyền có thể tính theo công thức của M. Nei & Li (1979)

$$S_{ij} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

trong đó N_i là số vạch của giống i, N_j là số vạch của giống j và N_{ij} là số vạch chung của cả 2 giống i và j.

Kỹ thuật RAPD có ưu điểm thực hiện nhanh, dễ làm và ít tốn kém, giúp xác định tính đa dạng sinh học và nguồn gốc di truyền của các giống động vật, thực vật và vi sinh vật còn được gọi là phương pháp phân loại phân tử.

2. Kỹ thuật RFLP

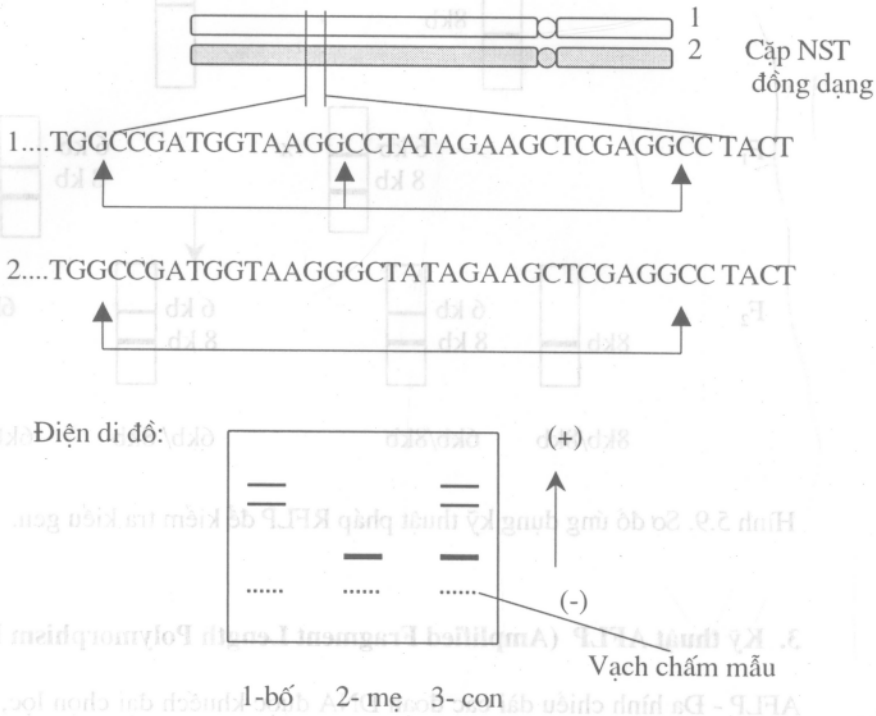
(Restriction Fragment Length Polymorphism DNA - RFLP)

Kỹ thuật RFLP - đa hình chiều dài các đoạn DNA cắt ngẫu nhiên bởi các enzym giới hạn là kỹ thuật tạo nên các đoạn cắt khác nhau phân biệt được bằng điện di đồ, các đoạn cắt còn được gọi là các "dấu vân tay" đặc trưng cho từng phân tử DNA. Xử lý các mẫu DNA bằng cùng một cặp enzym giới hạn, các bộ gen có cấu trúc khác nhau tạo nên số lượng đoạn cắt có chiều dài khác nhau còn những bộ gen hoàn toàn giống nhau tạo nên các đoạn cắt giống nhau. Bản đồ di truyền các kết quả RFLP, có tính chính xác cao thường sử dụng trong nghiên cứu định loại nguồn gốc và mức độ tiến hoá của các loài sinh vật.

Kỹ thuật RFLP còn được gọi là kỹ thuật Fingerprinting. Qui trình thực hiện RFLP bao gồm các bước:

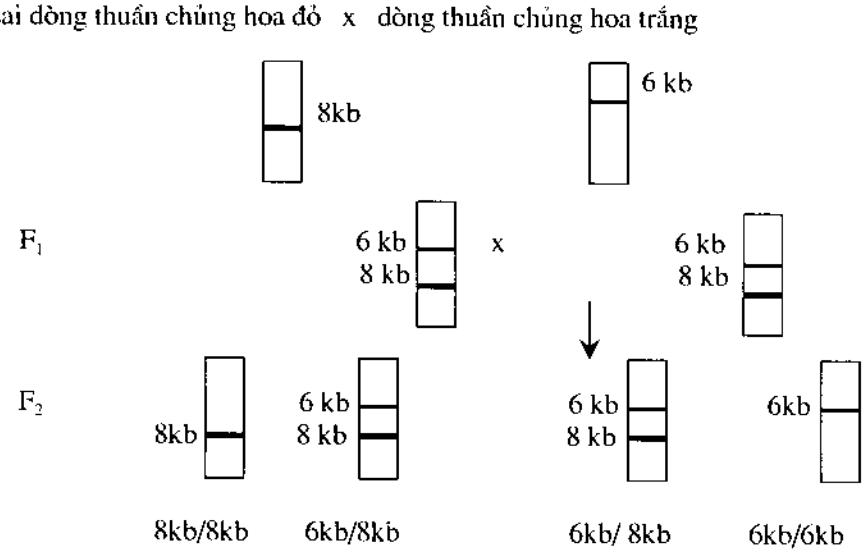
- Tách chiết và tinh sạch DNA.
- Cắt các mẫu DNA cần phân tích bởi cùng một cặp RE.
- Điện di và thực hiện phản ứng lai Southern blot.

- Xác định đa dạng di truyền các đoạn cắt giới hạn, lập bản đồ di truyền các đoạn giới hạn.



Hình 5.8. Sơ đồ kỹ thuật RFLP.

Trong chọn giống thực vật có thể sử dụng RFLP để chọn lọc trực tiếp các cá thể mang các gen lặn mong muốn, không cần phân tích qua lai nhiều thế hệ. Mặt khác với các đặc điểm do nhiều gen kiểm soát, hoặc có sự liên kết giữa các gen, sử dụng RFLP có thể phát hiện quan hệ giữa các gen đó. Hình thức chọn lọc RFLP có thể thực hiện từ khi các cá thể thực vật, động vật còn non giảm công sức, đỡ tốn kém chi phí nuôi trồng. Phương pháp RFLP còn được sử dụng để kiểm tra sự phân li di truyền của một số tính trạng theo qui luật Mendel. Ví dụ, kiểm tra gen xác định màu hoa:



Hình 5.9. Sơ đồ ứng dụng kỹ thuật pháp RFLP để kiểm tra kiểu gen.

3. Kỹ thuật AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA)

AFLP - Đa hình chiều dài các đoạn DNA được khuếch đại chọn lọc, do Vos và cộng sự phát minh 1975. Nguyên tắc của phương pháp AFLP giống như RFLP, điểm khác biệt cơ bản là AFLP không cần tiến hành lai phân tử (lai Southern blot), do vậy thực hiện nhanh hơn. Kỹ thuật AFLP gồm hai nội dung cơ bản là:

- Cắt DNA bằng enzym giới hạn có bổ sung các adaptor đặc hiệu tạo nên các đoạn có đầu mút giống nhau, đặc trưng cho các mồi đã chọn trước.

- Nhân đoạn DNA bằng kỹ thuật PCR ngắt quãng với hai loại mồi khác nhau.

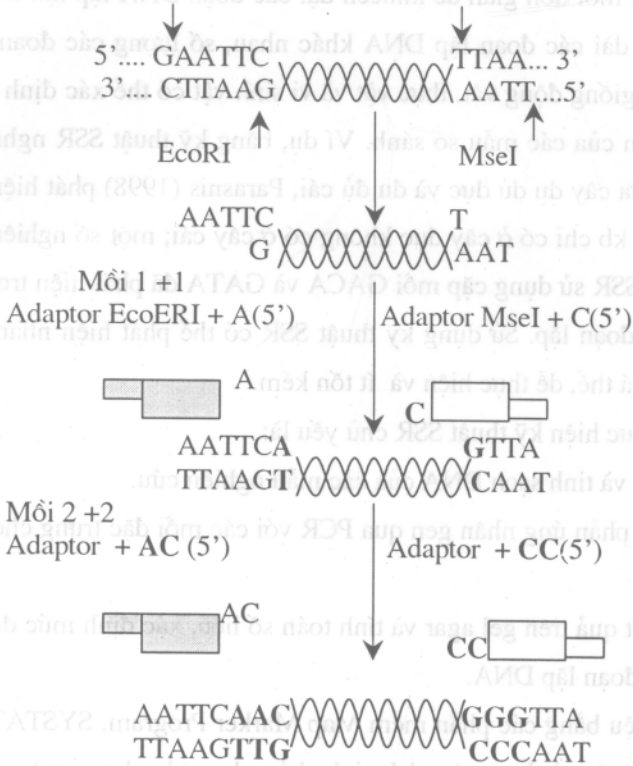
Qui trình thực hiện AFLP gồm bốn bước:

- Tách chiết và tinh sạch DNA.

- Cắt các mẫu DNA nghiên cứu bằng các cặp enzym giới hạn (RE) chọn lọc có bổ sung các adaptor phù hợp.

- Tiến hành PCR ngắt quãng với hai loại mồi đặc hiệu, mồi 1 +1 nucleotid và mồi 2 + 2 nucleotid.

- Phân tích kết quả bằng các phần mềm thông dụng, lập dendrogram để xác định sự khác biệt di truyền và đa dạng sinh học của các mẫu nghiên cứu.



Hình 5.10. Sơ đồ kỹ thuật AFLP.

4. Kỹ thuật SSR (Simple Sequence Repeats)

SSR — là kỹ thuật khuếch đại các đoạn lặp lại đơn giản, còn gọi là phương pháp vi vệ tinh hay tiểu vệ tinh (Micro satellite). Bộ gen *eukaryote* có nhiều đoạn DNA lặp lại, các đoạn lặp DNA có kích thước dài ngắn khác nhau tuỳ theo từng loài, từng giống. Ví dụ, ở lúa có khoảng gần 1000 lần lặp lại trật tự AC/TG, khoảng trên 300 lần lặp lại trật tự GATA/CTAT, nhiều loài cây một lá mầm (ngô, lúa...) lặp lại đoạn CGG/GCC. Các đoạn DNA lặp lại thường nằm gần tâm động hoặc đầu mút của

các nhiễm sắc thể, có thể có vai trò giữ tính ổn định của bộ nhiễm sắc thể, trong các quá trình phân bào.

Sử dụng các mồi đơn giản để khuếch đại các đoạn DNA lặp lại. Dựa vào kết quả thu được về độ dài các đoạn lặp DNA khác nhau, số lượng các đoạn lặp DNA khác nhau giữa các giống động vật, thực vật và vi sinh vật có thể xác định được mức độ đa dạng di truyền của các mẫu so sánh. Ví dụ, bằng kỹ thuật SSR nghiên cứu sự khác biệt bộ gen giữa cây đu đủ đực và đu đủ cái, Parasnis (1998) phát hiện đoạn lặp GATA kích thước 5 kb chỉ có ở cây đực không có ở cây cái; một số nghiên cứu ở cà chua bằng kỹ thuật SSR sử dụng cặp mồi GACA và GATA đã phát hiện trong bộ gen cây cà chua có 32 đoạn lặp. Sử dụng kỹ thuật SSR có thể phát hiện nhanh sự khác biệt DNA giữa các cá thể, dễ thực hiện và ít tốn kém.

Các bước thực hiện kỹ thuật SSR chủ yếu là:

- Tách chiết và tinh sạch DNA của các mẫu nghiên cứu.

- Thực hiện phản ứng nhân gen qua PCR với các mồi đặc trưng cho các đoạn lặp đơn giản.

- Điện di kết quả trên gel agar và tính toán số liệu, xác định mức độ giống và khác nhau giữa các đoạn lặp DNA.

- Xử lí số liệu bằng các phần mềm Map Marker Program, SYSTAT, NTsys - PC...lập bản đồ di truyền và dựng cây phát sinh chủng loại (dendrogram).

V. NGUYÊN LÝ KỸ THUẬT CHUYỂN GEN VÀ ỨNG DỤNG

Kỹ thuật chuyển gen, ghép gen là kỹ thuật đưa một gen lạ (một đoạn DNA, RNA) vào tế bào chủ (host cell) làm cho gen lạ tồn tại ở các plasmid trong tế bào chủ hoặc gắn vào bộ gen tế bào chủ, tồn tại và tái bản cùng với bộ gen của tế bào chủ. Gen lạ trong tế bào chủ hoạt động tổng hợp các protein đặc hiệu, gây biến đổi các đặc điểm đã có hoặc làm xuất hiện những đặc điểm mới của các cơ thể chuyển gen.

Sinh vật chuyển gen bao gồm các giống cây trồng, động vật và vi sinh vật mang các gen có lợi cho con người, tạo nên các sản phẩm có năng suất cao phẩm chất tốt. Cây chuyển gen, động vật chuyển gen ngày càng được đưa vào sản xuất phổ biến

ở nhiều nước trên thế giới, đưa lại lợi ích kinh tế đáng kể góp phần xoá đói giảm nghèo, bảo vệ môi trường bền vững. Có hai hình thức chuyển gen chủ yếu là chuyển gen trực tiếp và chuyển gen gián tiếp.

1. Chuyển gen trực tiếp

Chuyển gen trực tiếp thường sử dụng một số kỹ thuật khác nhau siêu âm, xung điện hay polyethylene glycol (PEG), vi tiêm, bắn gen... để biến nạp gen lạ (DNA) vào tế bào chủ.

1.1. Kỹ thuật siêu âm

Kỹ thuật siêu âm được sử dụng để chuyển gen vào tế bào trần. Siêu âm làm cho DNA ngoại lai dễ xâm nhập vào bộ gen (DNA) của tế bào vật chủ.

Qui trình: tách tế bào trần (protoplast) từ thịt lá bằng cách xử lý với enzym pectinase và cellulose. Ly tâm 6000 vòng / phút để tinh sạch tế bào trần. Tế bào trần được treo trong môi trường chứa 20% - 21% đường sucroza, nuôi ở nồng độ 3×10^6/ml. Cắm đầu siêu âm với độ sâu 3mm, tần số 20 kHz. Sau đó đem các tế bào trần nuôi trong môi trường thích hợp trên hộp petri, thử và xác định các tế bào trần đã được chuyển gen. Tách riêng các tế bào trần đã chuyển gen, nuôi và tiếp tục theo dõi.

1.2. Kỹ thuật điện xung

Dùng thiết bị điện xung (electroporation) tạo điện thế cao khoảng 500 V/cm, với khoảng thời gian 4-5 phần nghìn giây tạo nên các lỗ trên màng tế bào trần, làm cho DNA lạ bên ngoài có thể xâm nhập vào bộ gen của tế bào. Bằng kỹ thuật điện xung đã tạo được các giống mía chuyển gen (Molina, 1992), và nhiều giống thực vật chuyển gen khác.

Qui trình thực hiện: trộn các tế bào trần với plasmid tái tổ hợp chứa gen cần chuyển trong một ống cuvet chuyên dụng, đặt ở giữa 2 tấm kim loại cách nhau khoảng 1 - 4 mm. Sau khi điện xung chuyển các tế bào trần sang đĩa petri chứa môi trường B_5 (Gamborg), rồi chuyển sang môi trường có kháng sinh kiểm tra và chọn các tế bào trần có chuyển gen.

1.3. Kỹ thuật PEG

Polyethylene glycol (PEG) là chất có ái lực lớn với nước. Khi ở nồng độ cao, PEG làm cho DNA dính vào màng nguyên sinh chất của tế bào, tiếp đó tế bào trần "nuốt" DNA trên màng theo cơ chế amip. Tách và tinh sạch tế bào trần bằng enzym pectinase và cellulose. Ly tâm 6000 vòng / phút để tinh sạch tế bào trần. Tế bào trần được treo trong môi trường nuôi thích hợp với từng loài thực vật, nồng độ 3 x 10^6/ml. Sau đó ly tâm làm lắng protoplast, thêm 20 µl DNA(20µg DNA) plasmid tái tổ hợp có gen cần chuyển. Thêm 2ml PEG vào môi trường nuôi lắc nhẹ trong 30 phút, rửa 1-2 lần bằng môi trường nuôi. Kiểm tra kết quả bằng nuôi tế bào trần trên môi trường có chứa các kháng sinh chọn lọc để tách các tế bào trần đã được chuyển gen, nuôi riêng hoặc tiếp tục nghiên cứu.

1.4. Kỹ thuật vi tiêm (micro injection)

Kỹ thuật vi tiêm được sử dụng rộng rãi, là kỹ thuật dùng trực tiếp một lượng DNA nhỏ tiêm vào tế bào, hoặc tiêm vào trứng đã thụ tinh ở giai đoạn phôi 4-8 tế bào hoặc tiêm vào các "tế bào rỗng", các "phôi rỗng". Kỹ thuật vi tiêm sử dụng các thiết bị vi tiêm hay máy vi nhu động đó là các "silanh siêu nhỏ". Các thiết bị này dùng để hút bỏ DNA nhân của phôi, của tế bào hoặc hút các gen cần chuyển đã nhân qua PCR và bơm vào các tế bào trứng rỗng, phôi rỗng.

Dùng kỹ thuật vi tiêm nhóm các nhà khoa học Scotland đã tạo nên cừu Dolly 2.1997, nhóm các nhà khoa học Mỹ tạo nên bê "Gen" 8.1997 bằng phương pháp sinh sản vô tính. Hiện nay kỹ thuật vi tiêm sử dụng có hiệu quả trong chuyển gen, tạo nhiều giống động vật chuyển gen và các dòng thực vật chuyển gen.

1.5. Kỹ thuật bắn gen

Kỹ thuật bắn gen đầu tiên do Sanford ở đại học Cornell (Mỹ) đề xuất 1987. Súng bắn gen đầu tiên là PDS -1000 (particle delivery system 1000) do hãng Biorad sản suất, tốc độ vi đạn đạt 1.300m/giây. Vi đạn (microprojectile) dùng hạt volfram hoặc hạt vàng trộn với gen cần chuyển (DNA) và phụ gia làm DNA kết tủa và bao quanh vi đạn. Sau đó vi đạn được làm khô trên một đĩa kim loại mỏng đường kính

0,5-0,8 cm, và được gắn vào đầu một viên đạn lớn. Súng bắn gen là thiết bị có lưới thép mịn bên ngoài đầu nòng cách đầu nòng khoảng 2 cm. Cho phép khi viên đạn lớn và đĩa kim loại chứa vi đạn được bắn ra khỏi đầu nòng sẽ được giữ lại, còn các vi đạn được bắn vào tế bào với một gia tốc lớn. Gen cần chuyển (DNA) được bắn vào tế bào có thể tái tổ hợp với bộ gen của tế bào tạo nên các tế bào có gen lạ. Tách riêng các tế bào nuôi trong điều kiện thích hợp, tạo các cá thể chuyển gen.

Hiện nay có rất nhiều kiểu súng bắn gen được chế tạo ngày càng hiện đại và hiệu quả hơn nhờ sử dụng luồng khí helium áp lực cao. Có thể không dùng viên đạn lớn mà dùng bộ phận nén khí mạnh tạo áp lực đẩy vi đạn như súng bắn gen Sautter do Sautter đề nghị 1991, hoặc súng Finer Do Finer ở Đại học Ohio (Mỹ) đề nghị 1992... Những năm gần đây ở Việt Nam nhiều tác giả thuộc Viện Công nghệ sinh học, Viện Di truyền nông nghiệp đã sử dụng súng bắn gen Corbo-PIG chuyển vào mô sẹo các plasmid pMON, PRQ6 mang các gen chống rầy, chống nấm bạc lá thu được nhiều dòng lúa chuyển gen có nhiều đặc tính tốt.

1.6. Kỹ thuật chuyển gen bằng sốc nhiệt

Bảng 5.1. Một số kỹ thuật chuyển gen được ứng dụng trong chuyển gen ở cây lúa

Kết quả chuyển gen	Đối tượng	Kỹ thuật	Tác giả
Callus lúa Japonica	Tế bào trần	PEG	Uchimya và CS 1986
Lúa Japonica chuyển gen	Tế bào trần	Xung điện	Toriyama và CS 1988
	Tế bào trần	Xung điện	Zhang và CS 1988
Lúa Japonica chuyển gen	Tế bào trần	PEG	Zhang và Wu 1988
	Tế bào trần	PEG	Datta và CS 1990
Lúa Japonica chuyển gen	Phôi	*Agrobacterium*	Hiei và CS 1994
Cây lúa indica đầu tiên	Phôi chưa trưởng thành		Oard và CS 1996
Chuyển gen qua *Agrobacterium*		Bắn gen	
Chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ			

Kỹ thuật sốc nhiệt đơn giản dễ thực hiện thường sử dụng trong chuyển gen ở vi khuẩn cho hiệu quả cao. Qui trình: nuôi *E. coli* trong môi trường thích hợp, có bổ sung $CaCl_2$ 50mM (nếu nồng độ tế bào quá thấp, có thể ly tâm tốc độ thấp để tăng mật độ tế bào). Trộn chung các plasmid tái tổ hợp có gen cần chuyển với các tế bào biến nạp ở nhiệt độ lạnh 5^0C trong 30 phút, tăng nhiệt độ lên 42^0C trong 2 phút, làm lạnh 4 - 5^0C trong 30 giây. Chuyển sang nuôi cấy ở nhiệt độ bình thường trong môi trường có chất kháng sinh hoặc chất chỉ thị chọn lọc và agar để kiểm tra các tế bào đã được chuyển gen.

2. Chuyển gen gián tiếp

Chuyển gen gián tiếp là kỹ thuật biến nạp DNA (gen) nhờ nhân tố trung gian là vi sinh vật, thường dùng vi khuẩn *Agrobacterium* và virus.

***2.1. Chuyển gen nhờ vi khuẩn* Agrobacterium**

Agrobacterium là nhóm vi khuẩn gây các khối u ở thực vật, có hai loại thường gặp là *Agrobacterium tumefaciens* và *Agrobacterium rhizogenes*. Gần đây, nhiều nghiên cứu khẳng định có thể vi khuẩn *Agrobacterium* làm vectơ chuyển gen, có thể đưa gen lạ vào tế bào thực vật, động vật.

Trong tế bào *A. tumefaciens* có một plasmid lớn, kích thước khoảng 200 kb tạo nên các khối u ở thực vật (tumor inducing = Ti) gọi là Ti plasmid. Cây bị nhiễm *A. Tumefaciens* qua các vết xước, *A. Tumefaciens* đã truyền một đoạn DNA của Ti plasmid và được gắn vào bộ gen của cây, tạo thành các khối u. Đoạn DNA của Ti plasmid (T-DNA) khoảng 25 kb trong đó có các gen mã hoá sinh tổng hợp auxin, xitokinin, opin, các gen gây khối u (oncogen), các gen tái bản plasmid và vùng gen Vir (vùng gen gây khả năng xâm nhiễm). Khi cây nhiễm bệnh, T- DNA gắn vào bộ gen của cây, hoạt động sản sinh auxin, xitokinin và opin gây nên các tế bào phân chia vô tổ chức tạo nên các khối u.

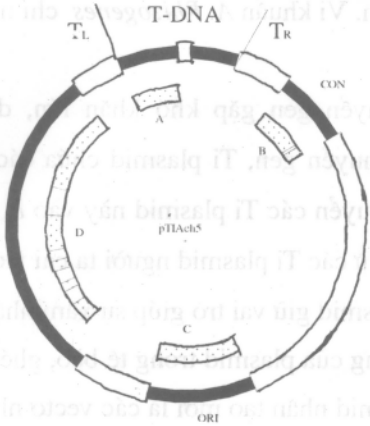
A. Rhizogenes cũng chứa một plasmid gây nhiều lông tơ (root inducing) gọi là Ri-plasmid. Đoạn T-DNA của Ri-plasmid gắn vào bộ gen của tế bào, sản sinh auxin

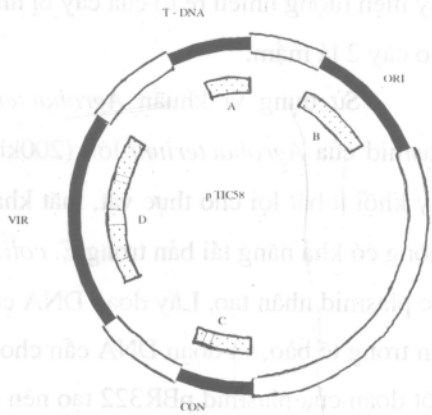
gây hiện tượng nhiều rễ tơ của cây bị nhiễm bệnh. Vi khuẩn *A. Rhizogenes* chỉ nhiễm cho cây 2 lá mầm.

Sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium* chuyển gen gặp khó khăn lớn, do Ti plasmid của *Agrobacterium* lớn (200kb) khó chuyển gen, Ti plasmid chứa các gen gây khối u bất lợi cho thực vật, mặt khác khi chuyển các Ti plasmid này vào *E. coli*, không có khả năng tái bản trong *E. coli*. Do đó từ các Ti plasmid người ta cải tạo nên các plasmid nhân tạo. Lấy đoạn DNA của Ti plasmid giữ vai trò giúp sự xâm nhập tái bản trong tế bào, và đoạn DNA cần cho hoạt động của plasmid trong tế bào, ghép với một đoạn của plasmid pBR322 tạo nên các plasmid nhân tạo mới là các vectơ nhị thể hoặc vectơ liên hợp.

Ví dụ, ở thực vật gen cry của vi khuẩn *B. thuringiensis* với nhiều gen cryI, cryII,.... cryVI trong đó hai gen cryIA(b) và cryIA(c) được cải tiến nhờ kỹ thuật gen có độc tính cao, phổ diệt sâu rộng được sử dụng nhiều trong chuyển gen thực vật. Nayar và cộng sự năm 1997 cho thấy trên cây lúa Indica được chuyển gen cryIA(b) và cryIA(c) có kết quả diệt được sâu đục thân. Sử dụng gen cryIIIA để phòng diệt côn trùng thuộc coleoptera (như mọt gạo và bọ xít) là phương pháp có hiệu quả.

Các chủng *Agrobacterium* khác nhau có các dạng Ti plasmid khác nhau, cấu trúc Ti plasmid có 4 vùng tương đồng, vùng T-DNA và vùng vir (virulence), liên quan trực tiếp tới sự hình thành khối u, hai vùng còn lại chứa gen mã hoá cho việc tái bản plasmid (replication) và chuyển nạp (conjugative transfer). Vùng vir phụ trách khả năng gây nhiễm, làm trung gian cho quá trình chuyển T-DNA. Có tới 24 gen độc nằm trong vùng vir trên Ti plasmid dạng octophin, các gen này sắp xếp trong 8 operon từ virA → virH, mỗi operon thường chứa một số gen. Trong bộ gen của cây bị khối u tồn tại một hoặc vài bản sao của T-DNA, một số rất ít trường hợp bộ gen thực vật chứa nhiều hơn 10 bản sao của T-DNA, các bản sao T-DNA có thể nằm trên cùng một locus hoặc có thể gắn ở các vị trí khác nhau trên DNA thực vật. Ở cà chua có 7 đoạn T-DNA của Ti-plasmid đã gắn vào 5 nhiễm sắc thể khác nhau, ở *Crepis capillaris* T-DNA thấy trên 3 nhiễm sắc thể có các đoạn T-DNA.





Hình 5.11. Ti — plasmid octophin (pTiAch5) và nopalin (pTiC58).

▭ : vùng tương đồng giữa hai plasmid

▭ : vùng chuyển nạp

Ori : Điểm khởi đầu tái bản plasmid

VIR : Vùng lây nhiễm

T_L : vùng trái T-DNA, $T_R$vùng phải T-DNA

Trên Ti- plasmid vùng T-DNA được giới bởi một đoạn trình tự lặp lại gồm 25 cặp base nitơ GGCAGGATATATTCCGTTGTAAT và gọi là đoạn ranh giới (T-DNA border sequence). Đoạn ranh giới bên phải (T_R) có yếu tố hoạt động cis cần cho quá trình chuyển T-DNA, các khối u không được hình thành hoặc bị suy giảm nếu bị cắt đoạn ranh giới bên phải. Trong khi đoạn ranh giới bên trái (T_L) có ảnh hưởng rất ít đến sự hình thành khối u. Các gen trên T-DNA gồm hai nhóm: Nhóm gen mã hoá cho các enzym cho các quá trình sinh tổng hợp opin, là sản phẩm được vi khuẩn *Agrobacterium* sử dụng làm nguồn năng lượng cung cấp cacbon và nitơ; Nhóm gen gây khối u mang các gen tms1, tms2 mã hoá cho sinh tổng hợp auxin ; tmr mã hoá cho enzym liên quan đến sinh tổng hợp cytokinin. Khi T-DNA xâm

nhập vào bộ gen của cây chủ, chúng bắt đầu hoạt động và sản sinh ra auxin, cytokinin và opin, các tế bào phân chia vô tổ chức và tạo các khối u.

Bảng 5.2. Một số cây được chuyển gen cry

Crystal protein (cry)	Côn trùng	Cây chuyển nạp
cryIAa	*Lepidoptera*	*Cranberry, poplar, rutabaga*
cryIAb	*Lepidoptera*	Táo, bông vải, bắp, khoai tây, lúa, thuốc lá, cà chua, White clover
cryIAc	*Lepidoptera*	Táo, bắp cải, bông vải, nho, mù tạt, lạc, lúa, đậu nành...
cryICa	*Lepidoptera*	*Alfalfa, arabidopsis*, thuốc lá
cryIH	*Lepidoptera*	Ngô
cryIIAa	*Lepidoptera*	Bông vải
cryIIIA	*Coleoptera*	Cà tím, khoai tây, thuốc lá
cryVIA	*Coleoptera*	*Alfalfa*
cryIXC	*Lepidoptera*	Ngô

Rễ của cây bị tổn thương tiết ra các hợp chất dạng phenol như axetosyringon, α-hydroxy- axetosyringon. *Agrobacterium* nhận biết tế bào chủ thích hợp và gắn vào thành tế bào thực vật, nhờ hoạt động của các gen vir, chính các hợp chất này với vai trò cảm ứng giúp cho các gen vùng vir của Ti-plasmid hoạt động. Khi *Agrobacterium* xâm nhiễm tế bào thực vật qua vết thương, gen virA nhận biết sự có mặt và tương tác với các phân tử axetosyringon dẫn đến sự hoạt động của gen virG, các protein VirG lại kích hoạt các gen gây độc còn lại như virB, virC, virD và virE ...

Các vectơ Ti-plasmid nhân tạo được sử dụng trong công nghệ gen thực vật có thể chia thành hai dạng chính : vectơ liên hợp (co-integrate vectơ) và vectơ nhị thể (binary vectơ).Vectơ liên hợp được thiết kế dựa trên Ti-plasmid với vùng vir được giữ lại, Ti-DNA mã hoá chức năng gây ung thư bị loại bỏ thay thế vào đó là đoạn DNA mới.

Ở Việt Nam các tác giả Hoàng Kim Oanh, Nguyễn Đức Doanh và cộng sự (1998) đã sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* để chuyển gen chống nấm, chống sâu

đục thân vào mô sẹo lúa, tạo được các dòng lúa chuyển gen, mang gen chống nấm , chống sâu đục thân, tuỳ nhiên sự biểu hiện của các gen này trong các dòng lúa chuyển gen chưa rõ.

2.2 Chuyển gen nhờ virus và phage

Sử dụng virus và phage làm vectơ chuyển gen ở tế bào động vật và vi khuẩn có kết quả cao, phage λ được sử dụng phổ biến nhất. Từ phage λ đã tạo ra hàng loạt các phage tái tổ hợp (phage λ thế hệ 2) rất đa dạng phage EMBL3, EMBL4, λGEM 11, λGEM12, λgt11... Phage M13 có DNA một mạch đơn, kích thước 6,4 kb là cơ sở lý tưởng để tạo các vectơ tách dòng mạnh. Sử dụng phage làm vectơ chuyển gen có lợi hơn các loại plasmid khác vì phage có hệ thống xâm nhập vào vi khuẩn, sinh sản rất nhanh, hiệu quả hơn dùng các loại plasmid để chuyển gen vào vi khuẩn. Trong nhiều trường hợp các virus BPV (*bovine papilloma virus*) gây các mụn cóc ở da bò, virus SV40 được dùng làm vectơ chuyển gen động vật có vú. Các *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) chứa DNA kích thước 8 kb gây bệnh đốm lá loang lổ, cũng được sử dụng làm vectơ chuyển gen ở thực vật.

Chương 6

DI TRUYỀN NHIỄM SẮC THỂ

I. NHIỄM SẮC THỂ

Nhiễm sắc thể là những cấu trúc hiển vi trong nhân tế bào, cấu tạo chủ yếu từ DNA và protein kiềm (histon), có khả năng tự nhân đôi và biến đổi hình thái cấu trúc theo qui luật trong các quá trình phân bào.

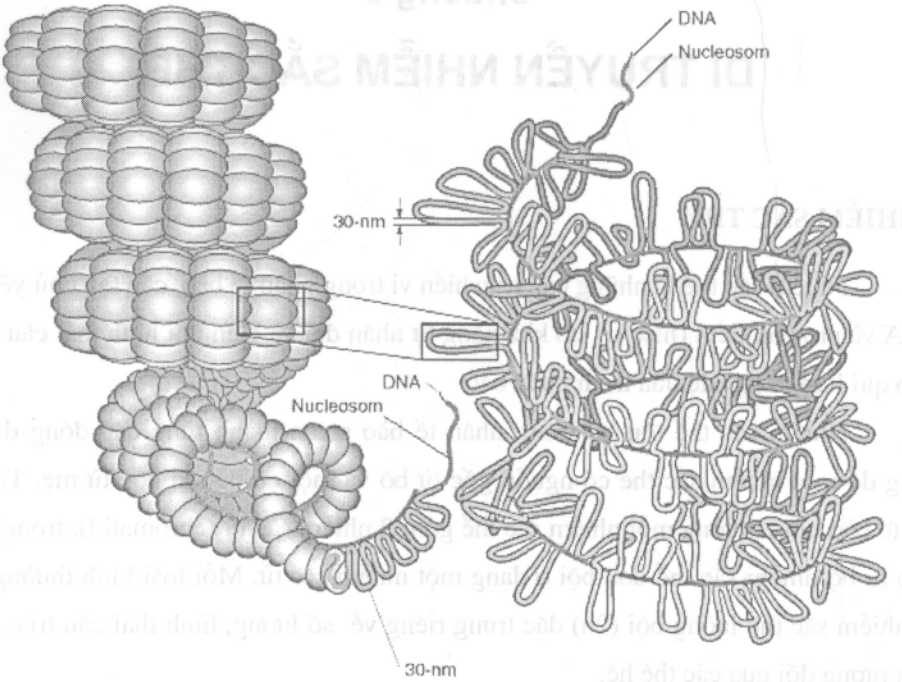
Nhiễm sắc thể tồn tại trong nhân tế bào soma thành từng cặp đồng dạng, trong đó một nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ bố và một có nguồn gốc từ mẹ. Trong các tế bào bình thường mỗi nhiễm sắc thể gồm 2 nhiễm sắc tử (chromatid), trong các giao tử bộ nhiễm sắc thể đơn bội ở dạng một nhiễm sắc tử. Mỗi loài bình thường có bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội (2n) đặc trưng riêng về số lượng, hình thái cấu trúc , ổn định tương đối qua các thế hệ.

1. Cấu trúc nhiễm sắc thể

Nhiễm sắc thể ở sinh vật *prokaryote* cấu trúc đơn giản, là phân tử DNA trần (không có sự tham gia của các phân tử protein kiềm) cuộn xoắn tạo thành các vùng nhiễm sắc. Nhiễm sắc thể ở *eukaryote* cấu trúc từ các nucleosom, mỗi nucleosom do phân tử DNA cuộn xoắn 1, 75 vòng quanh 8 phân tử histon, mỗi vòng xoắn DNA gồm 80 cặp nucleotid.

Cấu trúc cơ bản của một nhiễm sắc thể gồm tâm động, cánh dài, cánh ngắn và điểm mút. Tâm động có vai trò quan trọng trong các quá trình phân bào, là điểm bám của thoi dây tơ vô sắc để các nhiễm sắc thể phân li về các cực tế bào khi tế bào phân chia. Tuỳ theo vị trí của tâm động có thể chia nhiễm sắc thể thành các dạng cấu trúc: tâm cân, tâm lệch và tâm mút. Điểm mút là vùng DNA đầu mút của nhiễm sắc

thể, thường ở dạng mạch thẳng, giữ vai trò quan trọng cho sự tái bản và mức độ tồn tại của tế bào dài hay ngắn, góp phần quyết định tuổi thọ của cá thể.



Hình 6.1. Các mức độ cấu trúc của nhiễm sắc thể.

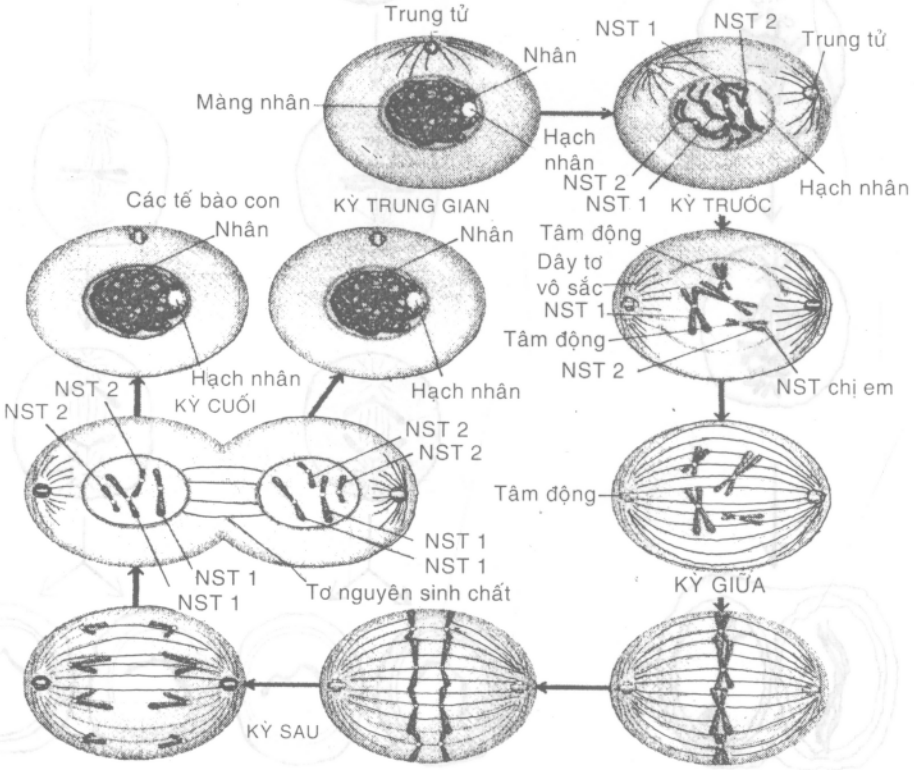
Mỗi nucleosom có đường kính 110 Å (1 Å = 10^{-7}mm), các nucleosom nối với nhau bằng các đoạn DNA ngắn kích thước khoảng 15 - 100 bp tạo thành sợi cơ bản có đường kính 110 Å (chuỗi nhiều nucleosom). Sợi cơ bản cuộn xoắn tạo thành sợi nhiễm sắc đường kính khoảng 300 Å, các sợi nhiễm sắc xoắn gấp khúc khi đạt cực đại tạo thành các nhiễm sắc tử khoảng 700 Å, một nhiễm sắc thể điển hình gồm hai nhiễm sắc tử có đường kính khoảng 1400 - 1500 Å, ở một số ít loài có nhiễm sắc thể rất lớn, đường kính có thể tới 6000 Å . Hình dạng, kích thước nhiễm sắc thể đặc trưng riêng cho từng loài sinh vật, quan sát rõ nhất ở kỳ giữa của quá trình phân bào.

Hình dạng, kích thước và số lượng nhiễm sắc thể không biểu hiện mức tiến hoá của sinh vật. Ví dụ, ở người 2n = 46, bò 2n = 60, gà 2n = 78, ruồi giấm 2n= 8,

lúa 2n = 24, ngô 2n = 20... Các giao tử có bộ nhiễm sắc thể đơn bội (n), ở người n = 23, ngô n = 10, bò n = 30...

2. Cơ chế ổn định của bộ nhiễm sắc thể

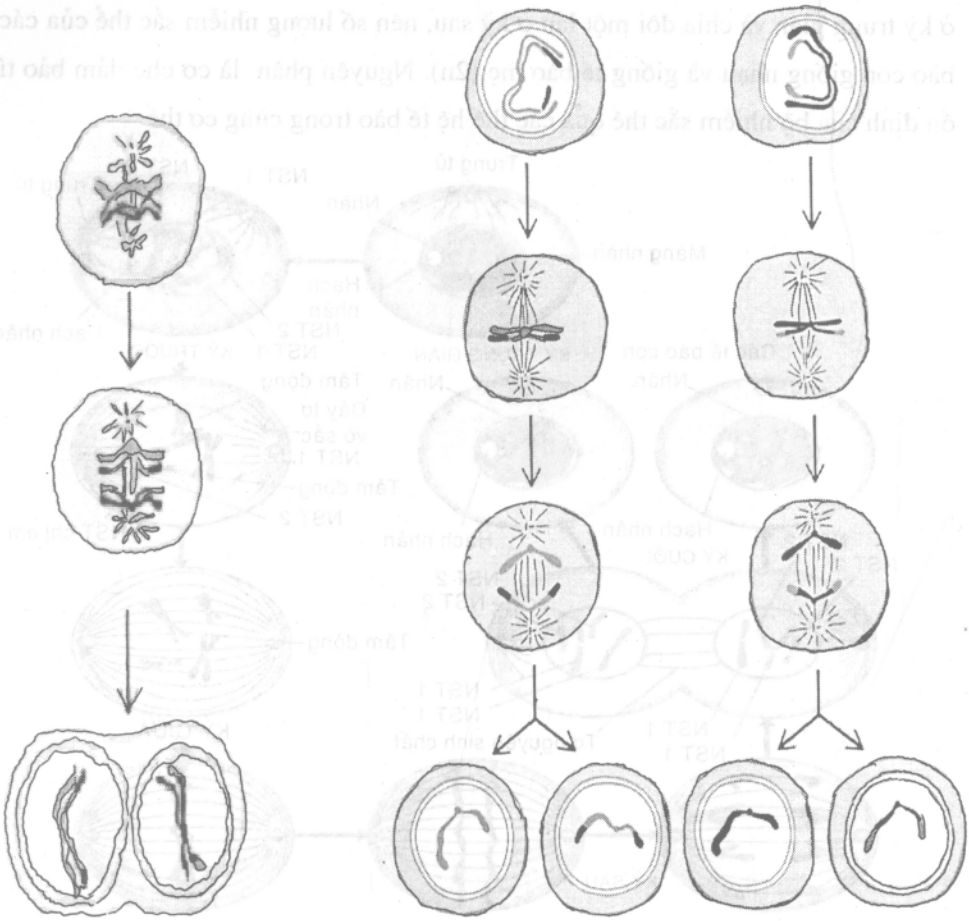
Trong qua trình phân bào nguyên phân các nhiễm sắc thể nhân đôi một lần ở kỳ trung gian và chia đôi một lần ở kỳ sau, nên số lượng nhiễm sắc thể của các tế bào con giống nhau và giống tế bào mẹ (2n). Nguyên phân là cơ chế đảm bảo tính ổn định của bộ nhiễm sắc thể qua các thế hệ tế bào trong cùng cơ thể.



Hình 6.2. Phân bào gián phân.

Hình thái và cấu trúc nhiễm sắc thể trong nguyên phân biến đổi theo chu kỳ. Ở kỳ trung gian chỉ là các sợi nhiễm sắc rất mảnh (các phân tử DNA) mọi quá trình tự nhân đôi, phiên mã và dịch mã xảy ra ở giai đoạn này. Bước vào kỳ trước

sợi nhiễm sắc bắt đầu xoắn lại kích thước nhiễm sắc thể lớn dần. Ở kỳ giữa đạt mức xoắn cực đại các nhiễm sắc thể có hình dạng kích thước lớn nhất đặc trưng cho loài. Kỳ sau các nhiễm sắc thể theo thoi dây tơ vô sắc trượt về các cực tế bào, nhiễm sắc thể giãn xoắn và trở lại dạng sợi nhiễm sắc mảnh ở cuối kỳ cuối.



Hình 6.3. Phân bào giảm phân.

Trong phân bào giảm phân nhiễm sắc thể được nhân đôi một lần ở kỳ trung gian và chia đôi 2 lần ở kỳ sau của giảm phân I và kỳ sau của giảm phân II, nên số lượng nhiễm sắc thể trong các giao tử giảm đi một nửa so với tế bào soma. Các giao tử có bộ nhiễm sắc thể đơn bội (n). Sự kết hợp giữa giao tử đực và giao tử cái trong thụ tinh tạo nên các hợp tử lưỡng bội (2n), đảm bảo tính ổn định của bộ nhiễm sắc thể của loài qua các thế hệ.

Trong giảm phân hình thái cấu trúc nhiễm sắc thể biến đổi theo chu kỳ. Kỳ trung gian nhiễm sắc thể ở dạng sợi nhiễm sắc mảnh, kỳ trước sợi nhiễm sắc xoắn lại kích thước nhiễm sắc thể lớn dần và đạt kích thước đặc trưng của loài ở kỳ giữa của giảm phân I, hình thái kích thước giữ đến kỳ giữa của giảm phân II. Ở kỳ sau của giảm phân II các nhiễm sắc thể giãn xoắn và trở lại sợi nhiễm sắc mảnh ở kỳ cuối của giảm phân II.

Sự biến đổi về hình thái cấu trúc nhiễm sắc thể mang tính chu kỳ trong nguyên phân và giảm phân, là cơ sở bảo đảm thuận lợi cho tự nhân đôi và phân li của các nhiễm sắc thể, bảo đảm thông tin di truyền được truyền đạt một cách chính xác qua các thế hệ tế bào trong cùng cơ thể, và qua các thế hệ khác nhau trong mỗi loài sinh vật.

II. QUI LUẬT DI TRUYỀN MENDEL

Di truyền nhiễm sắc thể là sự di truyền của các tính trạng do các gen nằm trên nhiễm sắc thể qui định. Các tính trạng được di truyền qua các thế hệ trên cơ sở sự phân li độc lập, tổ hợp tự do của các nhiễm sắc thể trong các quá trình gián phân, giảm phân và thụ tinh.

1. Một số thuật ngữ

- Gen (gene): nhân tố di truyền qui định các đặc điểm tính chất của sinh vật: như hạt vàng , hạt lục...

- Alen (alelle): Các trạng thái khác nhau của một gen, trạng thái trội gọi là alen trội (còn gọi là gen trội), trạng thái lặn gọi là alen lặn (còn gọi là gen lặn).

- Kiểu gen (genotype): tập hợp các gen trong cơ thể, thường chỉ xét đến một số gen đang nghiên cứu.

- Kiểu hình (phenotype): là các tính trạng do kiểu gen qui định được biểu hiện

2. Các qui luật di truyền Mendel

Năm 1865 Gregor Mendel công bố kết quả thí nghiệm nghiên cứu sự di truyền của 7 đặc điểm ở các giống đậu Hà Lan. Mendel là người đầu tiên khám phá qui luật về sự di truyền các tính trạng, nêu khái niệm nhân tố di truyền (về sau gọi là gen). Công trình Mendel bị lãng quên, năm 1900 công trình nghiên cứu trên 16 loài thực vật khác nhau của 3 nhà khoa học Hugo Vries (Hà Lan), E. Correns (Đức) và E. Tschermak (Áo) các qui luật di truyền Mendel được tái phát hiện. Theo dõi kết quả thí nghiệm lai giữa các giống đậu Hà Lan, Mendel cho rằng mỗi cặp nhiễm sắc thể có chứa một cặp gen, mỗi cặp gen qui định một cặp tính trạng và di truyền độc lập với nhau.

Công trình nghiên cứu của Gregor Mendel được tập hợp thành ba qui luật di truyền:

1. Qui luật tính trội.
2. Qui luật phân li tính trạng.
3. Qui luật phân li độc lập.

3. Tính đa hiệu của gen

Trong các thí nghiệm lai các giống đậu Hà Lan, Mendel đã phát hiện sự kiểm soát nhiều tính trạng của cùng một gen gọi là tính đa hiệu của gen. Chẳng hạn, gen qui định hoa màu đỏ ở đậu đồng thời xác định vỏ hạt màu nâu hoặc có các vạch đỏ ở bẹ lá.

Các nghiên cứu sau này của Vavilop (nhà khoa học Nga) cho thấy ở nhiều loài thực vật có biểu hiện tính đa hiệu của gen, như ở lúa mì gen qui định vỏ hạt đen đồng thời kiểm soát tính trạng mày hạt có lông.

III. DI TRUYỀN TƯƠNG TÁC GEN

Trong thực tiễn nghiên cứu di truyền học phát hiện nhiều tính trạng của sinh vật không phân li không theo các qui luật Mendel. Những tính trạng này do nhiều cặp gen kiểm soát, sự tương tác giữa các cặp gen không alen nằm trên các cặp nhiễm sắc thể khác nhau, tạo nên các tỷ lệ phân li kiểu hình đặc trưng riêng. Có nhiều kiểu tương tác khác nhau: tương tác bổ trợ, tương tác át chế, tương tác cộng gộp. .

Tương tác gen làm tăng tính đa dạng phong phú của sinh giới, đồng thời giải thích sự phân li kiểu hình không theo tỷ lệ Mendel của nhiều cặp tính trạng. Di truyền tương tác gen có thể xảy ra với hai hay nhiều cặp gen nằm trên cùng một cặp nhiễm sắc thể, hoặc trên các cặp nhiễm sắc thể khác nhau. Trong phạm vi giáo trình chúng ta xét một số qui luật tương tác chủ yếu của các cặp gen trên các cặp nhiễm sắc thể khác nhau.

1. Qui luật tương tác bổ trợ giữa các cặp gen

Ví dụ 1: Khi lai giữa 2 giống bí quả tròn khác nguồn gốc thu được F_1 đồng loạt bí quả dẹt. Cho bí F_1 thụ phấn với nhau được F_2 có tỷ lệ phân li 9/16 bí quả dẹt: 6/16 bí quả tròn: 1/16 bí quả dài.

P: Quả tròn x Quả tròn

AAbb aaBB

↓

F_1 AaBb (Quả dẹt) x AaBb (Quả dẹt)

↓

F_2 9(A-B-): 3(A-bb), 3(aaB-): 1 (aabb)

9/16 Quả dẹt 6/16 Quả tròn 1/16 Quả dài

Ví dụ 2: Tiến hành lai giữa 2 giống đậu thơm (Lathyrus odoratus) dạng hoa trắng thu được F_1 đồng loạt hoa đỏ. Cho F_1 thụ phấn với nhau được F_2 có tỷ lệ phân li kiểu hình theo tỷ lệ 9 hoa đỏ : 7 hoa trắng.

P: Hoa trắng x Hoa trắng

AAbb aaBB

↓

F_1 AaBb (Hoa đỏ) x AaBb (Hoa đỏ)

↓

F_2 9(A-B-) : 3(A-bb), 3(aaB-), 1(aabb)

9/16 Hoa đỏ 7/16 Hoa trắng

2. Qui luật tương tác át chế giữa các cặp gen

Ví dụ: Khi lai giữa 2 giống gà có lông trắng nguồn gốc khác nhau thu được F_1 đồng loạt gà có lông trắng. Cho F_1 giao phối với nhau được tỷ lệ phân li kiểu hình F_2 : 13/16 gà có lông trắng: 3/16 gà có lông nâu.

P Lông trắng x Lông trắng

CC I I ccii

↓

F_1 CcIi (Lông trắng) x CcIi (Lông trắng)

↓

F_2 9(A-B-), 3(A- bb), 1(aabb): 3 (aaB-)

13/16 Lông trắng 3/16 Lông nâu

3. Qui luật tương tác cộng gộp giữa các cặp gen

Thí nghiệm lai lúa mì có hạt màu đỏ đậm với lúa mì có hạt màu trắng của Nilson- Ehler (Thuỵ Điển, 1908), đã phát hiện qui luật di truyền tương tác cộng gộp giữa các cặp gen.

Trong trường hợp có sự di truyền tương tác tích luỹ số lượng gen trội, kiểu hình của cá thể biểu hiện tuỳ thuộc số lượng gen trội trong kiểu gen. Khi kiểu gen của cá thể có nhiều alen trội, kiểu hình về tính trạng tương ứng của cá thể biểu hiện mạnh. Ngược lại kiểu gen của cá thể có ít alen trội, kiểu hình về tính trạng tương ứng của cá thể biểu hiện kém, những cá thể không mang alen trội biểu hiện kiểu hình kém nhất.

Thực hiện thí nghiệm lai giữa giống lúa mì có hạt màu đỏ đậm thuần chủng với giống lúa mì hạt màu trắng thuần chủng, được F_1 đồng loạt có hạt có màu đỏ hồng. Cho F_1 thụ phấn với nhau được F_2 có tỷ lệ phân li kiểu hình 15 hạt màu đỏ: 1 hạt màu trắng. Màu sắc hạt đỏ của hạt lúa mì thay đổi từ đỏ đậm đến đỏ rất nhạt tuỳ thuộc số alen trội trong kiểu gen:

P Hạt màu đỏ đậm x Hạt màu trắng

$A_1A_1A_2A_2$ ↓ $a_1a_1a_2a_2$

F_1: $A_1a_1A_2a_2$ (Đỏ hồng) x $A_1a_1A_2a_2$ (Đỏ hồng)

Tỷ lệ phân li các loại kiểu hình ở F_2:

1 Hạt màu đỏ đậm (có 4 alen trội A_1, A_1, A_2 và A_2)

4 Hạt màu đỏ (có 3 trong 4 alen trội)

6 Hạt màu đỏ hồng (có 2 trong 4 alen trội)

4 Hạt có màu hồng (có 1 trong 4 alen trội)

1 Hạt màu trắng (không có alen trội nào)

IV. DI TRUYỀN LIÊN KẾT GEN

1. Di truyền liên kết gen hoàn toàn

Bằng thực nghiệm nghiên cứu trên đối tượng ruồi giấm, T. Morgan và cộng sự đã chứng minh trên mỗi nhiễm sắc thể có nhiều gen, các gen sắp xếp theo đường thẳng trên nhiễm sắc thể. Các gen nằm trên cùng một nhiễm sắc thể tạo nên một nhóm liên kết gen, mỗi nhiễm sắc thể là một nhóm liên kết gen. Các gen nằm gần nhau trên nhiễm sắc thể thường được di truyền cùng nhau gọi là di truyền liên kết hoàn toàn.

Trên nhiễm sắc thể thường khi các gen nằm gần nhau di truyền liên kết hoàn toàn, các gen luôn luôn phân li cùng nhau về một giao tử, tạo nên tỷ lệ phân li kiểu gen là 1:2:1 và tỷ lệ phân li kiểu hình là 3:1.

- P khác nhau bởi 2 cặp gen

P $\underline{AB}$ x $\underline{ab}$

AB ab

G_P $\underline{AB}$ $\underline{ab}$

F_1 $\underline{AB}$

ab

G_{F1} $\underline{AB}$, $\underline{ab}$

F_2 $\underline{AB}$ $\underline{AB}$ $\underline{AB}$ $\underline{ab}$

AB ab ab ab

Tỷ lệ phân li kiểu gen 1: 2 :1

Tỷ lệ phân li kiểu hình 3: 1

- P khác nhau bởi 3 cặp gen

P $\underline{ABD}$ x $\underline{abd}$

ABD abd

G_P ABD abd

F_1 ABD

abd

G_{F1} ABD, abd

F_2 ABD ABD ABD abd

ABD abd abd abd

Tỷ lệ phân li kiểu gen 1: 2 :1

Tỷ lệ phân li kiểu hình 3: 1

2. Di truyền liên kết gen không hoàn toàn có hoán vị gen

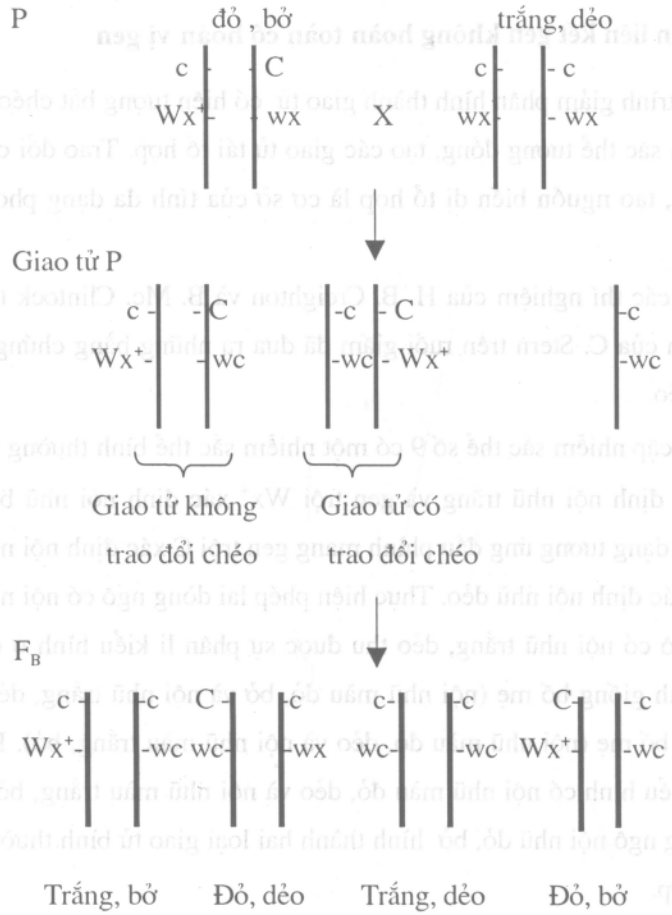
Trong quá trình giảm phân hình thành giao tử có hiện tượng bắt chéo và trao đổi các đoạn nhiễm sắc thể tương đồng, tạo các giao tử tái tổ hợp. Trao đổi chéo tạo nên sự hoán vị gen, tạo nguồn biến dị tổ hợp là cơ sở của tính đa dạng phong phú của sinh giới.

Năm 1931 các thí nghiệm của H. B. Creighton và B. Mc. Clintock trên cây ngô và thực nghiệm của C. Stern trên ruồi giấm đã đưa ra những bằng chứng tế bào học của trao đổi chéo.

Ở ngô trên cặp nhiễm sắc thể số 9 có một nhiễm sắc thể bình thường mang 2 gen. Gen lặn c xác định nội nhũ trắng và gen trội Wx^+ xác định nội nhũ bở. Trên nhiễm sắc thể đồng dạng tương ứng đầu phình mang gen trội C xác định nội nhũ màu đỏ và gen lặn wx xác định nội nhũ dẻo. Thực hiện phép lai dòng ngô có nội nhũ màu đỏ, bở với dòng ngô có nội nhũ trắng, dẻo thu được sự phân li kiểu hình ở đời con gồm 2 loại kiểu hình giống bố mẹ (nội nhũ màu đỏ, bở và nội nhũ trắng, dẻo) và 2 loại kiểu hình khác bố mẹ (nội nhũ màu đỏ, dẻo và nội nhũ màu trắng, bở). Kết quả thu được các loại kiểu hình có nội nhũ màu đỏ, dẻo và nội nhũ màu trắng, bở do sự trao đổi chéo ở dòng ngô nội nhũ đỏ, bở hình thành hai loại giao tử bình thường và 2 loại giao tử tái tổ hợp.

Tần số trao đổi chéo hay tần số hoán vị gen tính bằng tỷ lệ giữa số lượng cá thể tạo nên do trao đổi chéo trong lai phân tích so với tổng số cá thể thu được tính theo phần trăm.

Qui ước một đơn vị Morgan hay 1 Centi Morgan (cM) bằng 1% tần số hoán vị gen. Tần số hoán vị gen biểu hiện khoảng cách giữa các gen trên nhiễm sắc thể. Trường hợp các gen phân bố trên nhiễm sắc thể ở các vị trí càng cách xa nhau, tần số hoán vị gen càng lớn và ngược lại các gen phân bố ở các vị trí gần nhau, tần số hoàn vị gen càng nhỏ.



Hình 6.4. Cơ sở tế bào học của hiện tượng trao đổi chéo ở ngô.

Tần số hoán vị gen giữa hai cặp gen trên cùng một cặp nhiễm sắc thể phụ thuộc các điều kiện ngoại cảnh như tia tử ngoại, tia Röntgen (tia X) và các hoá chất gây biến tính DNA.... Tần số hoán vị gen còn phụ thuộc đặc điểm cấu trúc của cặp gen và trạng thái sinh lý của cơ thể, giai đoạn phát triển của tế bào, tuổi cá thể ...

3. Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể

Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể là sơ đồ vị trí sắp xếp tương đối của các gen trên nhiễm sắc thể.

Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể còn gọi là bản đồ liên kết (linkage mapping), được xây dựng trên cơ sở tần số trao đổi chéo giữa các gen trên nhiễm sắc thể. Số lượng nhóm liên kết gen bằng số lượng các cặp nhiễm sắc thể cùng nguồn, trong bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội của loài. Ví dụ ở người 2n = 46 có số nhóm liên kết 23, ngô 2n = 20 có số nhóm liên kết 10, ruồi giấm 2n = 8 có 4 nhóm liên kết.

Bản đồ di truyền liên kết được ghi đầy đủ các nhóm liên kết, ký hiệu các gen và khoảng cách giữa các gen tính bằng phần trăm (%), vị trí các gen trên nhiễm sắc thể tính từ đầu mút của nhiễm sắc thể.

Chương 7

DI TRUYỀN NGOÀI NHIỄM SẮC THỂ

Di truyền ngoài nhiễm sắc thể là sự di truyền của một số tính trạng do các gen nằm ngoài nhiễm sắc thể (ngoài nhân) qui định. Di truyền ngoài nhiễm sắc thể ở sinh vật *prokaryote* là di truyền các đặc điểm do các gen nằm ở plasmid hoặc episom, còn sinh vật *eukaryote* di truyền ngoài nhiễm sắc thể là sự di truyền của các gen nằm trong ti thể, lạp thể và một số bào quan khác.

I. DI TRUYỀN TI THỂ

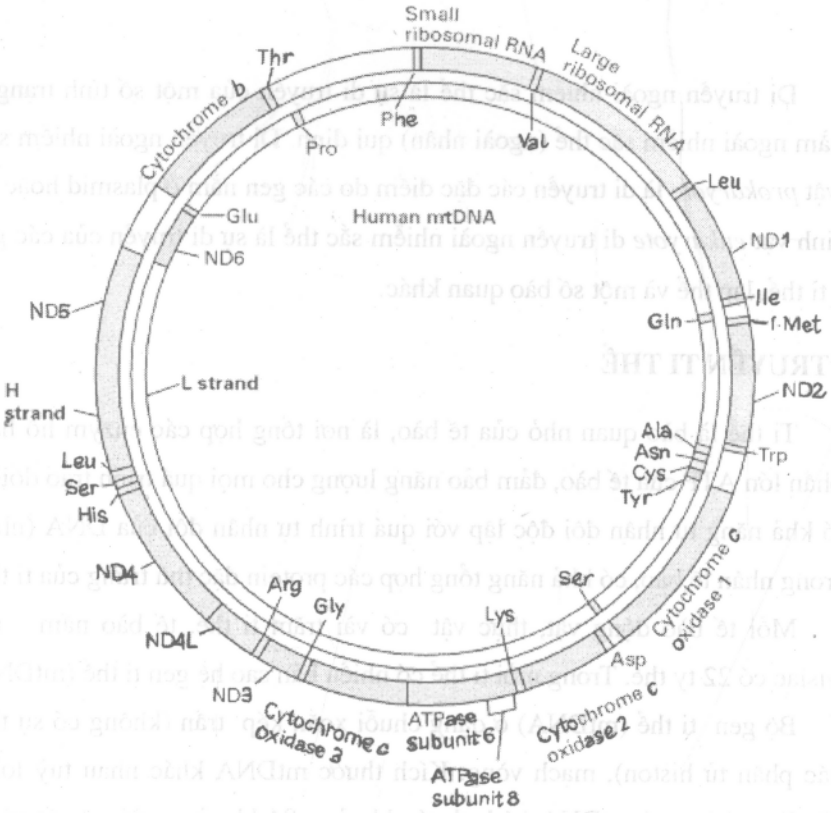
Ti thể là bào quan nhỏ của tế bào, là nơi tổng hợp các enzym hô hấp, tổng hợp phần lớn ATP của tế bào, đảm bảo năng lượng cho mọi quá trình trao đổi chất. Ti thể có khả năng tự nhân đôi độc lập với quá trình tự nhân đôi của DNA (nhiễm sắc thể) trong nhân tế bào, có khả năng tổng hợp các protein đặc thù trưng của ti thể.

Mỗi tế bào động vật, thực vật có vài trăm ti thể, tế bào nấm men S. Cerevisiae có 22 ty thể. Trong mỗi ti thể có nhiều bản sao hệ gen ti thể (mtDNA).

Bộ gen ti thể (mtDNA) ở dạng chuỗi xoắn kép trần (không có sự tham gia của các phân tử histon), mạch vòng. Kích thước mtDNA khác nhau tuỳ loài. Nấm men S. Cerevisiae có mtDNA kích thước khoảng 84 kb, ở người, chuột và một số động vật có vú kích thước mtDNA khoảng 16,5 kb, ở thực vật kích thước bộ gen ti thể thường rất lớn (ở ngô khoảng 570 kb). Bộ gen ti thể của tế bào động vật gồm các exon, còn bộ gen ti thể của tế bào thực vật và nấm men gồm các exon và intron xen kẽ.

Bộ gen ti thể ở động vật có vú có cấu trúc tương đối giống nhau, mỗi mtDNA gồm 37 gen, trong đó có 13 gen mã hoá protein, 22 gen mã hoá tRNA và 2 gen mã hoá rRNA. Các protein do gen ti thể mã hoá có trong thành phần lớp màng bên trong

của ti thể. Đa số các loài thực vật, nấm men và động vật có vú thành phần protein trong cấu trúc ti thể đều do bộ gen ti thể mã hoá. Các gen ti thể của tế bào động vật có vú phân bố tương đối đồng đều, còn các gen ti thể nấm men tập trung một cụm 16 gen còn 10 gen phân tán khắp toàn bộ gen ti thể.



Hình 7.1. Cấu trúc gen ti thể người.

DNA ti thể thường có thành phần khác biệt với DNA của tế bào, ví dụ, ở nấm men DNA ti thể có tỷ lệ G - C khoảng 21%, còn DNA nhân có tỷ lệ G- C khoảng 40%. DNA ti thể của tế bào động vật có vùng gen trùm nhau (overlap), vùng D-loop là vùng điều khiển của mtDNA.

Mã di truyền của mtDNA của ti thể có một số khác biệt với mã di truyền của các gen nhân ở cả sinh vật *prokaryote* và sinh vật *eukaryote*.

Bảng 7.1. Sự khác biệt của mã di truyền ti thể và mã di truyền gen nhân

Bộ ba mã hoá	Mã di truyền gen nhân	Mã di truyền của gen ti thể			
		Động vật có vú	Ruồi giấm	Nấm men	Thực vật
UGA	Stop	Trip	Trip	Trip	Stop
AGA,AGG	Arg	Stop	Ser	Arg	Arg
AUA	Ile	Met	Met	Met	Ile
AUU	Ile	Met	Met	Met	Ile
CUU,CUC, CUA,CUG	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu

II. DI TRUYỀN LẠP THỂ

Lạp thể có ở tế bào thực vật, nhiều loài tảo và vi khuẩn quang hợp. Lạp thể chứa diệp lục, là cơ quan quang hợp của tế bào. Mỗi tế bào thực vật có khoảng 40 - 50 lạp thể, ở một số loài tảo tế bào chứa hàng trăm lạp thể.

Lạp thể có khả năng phân chia và tự nhân đôi độc lập với các thành phần khác của tế bào. Kích thước, hình dáng, hàm lượng diệp lục trong lạp thể khác nhau tuỳ theo loại tế bào thực vật. Lạp thể được chia thành nhiều loại khác nhau tuỳ theo cấu trúc và chức năng như lục lạp, sắc lạp và bột lạp. Các loại lạp thể đều có hệ gen (cp DNA) tương đối giống nhau về thành phần và cấu trúc DNA.

Hệ gen lạp thể (cpDNA) lớn hơn mtDNA khoảng 9 -10 lần, Cấu trúc phân tử DNA lạp thể thường có dạng xoắn kép, trần nối thành vòng. Phân tử cpDNA của tế bào thực vật bậc cao có kích thước từ 120 đến 160 kb, ở các loài tảo khác nhau cpDNA có kích thước từ 22 kb đến khoảng 300kb. Mỗi lục lạp thường có nhiều bản

sao cpDNA. Chẳng hạn, trùng roi Euglena mỗi tế bào có 15 lục lạp mỗi lục lạp có 40 bản sao cpDNA, mỗi tế bào cây thuốc lá có khoảng 150 bản sao cpDNA.

Các gen của lạp thể chia thành hai nhóm: nhóm gen mã hoá tRNA, rRNA và nhóm gen cần thiết cho hoạt động quang hợp của lạp thể. Phần lớn protein trong lạp thể được mã hoá bởi các gen nhân và chuyển đến lạp thể. Hệ gen lạp thể có các gen mã hoá các tRNA và rRNA của lạp thể, có một số gen mã hoá cho một số protein tham gia cấu trúc màng lạp thể cần thiết cho quá trình quang hợp.

III. ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN NGOÀI NHIỄM SẮC THỂ

Gen nhân mã hoá cho các tính trạng di truyền theo quy luật phân ly và tổ hợp của các nhiễm sắc thể trong các quá trình nguyên phân, giảm phân và thụ tinh. Các gen ngoài nhiễm sắc thể (các gen nằm trong các bào quan trong tế bào chất) di truyền không phụ thuộc vào quy luật vận động của các nhiễm sắc thể trong nguyên phân, giảm phân và thụ tinh mà có các đặc điểm riêng biệt.

Các đặc điểm cơ bản của di truyền ngoài nhiễm sắc thể:

- Kết quả phép lai thuận nghịch là khác nhau

Ví dụ: lai lừa cái x ngựa đực → con la

lai lừa đực x ngựa cái → con bacdo

lai cá chép cái x cá diếc đực → cá nhưng (có râu)

lai cá chép đực x cá diếc cái → cá nhưng (không râu)

- Tính trạng do các gen ngoài nhiễm sắc thể mã hoá vẫn tồn tại khi đã thay nhân tế bào bằng một nhân có cấu trúc di truyền khác.

- Hiện tượng bất thụ đực tế bào chất (cytoplasmic male sterility - CMS). Cây ngô là cây lưỡng tính cùng gốc, các cơ quan sinh dục đực và cái phát triển trên cùng một cây. Ở ngô có hiện tượng bất thụ đực tế bào chất - CMS, tạo nên các hạt phấn rỗng hoặc hạt phấn bất thụ. Bất thụ đực tế bào chất ở ngô được giải thích theo các cơ chế khác nhau.

+ Giả thuyết đơn nhân tố: cho rằng hiện tượng bất thụ đực tế bào chất do sự tương tác giữa một cặp gen nhân và yếu tố kiểm soát (gen kiểm soát) trong tế bào

chất. Trong nhân có gen phục hồi hữu thụ Rf và không phục hồi hữu thụ rf, trong tế bào chất có gen kiểm soát cyt^S gây bất thụ hạt phấn, gen kiểm soát cyt^N xác định hạt phấn bình thường. Kiểu gen cyt^Srfrf làm cho cây bị bất thụ đực tế bào chất, các kiểu gen cyt^SRfRf, cyt^S Rfrf, cyt^Nrfrf, cyt^N RfRf, cyt^NRfrf đều bình thường. Yếu tố Rf không làm thay đổi cấu trúc và tính chất của tế bào chất cyt^S, mà có tác dụng ức chế sự biểu hiện bất thụ đực.

+ Giả thuyết đa nhân tố: sự tương tác giữa một số cặp gen trong nhân tế bào với các nhân tố kiểm soát trong tế bào chất gây nên hiện tượng bất thụ đực tế bào chất. Các nghiên cứu cho thấy ở ngô có từ 3 - 5 gen nhân tham gia xác định tính bất thụ tế bào chất (Nikoro, Xidorov 1966).

Ngày nay nhiều công trình nghiên cứu ở nhiều loài thực vật đã khẳng định các gen gây tính bất thụ và các gen phục hồi hữu thụ ở các dòng, giống khác nhau có sự khác biệt nhau, có hàng chục gen khác nhau kiểm soát tính bất thụ hạt phấn ở thực vật (Dubinhin 1967,1982)

Trong thực tiễn sản xuất nông nghiệp, con người ứng dụng tính bất thụ đực tế bào chất ở ngô, lúa và nhiều loại cây trồng khác để sản suất hạt ngô lai, lúa lai và các hạt lai có năng suất cao. Khi gieo trồng dòng bất thụ đực tế bào chất, bên cạnh một dòng bình thường sự giao phấn giữa 2 dòng tạo ra 100% hạt lai phục vụ sản xuất, nâng cao năng suất cây trồng.

Chương 8

ĐỘT BIẾN

I. KHÁI NIỆM BIẾN DỊ

Biến dị và di truyền là đặc tính vốn có của mỗi sinh vật, là hai mặt đối lập thống nhất. Trong quá trình tồn tại và phát triển, mỗi cá thể sinh vật không ngừng phát sinh các biến dị không định hướng, những biến dị có lợi cho bản thân sinh vật do truyền cho các thế hệ sau sẽ dần dần trở thành phổ biến. Biến dị và di truyền là sự biểu hiện của các qui luật vận động của vật chất di truyền. Biến dị được chia làm hai loại biến dị không di truyền và biến dị di truyền. Biến dị không di truyền gọi là thường biến, biến dị di truyền gồm biến dị tổ hợp và đột biến.

Thường biến là sự biểu hiện các dạng kiểu hình khác nhau, của cùng một kiểu gen trong những môi trường khác nhau. Thường biến biểu hiện khả năng thích nghi của sinh vật với điều kiện ngoại cảnh. Thường biến không di truyền được, không có ý nghĩa trong chọn lọc và trong quá trình tiến hoá của sinh vật.

Đột biến (mutation), bắt nguồn từ chữ Hy Lạp *Mutatio*, là những biến đổi trong vật chất di truyền, nghĩa là những biến đổi trong cấu trúc gen hoặc các biến đổi trong cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể. Đột biến tạo nên vô số các biến dị, làm tăng tính đa dạng trong sinh giới, là cơ sở của các quá trình chọn lọc. Trong quá trình tiến hoá lâu dài của sinh giới, chọn lọc và duy trì các đột biến tự nhiên hình thành các loài mới, giống mới. Trong chọn lọc nhân tạo con người giữ lại những cá thể có nhiều đặc điểm quí, hoặc có lợi tạo nên vô số các giống vật nuôi cây trồng mới.

Biến dị tổ hợp là sự tổ hợp lại các gen của bố mẹ ở thế hệ con do sự kết hợp các giao tử, hoặc sự tổ hợp lại các gen trong kiểu gen do trao đổi chéo và hoán vị gen, làm cho con cháu có các đặc điểm mới khác với bố mẹ.

Trên cơ sở nguyên nhân phát sinh đột biến, nguồn gốc và đặc điểm của đột biến chia thành các loại đột biến khác nhau. Dựa vào thành phần cấu trúc bị đột biến, các đột biến có thể chia thành bốn nhóm: đột biến gen, đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể, đột biến số lượng nhiễm sắc thể và đột biến tế bào chất. Dựa vào nguyên nhân phát sinh đột biến, các đột biến được chia thành hai nhóm: đột biến tự nhiên và đột biến nhân tạo. Dựa vào hậu quả có thể chia thành các loại: đột biến gây chết, đột biến giảm sống, đột biến trung tính...

II. NHÂN TỐ ĐỘT BIẾN VÀ CƠ CHẾ GÂY ĐỘT BIẾN

Nhân tố gây đột biến (mutagen) gồm các nhân tố vật lí, hoá học và nhân tố sinh học. Các nhân tố gây đột biến có thể làm tăng tần số đột biến của sinh vật lên 10 đến 100. 000 lần. Nhóm nhân tố đột biến được nghiên cứu kỹ là tia UV, tia phóng xạ, tia X, các chất đồng đẳng của các base nitơ, acid nitơ và các tác nhân alkyl hoá.. trong đó tác dụng của tia bức xạ được nghiên cứu ứng dụng nhiều trong gây đột biến thực nghiệm.

1. Tia bức xạ không gây ion hoá

Tia UV (tia tử ngoại) là tia bức xạ không gây ion hoá, bước sóng từ 136 - 4000 Å. Photon của tia UV có năng lượng thấp không đủ gây ion hoá, không xuyên sâu nên không tác động được đến các tế bào nằm sâu trong cơ thể sinh vật. Tia UV có hiệu quả gây đột biến ở vi sinh vật, hạt phấn... Tác động gây đột biến của loại tia UV chủ yếu là do acid nucleic và các hợp chất trong tế bào hấp thụ, sự hấp thụ càng mạnh thì khả năng gây đột biến càng cao. Acid nucleic hấp thụ bước sóng 260 nm cao nhất, nên bước sóng 260 nm có hiệu quả gây đột biến nhiều nhất.

Tia UV có thể gây nên các đột biến gen và các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể. Tia UV gây ra sự biến đổi quang oxy hoá các gốc purin và pirimidin. Tác động của tia UV làm cho adenin (A) bị biến thành hypoxantin, dẫn đến những thay đổi hoá

học của DNA. Tia UV làm cho các base thymin gần nhau trên phân tử DNA liên kết với nhau tạo dimer thymin, gây méo mó phân tử DNA. Nếu trên phân tử DNA có nhiều dimer thymin có thể làm mất khả năng tái bản của DNA.

Trong các tế bào sống một số enzym có khả năng làm đứt mạch trùng phân của dimer thymin khôi phục chức năng của DNA. Do đó khi tia tử ngoại tác động thường ít làm chết tế bào mà tạo nên các đột biến. Độ sống sót của các tế bào vi sinh vật phụ thuộc vào liều lượng hấp phụ tia UV. Độ đậm đặc của dịch huyền phù được chiếu tia UV ảnh hưởng rõ rệt đến tần số đột biến. Dịch huyền phù quá đậm đặc (lớn hơn 1.10^8 tế bào/ml) tia UV bị các tế bào che lấp lẫn nhau hiệu quả hấp phụ tia UV không cao, ngược lại dịch huyền phù quá loãng dễ gây chết các tế bào khi bị chiếu tia UV. Tác động gây chết tế bào và gây đột biến của tia UV còn phụ thuộc nhiều vào trạng thái sinh lý của các tế bào, tuổi giống, loài sinh vật...

Tế bào ở giai đoạn sinh trưởng luỹ thừa (pha log), mẫn cảm với tia UV cao hơn so với pha ổn định. Hiện nay mối tương quan giữa liều lượng tia UV được tế bào hấp thụ và số lượng đột biến tạo nên chưa được xác định được rõ ràng. Với liều lượng tia UV thấp thì tần số đột biến có xu hướng tỷ lệ thuận, khi liều lượng tăng lên thì tần số đột biến không tăng kịp và đến một mức nhất định thì lại giảm xuống.

2. Tia bức xạ ion hoá

Tia bức xạ ion hoá còn gọi là tia phóng xạ ion hoá bao gồm hai loại:

+ Tia có bản chất sóng điện từ với bước sóng cực ngắn gồm tia Röntgen (tia X) và tia gamma (γ).

+ Tia có bản chất là các hạt gồm tia alpha (α), tia beta (β), và các proton, notron.

Các tia bức xạ ion hoá có năng lượng lớn, làm cho các phân tử nước và các hợp chất khác trong tế bào bị phá vỡ thành những phần tử tích điện (bị ion hoá). Các dạng bức xạ ion hoá đều có hiệu ứng gây đột biến, gây chết tế bào. Khi có mặt O_2, bức xạ ion hoá sản sinh ra peroxid hydro và nhiều chất phản ứng mạnh làm tổn thương DNA.

- Tia Röntgen (tia X) có bước sóng dưới 10 Å, được tạo nên từ các máy phát Röntgen. Tia X có khả năng xuyên sâu kém, dùng trong y học là chủ yếu.

- Tia gamma (γ) có bước sóng ngắn nhất dưới 1,0 Å do hạt nhân nguyên tử bị kích thích phóng ra. Tia γ thường xuất hiện trong quá trình phân rã hạt nhân các đồng vị phóng xạ hoặc các phản ứng hạt nhân. Trong sinh học thường sử dụng tia gamma là đồng vị phóng xạ Co^{60} để gây đột biến. Tia γ tác động giống như tia X, nhưng bước sóng ngắn hơn nên độ xuyên sâu cao hơn. Tia γ được sử dụng nhiều trong gây đột biến nhân tạo ở thực vật, nhiều giống lúa đột biến chịu hạn, chịu úng, chống sâu bệnh, năng suất cao được tạo ra nhờ xử lí đột biến bằng tia γ và chọn lọc.

- Tia alpha (α) là tia phóng xạ ion hoá bản chất hạt, hạt α được hình thành từ hạt nhân của nguyên tử helium (He), gồm 2 proton và 2 nơtron. Hạt α có khả năng xuyên sâu 0,07 mm trong mô sinh vật.

- Tia beta (β) là chùm điện tử giải phóng ra từ nguyên tử của các đồng vị phóng xạ P^{32} và S^{35}, tia β ít được dùng trong gây đột biến nhân tạo.

Liều lượng phóng xạ ion hoá thường được đo bằng đơn vị rơnghen (R) và rad. Một rơnghen (1 R) là lượng phóng xạ tạo ra trong $1cm^3$ không khí khô, ở điều kiện 0^oC dưới áp suất 760mmHg. Đối với 1g mô sinh vật sống thì 1R có khả năng gây số lượng ion hoá gấp 1000 lần so với $1cm^3$ không khí khô. Đơn vị rad (1 rad) là lượng phóng xạ hấp thụ năng lượng làm cho 1g mô sinh vật sống bị chiếu xạ hấp thụ năng lượng 100 erg, 1rad = 100 erg/g. Hai đơn vị Röntgen và rad được coi là tương đương nhau.

$1R = 1 \text{ rad} = 2,58 \times 10^{-4}$ (culong/kg không khí)

1rad = 100 erg/g, 1GY (gray) = 100 rad = 100 R

Tia phóng xạ ion hoá gây tổn thương cấu trúc DNA, do bức xạ ion hoá có thể do đứt một mạch đơn, đứt mạch kép hoặc sự thay thế các base nitơ. Sự thay thế các base nitơ gây nên các đột biến ở sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn. Đối với sinh vật nhân chuẩn, bức xạ ion hoá làm đứt gãy nhiễm sắc thể, thường gây chết. Nhiều loài

sinh vật trong tế bào có hệ thống tự sửa chữa đột biến, tuy nhiên sửa chữa các đột biến có thể dẫn đến đảo đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn và mất đoạn.

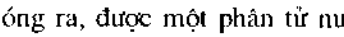
Hiện nay có nhiều giả thuyết khác nhau giải thích cơ chế gây đột biến của tia phóng xạ ion hoá.

- Thuyết bia: Thuyết bia cho rằng các tế bào, các cơ thể sinh vật có những trung tâm nhạy cảm phóng xạ được coi như những đơn vị cảm ứng như một cái bia. Khi các lượng tử hoặc các hạt cơ bản va chạm vào các đơn vị cảm ứng, gây ra biến đổi dẫn đến đột biến. Khi tăng liều lượng phóng xạ quá ngưỡng, hiệu ứng phóng xạ giảm do có sự va chạm tiếp theo của các lượng tử với các nhân tố vật chất đã chết.

- Thuyết độc tố: Thuyết độc tố cho rằng tác động của tia xạ đối với tế bào sinh vật làm tạo nên các hợp chất độc.

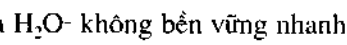
- Thuyết enzym: Thuyết enzym cho rằng dưới tác động của tia xạ làm thay đổi hoạt tính của các enzym. Do tác động của tia phóng xạ ion hoá, làm cho các enzym trong lyzoxom được giải phóng vào tế bào chất gây rối loạn sự trao đổi chất của tế bào.

- Thuyết cơ chế tác dụng gián tiếp: Theo thuyết cơ chế tác dụng gián tiếp hay thuyết các gốc tự do phân tử nước trong tế bào có vai trò trong sự tạo thành các đột biến. Trong các tổ chức sống nước chiếm 85%, khi các tia phóng xạ ion hoá tác động vào tế bào hoặc cơ thể, các phân tử nước trong tế bào hấp thụ năng lượng, bị mất đi một điện tử (e) trở thành ion dương.



$$H_2O \rightarrow H_2O^+ + e$$

Điện tử mới phóng ra, được một phân tử nước khác đã bị phóng xạ kích động hấp thụ trở thành ion âm:



$$H_2O + e \rightarrow H_2O^-$$

Các ion H_2O^+ và H_2O^- không bền vững nhanh chóng bị phân huỷ tạo ra các gốc tự do $H^\bullet$ và $OH^\bullet$ và hai ion bền vững H^+ và OH^-. Các gốc tự do $H^\bullet$ và $OH^\bullet$ không bền, gốc $H^\bullet$ có thời gian tồn tại khoảng 10^{-6} giây đến 10^{-5} giây sau đó chúng có thể tác dụng với nhau: $H^\bullet + H^\bullet = H_2$.

Khi có oxy $H^\bullet + O_2 = HO_2^\bullet$

Các gốc tự do có thể kết hợp với các chất trong tế bào tạo thành peroxyt. Các peroxyt tác dụng lên phân tử DNA làm mất gốc NH_2 của gốc dị vòng chứa nitơ, mất nguyên tử hydro hoặc làm đứt liên kết giữa đường pentoza và gốc dị vòng chứa nitơ, hoặc có thể làm đứt vòng pirimidin gây đứt mạch DNA, dẫn đến các đột biến gen.

- Thuyết hiện đại: Thuyết hiện đại giải thích cơ chế tác dụng của tia phóng xạ lên vật chất di truyền bằng nồng độ và trạng thái của các chất hữu cơ trong tế bào. Khi tế bào có nồng độ các chất hữu cơ cao, sự va chạm của lượng tử vào các phân tử nhiều hơn, dẫn đến hiệu quả trực tiếp lớn hơn. Nếu nồng-độ thấp, các lượng tử của tia phóng xạ phân huỷ nước tạo thành các gốc tự do ($H^{\bullet}$ và $OH^{\bullet}$), hình thành các peroxyt vô cơ và hữu cơ làm biến đổi cấu trúc DNA dẫn đến các đột biến.

Độ cảm ứng phóng xạ (radiosenbility): Mỗi cá thể sinh vật có khả năng chịu đựng liều lượng phóng xạ khác nhau, gọi là mức độ cảm ứng phóng xạ. Trong cùng cơ thể các bộ phận, cơ quan khác nhau có độ cảm ứng phóng xạ khác nhau. Độ cảm ứng phóng xạ phụ thuộc vào loài, kiểu gen, tuổi, giai đoạn phát triển của cơ thể. Các loài khác nhau có độ cảm ứng phóng xạ khác nhau. Liều gây chết 50% (LD 50) là liều sau khi chiếu xạ gây chết các sinh vật, ở thực vật liều LD 50 được tính bằng số lượng cá thể còn sống từ lúc chiếu xạ đến trước khi ra hoa, còn với động vật số cá thể còn sống vào thời điểm 30 ngày sau chiếu xạ...

Liều LD 50 ở một số loài sinh vật:

Gà	600 - 800 R
Khỉ	550 - 650 R
Chuột nhắt	500 - 550 R
Ruồi giấm	46.000 R
Lúa (hạt khô)	50.000 - 75.000 R
Cà chua (hạt khô)	20.000

Số lượng đột biến gây tạo nên bởi mỗi liều rơnghen là không đổi, nghĩa là số lượng đột biến không phụ thuộc vào thời gian chiếu xạ dài hay ngắn, phụ thuộc chủ yếu vào cường độ phóng xạ.

Tính mẫn cảm phóng xạ thay đổi theo độ tuổi cá thể, trạng thái sinh lý, điều kiện dinh dưỡng. Hàm lượng nước và hàm lượng oxy khi chiếu xạ ảnh hưởng rõ rệt đến tính mẫn cảm phóng xạ. Ví dụ, ở lúa mạch hàm lượng nước từ 8 - 20% có tính mẫn cảm phóng xạ tia X giảm, khi hàm lượng nước trên 20% tính mẫn cảm phóng xạ tia X tăng. Tăng hàm lượng oxy làm tăng tính mẫn cảm phóng xạ, ở nồng độ oxy khoảng 20% hiệu quả gây đột biến cao nhất.

3. Nhiệt độ là nhân tố gây đột biến

Nhiệt độ tăng hoặc giảm dần trong giới hạn ít ảnh hưởng đến tần số đột biến. Sốc nhiệt hoặc làm thay đổi nhiệt độ, nhiệt độ cao hơn hoặc thấp hơn mức trung bình đột ngột có hiệu quả gây đột biến. Nguyên nhân do mỗi cơ thể sinh vật có cơ chế nội cân bằng, giữ cho hoạt động sinh lí của tế bào không bị thay đổi khi nhiệt độ thay đổi. Khi bị sốc nhiệt cơ chế tự bảo vệ của tế bào không khởi động kịp, gây các chấn thương trong bộ máy di truyền của tế bào, gây biến tính không thuận nghịch của các phân tử DNA, xuất hiện các biến đổi trong cấu trúc di truyền của tế bào tạo nên các đột biến.

4. Tác nhân hoá học gây đột biến

Các tác nhân hoá học gây đột biến, chủ yếu do làm thay đổi cấu trúc gen và cấu trúc nhiễm sắc thể. Các hoá chất gây đột biến có khả năng thẩm thấu cao qua màng tế bào, màng nhân và đồng thời gây thay đổi trạng thái của DNA và nhiễm sắc thể. Tác nhân hoá học gây đột biến có thể chia thành một số nhóm chủ yếu: acid nitơ và dẫn xuất của nó, các chất alkyl hoá, các chất acridin...

4.1. Acid nitrơ (HNO_2)

Acid nitrơ có tác dụng gây biến đổi hoá học của các base nitơ trên phân tử DNA. Do tác dụng của acid nitrơ gây các phản ứng oxy hoá khử amin, làm cho nhóm amin ($-NH_2$) trong các base nitơ của DNA bị thay thế bằng nhóm hydroxyl (- OH) hay oxy (O_2). Các base guanin (G) khi bị khử amin biến thành xantin không gây đột biến, do cấu trúc xantin giống guanin. Các base Adenin (A) bị khử amin trở thành

hypoxantin (Hy), hypoxantin có xu hướng ghép đôi với cytosin thành cặp Hy - C, gây đồng hoán A = T → G ≡ C. Kết quả sau hai lần tái bản phân tử DNA mới có cặp G ≡ C thay vào vị trí của cặp A = T làm thay đổi cấu trúc DNA tạo nên đột biến. Trường hợp cytosin (C) bị khử amin trở thành uracin (U) có sự ghép đôi giữa uracin (U) và adenin (A), gây ra đồng hoán G ≡ C → A= T, sau tái bản DNA xuất hiện cặp A = T thay thế cặp G ≡ C, gây ra đột biến.

Acid nitrơ và các dẫn xuất của nó ngoài tác dụng khử amin, còn làm đứt mối liên kết hydro trong phân tử DNA đang tái bản, tạo nên các đột biến. Các hợp chất hoá học gây đột biến thuộc nhóm acid nitrơ rất có hiệu quả đối với sinh vật nhân sơ, ít hoặc không có hiệu quả gây đột biến ở sinh vật bậc cao.

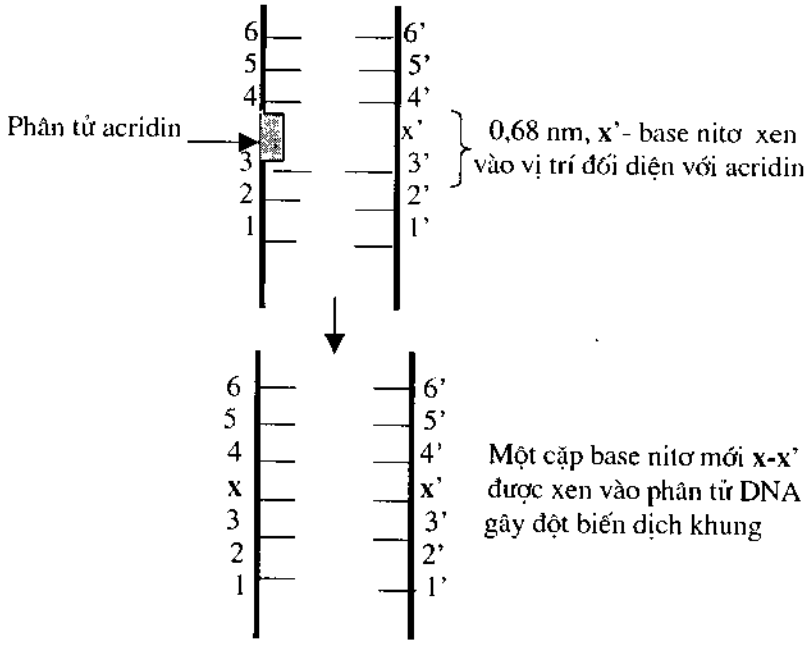
4.2. Các hợp chất gây alkyl hoá

Các hợp chất gây alkyl hoá như ethylmethan sunfonat (EMS), nitromethylure (NMU), ethylenimin (EI) là những tác nhân gây đột biến được sử dụng nhiều trong nghiên cứu di truyền học. Các hợp chất này bổ sung (CH_3 - CH_2-) và các nhóm tương ứng cho các base nitơ của phân tử DNA, có hiệu quả gây đột biến với sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn.

Sự alkyl hoá guanin (G) và thymin (T) đều gây hiện tượng ghép đôi sai, dẫn đến các đồng hoán A=T → G ≡ C và G ≡ C → A=T.. Sự alkyl hoá guanin còn dẫn đến sự khử purin, hoặc mất nhóm base nitơ bị alkyl hoá trên phân tử DNA, do phá vỡ liên kết giữa nitơ của purin và đường deoxyriboza, có thể gây các đột biến.

4.3. Các chất gây đột biến nhóm acridin

Các chất gây đột biến nhóm acridin như proflavin được dùng nhiều trong nghiên cứu đột biến gen. Các chất thuộc nhóm này làm thêm hoặc mất đi một cặp base nitơ của phân tử DNA. Khi acridin xen vào giữa hai cặp base nitơ liền kề của phân tử DNA chưa tái bản, acridin gắn vào mạch khuôn làm cho khoảng cách giữa hai cặp base nitơ là 0,68nm (gấp đôi khoảng cách bình thường).



Hình 8.1. Sơ đồ tác động gây đột biến của acridin.

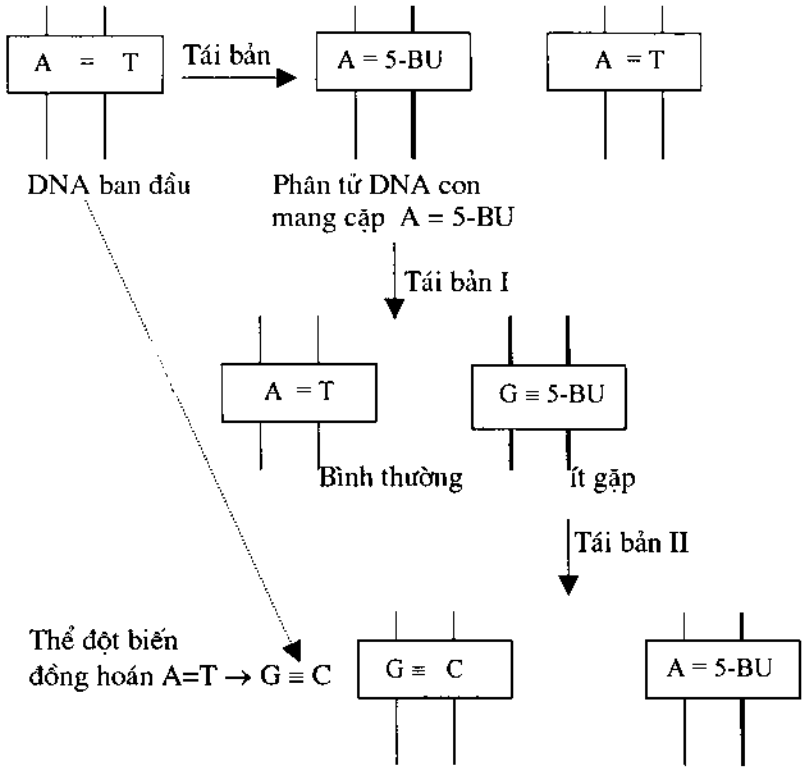
Khi phân tử DNA này tái bản, một base nitơ ngẫu nhiên được gắn xen vào mạch đơn DNA đang tái bản, ở vị trí đối diện phân tử acridin. Trong lần tái bản thứ hai, một base nitơ khác bắt cặp bổ sung với base nitơ mới xen vào, kết quả làm cho phân tử DNA được bổ sung một cặp base nitơ so với khuôn mẫu dẫn đến sự thay đổi khung dịch mã, gây nên các đột biến dịch khung.

Khi phân tử acridin xen vào vị trí của base nitơ trên mạch đơn của DNA. Phân tử acridin bắt cặp với base nitơ trên mạch đơn tương ứng của DNA. Nếu phân tử acridin tách ra khỏi mạch đơn trước khi DNA tái bản, sẽ tạo nên các phân tử DNA sau tái bản bị mất một cặp base nitơ, dẫn đến đột biến dịch khung.

4.4. Các chất đồng đẳng của base nitơ

Các chất đồng đẳng của base nitơ có khả năng thay thế base nitơ bình thường của DNA trong quá trình tái bản DNA, một trong những chất đồng đẳng là

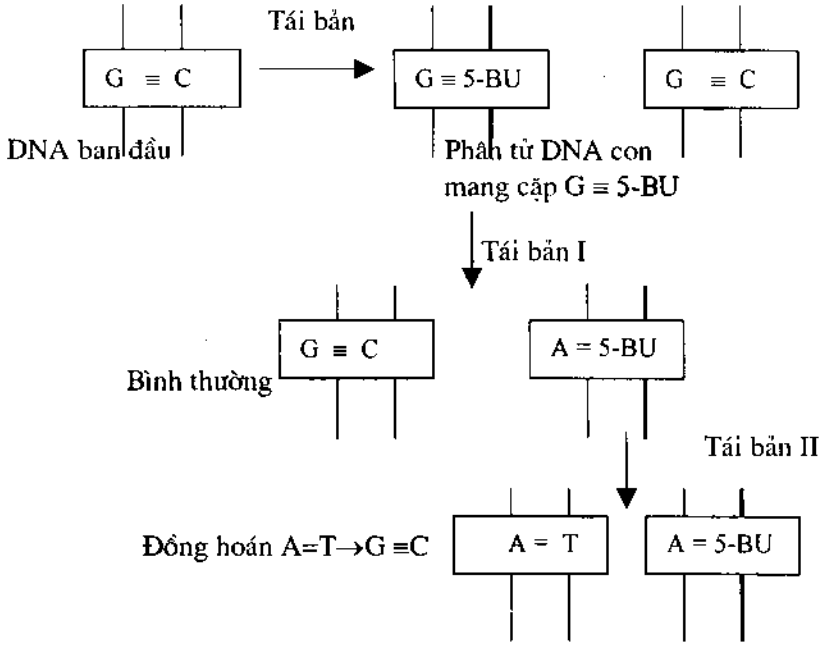
5 - bromuraxin (5-BU). Khi 5-BU ở dạng đồng phân bền vững (dạng keto), có cấu tạo gần giống với thymin nên có thể thay thế thymin trong cặp A = T trở thành cặp A = 5-BU.



Hình 8.2. Sơ đồ gây biến đổi cặp A = T thành G ≡ C.

Hợp chất 5-BU dạng enol do có cấu trúc gần giống với cytosin (C), nên có thể thay thế cytosin (C) trong cặp G ≡ C trở thành cặp G ≡ 5-BU. Sự thay thế cặp A = T bằng cặp A = 5-BU không xảy ra đột biến, do không làm thay đổi chức năng DNA. Lần tái bản tiếp theo có sự việc ghép đôi giữa 5- BU với guanin (G), tạo

thành hai cặp G ≡ C và A = 5-BU. Như vậy sau hai lần tái bản liên tiếp, cặp A =T trong phân tử DNA được thay bằng cặp G ≡ C, gây biến đổi cấu trúc gen và tạo nên các đột biến.

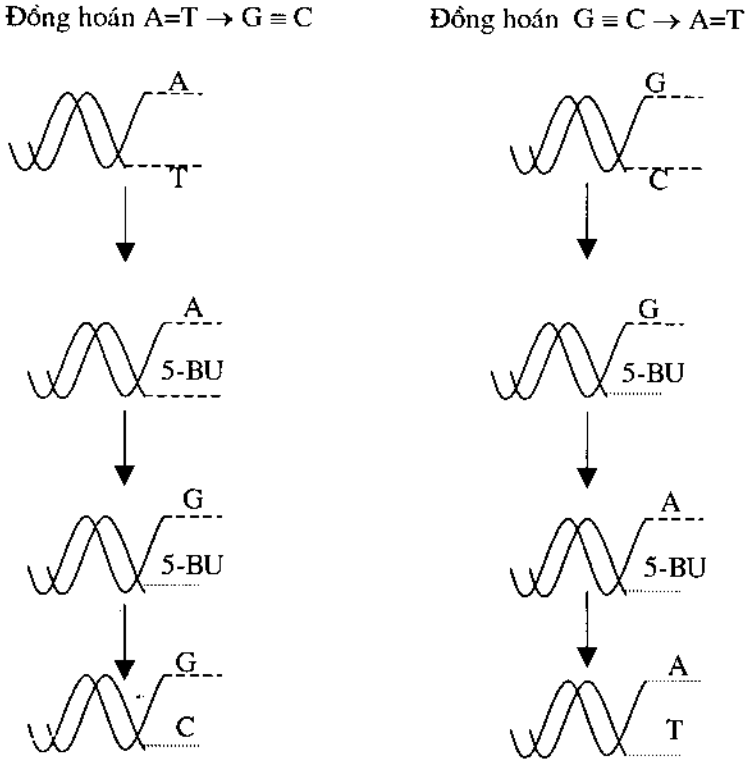


Hình 8.3. Sơ đồ gây biến đổi cặp G ≡ C thành A = T .

III. CƠ CHẾ PHÂN TỬ ĐỘT BIẾN

Các sai sót trong quá trình tái bản DNA đều gây biến đổi cấu trúc di truyền của tế bào tạo nên các đột biến. Phần lớn sai sót được sửa chữa nhờ các cơ chế tự sửa chữa trong tế bào, tuy nhiên vẫn còn các sai sót tạo nên các đột biến. Các base nitơ bắt cặp không theo nguyên tắc bổ sung, dẫn đến cấu trúc chuỗi polynucleotid của phân tử DNA bị thay đổi sau khi tái bản DNA, tạo nên các đột biến.

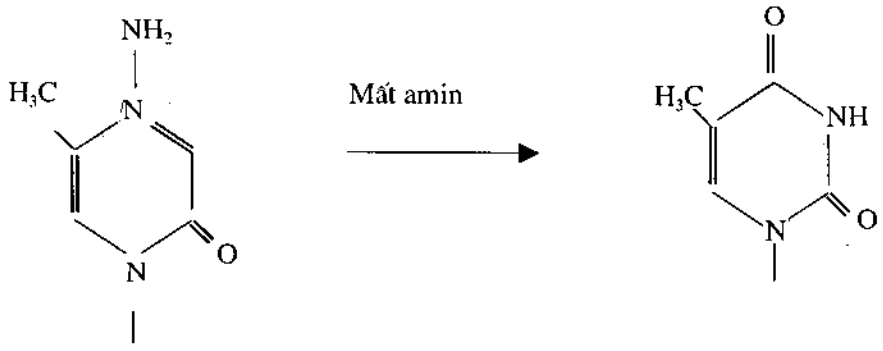
Đột biến đồng hoán xảy ra khi một base purin được thay bằng base purin khác, hoặc thay thế base pyrimidin này bằng base pyrimidin khác. Khi một base purin thay bằng base pyrimidin hoặc ngược lại gọi là đột biến nghịch hoán.



Hình 8.4. Sơ đồ gây biến đổi cấu trúc DNA của 5-BU .

Các sai hỏng ngẫu nhiên làm tăng hoặc giảm các nucleotid trên phân tử DNA đều gây đột biến. Sai hỏng ngẫu nhiên thường gặp nhất do bị đứt liên kết glucozit giữa C_1 của pentoza với base nitơ, làm mất adenin (A) hoặc guanin (G). Khi nhóm amin ($-NH_2$) của cytosin (C) bị mất tạo thành uracin (U), các uracin mới bắt cặp bổ sung với adenin (A) trong sao chép, gây ra đồng hoán G ≡ C → A = U. Sai hỏng kiểu này có thể được sửa chữa nhờ enzym uracin DNA glycol. Enzym uracin DNA glycol nhận biết đặc hiệu uracin trên phân tử DNA, cắt bỏ các uracin bắt cặp không theo nguyên tắc bổ sung tạo các lỗ hổng, sau đó enzym DNA polymerase tổng hợp base nitơ mới phù hợp.

Trên phân tử DNA, một số cytosin được methyl hoá thành 5-methyl cytosin, chất này mất nhóm amin biến thành thymin, các sai hỏng này enzym uracin DNA-glycol không phát hiện được, không tự sửa chữa gây các đột biến ở vi khuẩn và tế bào sinh vật bậc cao.



5-Methylcytosin Thymin (T)

Các tác nhân gây đột biến tác động vào cấu trúc phân tử DNA, gây biến đổi cấu trúc DNA, tạo nên các đột biến cấu trúc gen và đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể.

Đột biến gen và đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể có thể do một số trường hợp biến đổi sau:

- Đứt kép: đứt cả 2 mạch đơn của phân tử DNA, giảm chiều dài phân tử DNA, giảm độ nhớt của dung dịch.

- Đứt đơn: đứt ở một mạch đơn, làm phân tử DNA biến đổi hình dạng, tạo thành các cuộn

- Gây hiện tượng đồng hoán, nghịch hoán, làm thay đổi cấu trúc phân tử của DNA. Hai base thymin gần kề nhau liên kết chặt chẽ với nhau bằng các liên kết đồng hoá trị tạo các dimer thymin, làm méo mó chuỗi xoắn kép, ức chế tái bản DNA.

- Do các đoạn xen IS hoặc các gen nhảy Transposon gắn vào gen làm thay đổi trật tự sắp xếp của các nucleotid trong gen.

- Tác động của hệ thống tự sửa chữa SOS dẫn đến sự ghép đôi các base sai, không theo nguyên tắc bổ sung giữa các base nitơ hoặc dẫn đến hiện tượng đảo đoạn, chuyển đoạn nhiễm sắc thể.

Đột biến số lượng nhiễm sắc thể tạo nên các dạng đa bội thể do các biến đổi ở mức tế bào:

- Không xảy ra giảm nhiễm tạo thành các giao tử lưỡng bội (2n), các giao tử kết hợp với nhau tạo nên hợp tử tứ bội (4n).

- Do hợp tử phân chia không bình thường ngay từ giai đoạn đầu tiên, tạo nên cơ thể có bộ nhiễm sắc thể tăng gấp đôi.

- Tác động của các nhân tố gây đột biến khi giảm phân hình thành giao tử, do một cặp nhiễm sắc thể không phân ly đều về các giao tử. Tạo nên các giao tử thừa hoặc thiếu một nhiễm sắc thể, sẽ hình thành các hợp tử (2n + 1), (2n - 1) hoặc (2n +2)...

IV. QUÁ TRÌNH TỰ SỬA CHỮA SAU ĐỘT BIẾN

Tự sửa chữa sai sót của DNA là thuộc tính của mọi tế bào sống, khôi phục lại cấu trúc tự nhiên của DNA khi bị các tác nhân gây đột biến làm tổn thương. Đến nay nhiều cơ chế tự sửa chữa sai sót của phân tử DNA, đã được nghiên cứu và xác định trong các tế bào sống.

- Sửa chữa trực tiếp bằng quang phục hoạt (photo reparation): Khi có tác động của tia tử ngoại (tia UV), các thymin nằm kề nhau xích lại gần nhau hình thành các dimer thymin, gây hiện tượng méo mó chuỗi xoắn kép. Dưới tác động của các photon ánh sáng, các enzym photolyase có thể trực tiếp loại bỏ các dimer thymin, tách thành các monome bình thường làm cho cấu trúc phân tử DNA được phục hồi.

- Tự sửa chữa SOS: là cơ chế làm cho khi phân tử DNA tái bản, hoặc phiên mã bỏ qua các đoạn bị tổn thương, bỏ qua các dimer thymin vẫn đảm bảo sự tái bản hoặc phiên mã chính xác. Trong cơ chế SOS nhờ hệ thống đọc - sửa của enzym DNA polymerase bị làm yếu đi, làm cho quá trình polyme hoá đi qua được các dime thymin tránh được các sai sót.

Sửa chữa bằng cơ chế cắt bỏ các sai sót: nhờ hàng loạt các enzym nhận biết các base nitơ bị ghép sai và cắt bỏ, enzym DNA polymerase I xúc tác tổng hợp các base phù hợp, quá trình này rất phức tạp chưa được biết cặn kẽ.

V. ĐỘT BIẾN NHÂN TẠO VÀ TẠO GIỐNG MỚI BẰNG PHƯƠNG PHÁP GÂY ĐỘT BIẾN

1. Phương pháp gây đột biến nhân tạo ở cây trồng

Nguyên tắc cơ bản để gây tạo đột biến thành công là dựa vào đặc điểm sinh trưởng, phát triển của cây trồng và vật nuôi để chọn phương pháp và tác nhân gây đột biến thích hợp. Đối với động vật gây đột biến nhân tạo còn ít thành công.

Đối với cây trồng sinh sản sinh dưỡng bộ phận xử lí thường chọn là mô phân sinh, đỉnh chồi hoặc củ. Tác nhân gây đột biến thường là tia X, tia (γ) hoặc các hoá chất gây đột biến (conxicin, dimethyl sulfat- DMS, diethylsunfat- DES, ethylmethan sunfonat- EMS...). Ví dụ : Hoa cẩm chướng xử lí thân bằng tia X liều lượng 1,5 - 2,0 Krad, khoai tây xử lí củ bằng EMS liều lượng 100-500 ppm trong 4 giờ, chuối xử lí đỉnh chồi bằng tia (γ) 1-2,5 Krad, mía xử lí chồi bằng tia (γ) 3,5 - 7,0 Krad, khoai lang xử lí thân bằng tia (γ) liều lượng 20 Krad.

Cây trồng sinh sản bằng hạt thường chọn hạt khô là bộ phận xử lí, tuỳ từng loại cây cần chọn nhân tố đột biến (mutagen) có các liều lượng khác nhau. Ví dụ, với hạt lúa khô có thể xử lí tia X liều lượng 14 - 28 Krad, hạt ngô xử lí tia (γ) 13 - 30 Krad, hạt cà chua xử lí EMS 0,8% ở 24°C trong 24 giờ, đậu tương xử lí tia (γ) 10 - 20 Krad còn đậu Hà Lan xử lí diethylsunfat- DES 0,2% ở 20°C trong 15 giờ.

Bằng xử lí đột biến kết hợp chọn lọc ở nhiều nước trên thế giới và Việt Nam đã tạo được rất nhiều giống cây lương thực, cây ăn quả đột biến có năng suất cao phẩm chất tốt được đưa vào sản xuất mang lại lợi ích kinh tế đáng kể. Các giống lúa đột biến năng suất cao, chống chịu sâu bệnh, chịu rét cứng cây DT 10, DT 11, Xuân số 5, số 6 (Việt Nam); Các giống đậu Hà Lan đột biến năng suất cao, chín sớm chống nấm (Thuỵ Điển, Nga, Mỹ , Đức); Các giống đậu tương chịu nóng, chịu hạn M103,

DT 84 (Việt Nam), nhiều giống đậu tương hàm lượng protein cao, lipit cao (Nga, Mỹ, Đức)... và nhiều giống cây trồng đột biến được sử dụng phổ biến trong sản xuất, nâng cao lợi ích kinh tế nông nghiệp.

Bảng 8.1. Tạo đột biến ở một số giống cá bằng sốc nhiệt

Loài cá	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ cá 3n, 4n	Tác giả
Cá hồi *O. keta*	7	31-32	6	Chernenko,1987
Cá hồi *Salmo gairdneri*	20	26	100	Thorgaarrd, 1987
Cá tầm	3 -7	34	33- 52	Vaseski, 1967
Cá chép	45	0-2	100	Gervai, 1980
Cá rô phi	60	11	75	Valenti, 1975
Cá trê	60	5	100	Wolters et al, 1981
Cá bơn	120-240	0-1	100	Lincoln, 1980

2. Đột biến nhân tạo ở động vật

Động vật có hệ thần kinh do vậy gây đột biến nhân tạo thường dẫn đến hiện tượng gây chết ngay ở giai đoạn phôi, hoặc chết yểu. Một số thành công gây tạo đột biến đa bội thể ở động vật chủ yếu là tạo một số giống cá đột biến có hiệu quả kinh tế cao bằng phương pháp sốc nhiệt.

Chương 9

NGUYÊN LÍ CƠ BẢN TRONG CHỌN GIỐNG

I. KHÁI NIỆM VỀ CHỌN GIỐNG

Giống vật nuôi, cây trồng và giống vi sinh vật là các quần thể sinh vật do con người tạo nên. Mỗi giống động vật, thực vật hoặc vi sinh vật đều có các đặc điểm di truyền nhất định, và có các kiểu hình hay các tính trạng có lợi cho mục đích của con người.

Chọn giống là quá trình chọn lọc do con người tiến hành. Mục đích chọn giống là làm thế nào để tách ra những các thể có kiểu gen, kiểu hình mong muốn đồng thời loại thải khỏi quần thể và những cá thể xấu, đảm bảo các cá thể được chọn lọc có các đặc điểm di truyền tốt hơn các cá thể khác trong quần thể.

II. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC

1. Chọn lọc hàng loạt

Chọn lọc hàng loạt (Mass selection) là chọn lọc các cá thể tốt về kiểu hình theo một mục đích nào đó từ một quần thể ban đầu. Các tính trạng chọn lọc khác nhau tuỳ theo mục đích chọn giống, ví dụ như tốc độ sinh trưởng, khả năng chịu bệnh và một số các chỉ tiêu sinh hoá...

Trong chọn lọc hàng loạt các cá thể được chọn có kiểu gen chưa rõ nên hiệu quả chọn lọc có những biến đổi tuỳ theo điều kiện chọn lọc.

Hiệu quả chọn lọc hàng loạt được xác định theo công thức của Falconer (1960).

$$R = i \,.\, \delta \,.\, h^2 = S.\, h^2$$

trong đó: R: sự thay đổi giá trị tính trạng sau một thế hệ hay hiệu quả chọn lọc;

i: cường độ chọn lọc;

δ: độ lệch chuẩn;

h^2: hệ số di truyền;

S: phương sai chọn lọc (sự sai khác giữa giá trị trung bình tính trạng của cá thể chọn lọc, so với giá trị trung bình tính trạng của quần thể trước khi chọn lọc).

2. Chọn lọc cá thể

Chọn lọc cá thể (Individual selection) là chọn lọc dựa vào kiểu gen. Thường chọn các cặp bố mẹ có kiểu gen đã biết mang các tính trạng tốt, cho giao phối với nhau và theo dõi đời con, nếu các cá thể thu được ở đời sau biểu hiện các tính trạng mong muốn thì được giữ lại làm giống, ngược lại biểu hiện chưa tốt thì phải chọn lọc tiếp tục. Chọn lọc cá thể còn gọi là chọn lọc theo gia đình.

Hiệu quả chọn lọc cá thể được xác định theo công thức:

$$R_f = \frac{i_f.\delta_f.h^2}{l} = \frac{S_f.h^2 f}{l}$$

trong đó: R_f : hiệu quả chọn lọc cá thể;

i_f : cường độ chọn lọc;

δ_f : độ lệch chuẩn;

h^2_f: hệ số di truyền;

S_f : phương sai chọn lọc ;

l : khoảng cách thế hệ (tính bằng năm).

Phần lớn các tính trạng kinh tế có lợi cho con người có hệ số di truyền trung bình hoặc thấp. Chọn lọc cá thể có hiệu quả tốt với các tính trạng có hệ số di truyền thấp, sẽ giúp xác định được những kiểu gen tốt nhất.

3. Chọn lọc hỗn hợp

Chọn lọc hỗn hợp (Combinative selection) là hình thức chọn lọc phối hợp các hình thức chọn lọc trên. Hiệu quả chọn lọc hỗn hợp về lí thuyết bằng tổng các hình thức chọn lọc: $R_h = R + R_f$. Thực tế chọn lọc hỗn hợp hạn chế được nhược điểm của các hình thức chọn lọc hàng loạt và chọn lọc cá thể, và nâng cao hiệu quả chọn lọc.

4. Ưu thế lai và chọn lọc

Ưu thế lai là hiện tượng con lai F_1 thu được bằng cách lai giữa hai bố mẹ khác nhau về mặt di truyền, tỏ ra ưu việt hơn bố mẹ chúng về sinh trưởng, sức chống chịu và năng suất.

Ưu thế lai được sử dụng rộng rãi trong công tác giống. Cơ sở di truyền học của ưu thế lai được giải thích bằng các giả thuyết khác nhau gồm giả thuyết tính trội: tác động tích hợp các gen trội ở con lai và giả thuyết siêu trội: nâng cao tác dụng dị hợp của các cặp gen dị hợp tử. Trong tự nhiên ưu thế lai biểu hiện ở sự tăng sức sống của con lai. Trong thực tiễn đời sống con người tạo ra các ưu thế lai vì mục đích con người, có khi đặc điểm đó là bất lợi đối với sinh vật (chẳng hạn như tạo nên cá chép không vảy). Trong tạo ưu thế lai người ta thường lai hai hoặc nhiều dòng khác xa nhau về điều kiện phân bố địa lí, hoặc lai giữa các loài khác nhau để nâng cao hiệu quả ưu thế lai. Ưu thế lai cao nhất ở đời F_1, sau đó giảm dần do sự thay đổi trong tương quan giữa các gen thuộc các locus gen khác nhau.

Mức biểu hiện của ưu thế lai được xác định theo công thức:

$$H\% = \frac{\overline{X}_{F1} - \frac{\overline{X}_{P1} + \overline{X}_{P2}}{2}}{\frac{\overline{X}_{P1} + \overline{X}_{P2}}{2}} \times 100 = \frac{\overline{X}_{F1} + \overline{X}_{P1.P2}}{\overline{X}_{P1.P2}} \times 100,$$

trong đó: H %: Mức độ biểu hiện ưu thế lai;

$\overline{X}_{F1}$: Giá trị trung bình của tính trạng con lai F_1;

$\overline{X}_{P1}$: Giá trị trung bình của tính trạng ở con mẹ;

$\overline{X}_{P2}$: Giá trị trung bình của tính trạng ở con bố.

5. Đa bội thể và chọn lọc

Đa bội thể là các đột biến làm tăng một số lần bộ nhiễm sắc thể cơ bản của các tế bào trong cơ thể. Đa bội thể có vai trò quan trọng trong quá trình hình thành loài và tiến hoá của loài. Mức độ đa bội thể của các cá thể trong loài càng cao thì cá thể đó càng có nhiều đặc tính quí hơn. Ví dụ, lúa mì lục bội (6n) cho năng suất cao hơn, thích ứng rộng rãi hơn so với lúa mì lưỡng bội (2n). Hiện nay, giống lúa mì (6n) được gieo trồng rộng rãi, chiếm 4/5 diện tích gieo trồng trên thế giới.

Nhiều giống cây trồng hoặc giống động vật có các thể đa bội do các đột biến tự nhiên hoặc nhân tạo như: bông 2n = 26, 4n = 52; táo 2 = 34, 3n = 51; chuối 2n = 22, 3n = 33; khoai lang 2n = 90, 4n = 180; ở cá có các dạng tam bội cá chép , cá chạch, cá rô phi, cá hồi...

Trong chọn giống, có thể tạo các đa bội thể nhân tạo và chọn lọc. Đa bội thể cùng nguồn ở thực vật thường có độ hữu thụ thấp nên người ta thường khắc phục bằng cách tạo đa bội thể khác nguồn.

Để tạo các dạng đa bội thể ở thực vật thường dùng conxicin, có tác dụng làm đứt sợi tơ vô sắc, làm cho các nhiễm sắc thể không phân ly về các tế bào con, màng ngăn giữa tế bào không hình thành và tế bào không phân chia, tạo nên các cá thể có số lượng nhiễm sắc thể tăng gấp đôi (4n). Ở thực vật có thể dùng conxicin để xử lí hạt, mầm, rễ hoặc cây non sau đó kiểm tra kết quả và chọn lọc các thể đa bội. Đối với động vật tạo các dạng đa bội thường sử dụng biện pháp chiếu xạ tinh trùng, hoặc gây sốc nhiệt trứng mới thụ tinh, tạo thể tam bội ở cá có thể cho lai thể tứ bội (4n) với dạng bình thường (2n), hoặc gây sốc nhiệt

6. Kỹ thuật gen và chọn lọc

Kỹ thuật gen mở ra tiềm năng to lớn, trong chọn tạo giống thực vật, động vật và vi sinh vật. Bằng kỹ thuật gen có thể đưa bất kỳ gen mong muốn vào tế bào sinh vật, để thu được những tính trạng quí mong muốn. Đến nay các gen chống sâu bệnh,

gen diệt cỏ, gen chịu mặn chịu hạn... đã được chuyển vào nhiều giống cây trồng khác nhau như ngô, lúa, đậu tương, cải dầu, bông... Các nhà khoa học Nhật Bản đã chuyển thành công gen kháng bệnh vàng lụi (Tungro) vào lúa Japonica. Viện nghiên cứu lúa quốc tế IRRI chuyển gen Bt chống sâu đục thân cho lúa, ngô, gen Chitinase chống các bệnh nấm đạo ôn, nấm khô vằn cho lúa. Tiến sỹ Franken (IRRI) tạo thành công giống lúa biến đổi gen giàu vitamin A có tên là Franken, chứa hàm lượng β-caroten cao, chống bệnh thiếu vitamin A của trẻ em. Các nhà khoa học Mỹ chuyển gen tạo giống bông có màu xanh, vàng, đỏ... để tạo các loại vải có màu tự nhiên không cần dùng thuốc nhuộm. Các nhà khoa học thuộc Trường Đại học Toronto (Canada) tạo giống thực vật chuyển gen chịu mặn, có thể chịu được độ mặn tới 200 mM NaCl.

Năm 1999 Chính phủ Mỹ chấp nhận cho trồng phổ biến 50 loại cây có cải biến di truyền bằng công nghệ gen, trong khi đó EU chấp nhận chỉ có 9 loại cây trồng biến đổi gen.

Đối với động vật, đã có hàng loạt động vật chuyển gen phục vụ lợi ích con người. Công ty AF Protein tại Viện Massachusetts đã tạo giống cá hồi biến đổi gen ở vùng biển Canada, chỉ sau 18 tháng to gấp 5 lần cá hồi bình thường, và có tốc độ lớn gấp 10 lần cá hồi bình thường.

Năm 1997 Viện Di truyền học Cambridge tiến hành nuôi lợn chuyển gen tạo sữa có chứa một số loại protein của máu người để sản suất chất đông máu chữa các bệnh máu khó đông. Cũng theo hướng này Phòng nghiên cứu Quốc gia thuộc Bộ Năng lượng Mỹ, công bố kết quả tạo giống cây thuốc lá chuyển gen 3/2000, cây thuốc lá này sản sinh một số loại protein có trong máu người, sử dụng để sản xuất chất làm đông máu chữa các bệnh máu loãng khó đông, và để sản xuất chất Thrombin làm kín nhanh các vết phẫu thuật ở người.

Hiện nay, hàng loạt dược phẩm hiệu quả cao được sản xuất ở qui mô công nghiệp như sản xuất insulin điều trị bệnh tiểu đường, interferon chống ung thư bằng phương pháp chuyển gen ở vi sinh vật được, ở Việt Nam đã và đang sản suất thử nghiệm Superferon (interferon α), bước đầu sử dụng trong điều trị một số bệnh ung thư có hiệu quả.

Chương 10

KỸ THUẬT GEN VÀ ỨNG DỤNG

I. KỸ THUẬT GEN ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT NÔNG NGHIỆP

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được sử dụng thử nghiệm chống sâu đục thân ở ngô từ những năm 1920. Trong tế bào vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* mang các protein tinh thể độc có thể tiêu diệt ấu trùng thuộc bộ cánh vảy, cánh cứng, hai cánh và bộ cánh đều (muỗi, ruồi đen..)có ý nghĩa quan trọng trong việc phòng trừ sâu bệnh cho cây trồng và trừ côn trùng truyền bệnh sốt rét cho con người. Gen mã hoá tinh thể protein độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đã được phân lập và nhận biết từ năm 1980, gọi là gen crystal protein (Cry). Năm 1980, một số công ty công nghệ gen đã thành công chuyển gen mã hoá các tố delta- endotoxin vào cây trồng. Sử dụng súng bắn gen hoặc vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chuyển các gen mã hoá độc tố diệt côn trùng (gen Cry) vào khoai tây, cà chua, bông, cải dầu, đậu tương... tuy nhiên hiệu quả còn rất thấp.

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có 4 loại độc tố gồm nội độc tố δ (δ - endotoxin) và 3 loại ngoại độc tố α (α - exotoxin), β (β - exotoxin) và γ (γ - exotoxin). Trong đó, nội độc tố δ - endotoxin quyết định hoạt tính diệt sâu bọ và côn trùng, nên được nghiên cứu kỹ nhất. Nội độc tố δ là một protein kết tinh gồm khoảng 1180 gốc acid amin, tạo nên các dạng tinh thể độc có hình dạng kích thước, độ độc khác nhau. Đến nay, có khoảng hơn 20 gen mã hoá protein tinh thể độc của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đã được giải trình tự. Các tinh thể protein độc (tiền độc tố) của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* vào trong đường ruột côn trùng, do tác dụng của pH cao trong đường ruột côn trùng, tinh thể độc bị thuỷ phân giải phóng

các độc tố. Độc tố liên kết với tế bào ruột gây phân huỷ tế bào ruột, cản trở sự vận chuyển ion vào tế bào biểu mô ruột, gây mất khả năng ăn uống hoặc gây chết côn trùng, không độc hại cho người động vật.

Gen mã hoá độc tố thường nằm trên plasmid lớn, dài tới 3 kb. Gen Cry gồm hai phần: đoạn 2 kb tính từ đầu 5' mã hoá protein tinh thể độc, đoạn còn lại mã hoá đoạn protein có liên quan tới khả năng liên kết của độc tố với tế bào biểu mô ruột côn trùng.

Dựa vào cấu trúc, khối lượng phân tử protein độc và hoạt tính độc của các protein độc tố chia các gen mã hoá nội độc tố (δ - endotoxin) thành 6 lớp chính ký hiệu: CryI, CryII, CryIII, CryIV, CryV và CryVI. Hiện nay phát hiện thêm một số gen Cry không phổ biến ký hiệu từ CryVII đến Cry XX.

Bảng 10.1. Các nhóm gen Cry và hình dạng kích thước protein độc tố

Nhóm gen Cry	Kích thước	Hình dạng tinh thể	Phổ tác dụng
CryI(A,B,C,D,E, F)	130 -138 kDa	hình thoi	cánh cứng, vảy
CryII(A,B,C)	70 -71 kDa	lập phương	cánh cứng, vảy
CryIII (A, B, C,D)	66 - 73 kDa	hình thoi	cánh cứng
CryIV(A,B,C)	135 - 145 kDa	hình cầu, chữ nhật	hai cánh
CryV(A,C)	81 kDa	hình thoi	cánh cứng,vảy
CryVI	44 - 45 kDa	hình thoi	giun tròn

Nhóm gen CryI được nghiên cứu kỹ nhất, gen CryI mã hoá protein tinh thể độc, có trọng lượng phân tử 130 - 138 kDa, gồm 8 nhóm phụ ký hiệu từ CryIA → CryI H, mỗi nhóm phụ có một số gen. Ví dụ, gen CryIA gồm 3 gen CryIA(a), CryIA(b) và CryIA(c). Các thí nghiệm chuyển gen Cry II A(a) của vi khuẩn *Bacillus*

thuringiensis vào cây trồng làm xuất hiện nhiều protein có độc tính với côn trùng trong thân, lá cây.

Công ty Monsanto (Mỹ) sử dụng kỹ thuật gen làm thay đổi một phần cấu trúc gen Cry I A tạo một gen mới, gen này mã hoá độc tính cao có khả năng diệt côn trùng mạnh. Thay đổi trình tự các gen Cry I A (b), Cry I A (c) đã tạo các protein độc tố có hoạt tính kháng côn trùng cao hơn từ 10 - 100 lần so với gen cry I A(b) và cry I A(c) tự nhiên.

Bảng 10.2. Phổ diệt sâu hại, côn trùng của một số gen Cry

Ký hiệu	Chủng B. t	Diệt sâu hại	Bộ
CryI (a, c)	*Kurstaki*	Sâu xanh đục thân	Cánh vảy (*Lepidoptera*)
	Alesti	Sâu đo, sâu xám, mối	Cánh vảy (*Lep*), Hai cánh (*Diptera*)
CryI (b)	*Berliner*	Sâu keo, mối, sâu hại kho	Cánh vảy (*Lep*), Cánh cứng (*Coleoptera*)
CryI (b, c)	*Thuringiensis*	Sâu tơ, sâu xanh hạt cải	Cánh vảy (*Lep*)
CryI (d, e, f)	*Aizawai*	Sâu bộ cánh vẩy	Cánh vảy (*Lep*)
CryIII (a, b, c)	*Kurstaki*	Sâu bộ cánh vẩy	Cánh vảy (*Lep*)
CryIII a	*Shangai*	Bọ khoai tây	Cánh cứng (*Coleoptera*)
CryIII a	*Tenebrionis*	Bọ cánh cứng	Cánh cứng (*Coleoptera*)
CryIV a	*Israelausis*	Muỗi Culex và Aedes	Hai cánh (*Diptera*)
Cry V		Sâu keo, mối, sâu hại kho, bọ cánh cứng	Cánh vảy (*Lep*), Cánh cứng (*Coleoptera*)
Cry VI		Giun tròn	*Mematoda*

Baculovirus là virus gây nhiễm hơn 600 loài côn trùng khác nhau thuộc các bộ: *Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera* và *Coleoptera*, không gây nhiễm cho người,

động vật có vú và động vật và thực vật. Các nhà khoa học Cộng hoà Liên bang Nga tạo baculovirus tái tổ hợp bằng cách gắn gen Cry I A(b) và Cry I A(c) vào vectơ pAcUW2B, sau đó chuyển vào *Baculovirus Autographa California*. Các *baculovirus* tái tổ hợp tạo thành có hoạt lực diệt sâu và côn trùng không cao hơn *baculovirus* hoang dại, nhưng phổ diệt sâu hại rộng hơn rất nhiều lần.

Virus BTV (*Blue Tonge Virus*) mã hoá một protein độc tố rất mạnh với côn trùng và sâu hại, có khả năng xâm nhiễm côn trùng kém. Bằng kỹ thuật gen có thể tạo baculovirus tái tổ hợp mang gen độc tố mạnh của virus BTV có phổ xâm nhiễm côn trùng và sâu hại rộng, khả năng diệt sâu cao.

Đầu tiên, tạo các vectơ tái tổ hợp bằng cách gài gen độc tố của BTV vào vectơ tách dòng ở cùng phía với promoter của gen mã hoá polyhedrin (gen mã hoá độc tố của *baculovirus*), vectơ tái tổ hợp được nhân dòng trong tế bào vi khuẩn và tạo sinh khối tạo nên dạng thuốc trừ sâu sinh học nguồn gốc virus có hiệu quả diệt sâu cao. Ở nước ta các chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học nguồn gốc virus ngày càng được sử dụng rộng rãi. Ví dụ, chế phẩm virus NPV - Dp trừ sâu róm thông (*Dendrolinus punctatus*) được áp dụng ở Thanh Hoá từ 1991, hiệu quả diệt sâu đạt 74 đến 82%; chế phẩm virus NPV- Ha trừ sâu xanh hại bông (*Heliothis armigera*) sử dụng ở Công ty Bông từ 1993 có hiệu quả diệt sâu cao. Ngày nay có rất nhiều loại thuốc trừ sâu sinh học sản xuất từ kỹ thuật gen, được sử dụng trong sản xuất nông nghiệp ở nhiều nước trên thế giới và ở Việt Nam.

II. KỸ THUẬT GEN TRONG SẢN XUẤT VACCIN

Vaccin đầu tiên được Edward Jenner (Anh) chế tạo 1796 từ mụn mủ bò bị bệnh đậu mùa, vaccin dại được Louis Pasteur chế tạo thành công năm 1885. Vaccin được chia thành ba nhóm chính: vaccin giảm độc tính, vaccin bất hoạt tính và vaccin bằng kỹ thuật gen. Vaccin bất hoạt tính, được chế tạo bằng cách giết chết tác nhân gây bệnh (vaccin phòng bệnh ho gà, thương hàn, cúm, chó dại...), các vaccin nhóm này có độ an toàn cao, ổn định nhưng hiệu lực không cao. Vaccin giảm độc tính được làm từ vi khuẩn hay virus còn sống (vaccin phòng bệnh lao - BCG, sởi, bại liệt, quai

bị...) có hiệu quả cao phải luôn luôn bảo quản lạnh, một số ít trường hợp virus hoặc vi khuẩn có thể phục hồi hoặc biến đổi gen độc có thể dẫn đến hiệu ứng không mong muốn ở người được tiêm chủng.

Kỹ thuật gen nhằm gây đột biến gen hoặc loại bỏ một phần của các gen kiểm soát độc tính, vẫn giữ được tính kháng nguyên cao dùng để sản xuất vaccin. Kỹ thuật gen ngày càng được ứng dụng trong sản xuất vaccine bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, như vaccin viêm gan virus B, vaccin viêm gan virus A, vaccin lở mồm long móng, AIDS...

Vaccin chống bệnh viêm gan virus B thế hệ đầu là vaccin được chiết tách từ huyết tương người có kháng nguyên HBs rồi gây bất hoạt, để tạo vaccin cần lượng lớn huyết thanh người mang HBsAg (kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B) quá trình chiết tách phức tạp. Vaccin viêm gan virus B thế hệ thứ hai là vaccin tạo bằng cách lây nhiễm virus viêm gan B vào tế bào chủ cho virus sản xuất ra kháng nguyên, tách chiết và gây bất hoạt virus để tạo vaccin. Hạn chế của loại vaccin này là kỹ thuật chiết tách kháng nguyên phức tạp và tốn kém.

Vaccin viêm gan virus B thế hệ thứ ba là vaccin tạo bằng kỹ thuật gen. Virus có ba nhóm gen mã hoá protein vỏ virus là protein S, protein pre-S_1 và protein pre-S_2. Trong đó protein pre-S_2 có khả năng gây đáp ứng miễn dịch giúp sự bảo vệ tế bào nhanh và mạnh nhất. Gen mã hoá cho protein pre-S_2 được tách dòng năm 1981 và tái tổ hợp ở tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Rutter và cộng sự, Đại học California).

Bằng kỹ thuật gen vaccin viêm gan B tái tổ hợp được sản xuất từ 1986 với nhiều thương phẩm như Engerix B sản xuất trên nấm men tái tổ hợp (hãng Smith Kline, Mỹ); Recombivax (hãng Merck- Sharp DNA Dohme, Mỹ); Genhevac B sản xuất trên tế bào trứng chuột đất vàng Trung Quốc -CHO (hãng Pasteur Merieux). Hiện nay Việt Nam là một trong số rất ít nước sản suất thành công vaccin viêm gan virus B tái tổ hợp có hiệu quả cao ở qui mô công nghiệp.

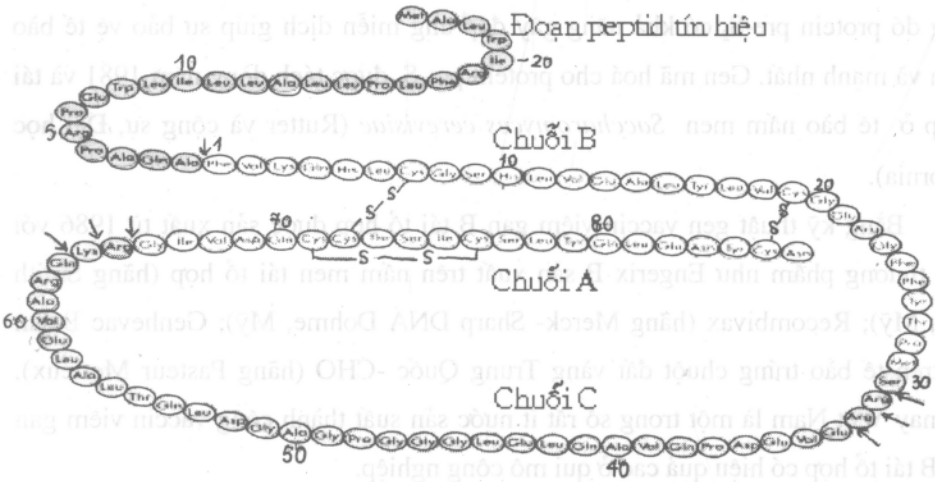
Hiện nay, tách dòng gen mã hoá protein bề mặt của virus HIV tạo vaccin miễn dịch chống lại virus HIV đang được nghiên cứu. Virus HIV có nhiều chủng

(type) khác nhau, mỗi (type) virus HIV gây bệnh ở mức độ khác nhau cần loại vaccin khác nhau trong phòng trị bệnh. Mặt khác, virus HIV có khả năng thay đổi nhanh chóng kiểu gen, thay đổi cấu trúc lớp vỏ ngoài để chống lại các vaccin gây khó khăn rất lớn khi sản xuất vaccin đặc hiệu. Sản xuất vaccin chống virus HIV đòi hỏi nhiều nghiên cứu phức tạp, thử nghiệm thận trọng. Hiện nay, vaccin chống virus HIV đang ở giai đoạn sản xuất thử nghiệm ở một số nước tiên tiến.

III. KỸ THUẬT GEN ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT CÁC HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC

1. Sản xuất insulin

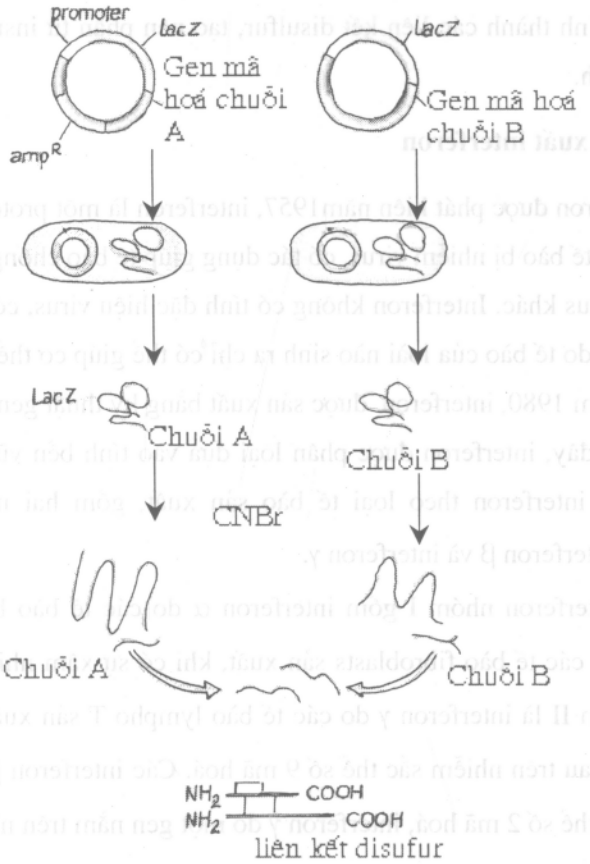
Insulin là hormon điều chỉnh quá trình đồng hoá đường trong cơ thể người và động vật. Năm 1955 trình tự các axit amin của insulin đã được xác định. Phân tử insulin gồm hai chuỗi polypeptid: chuỗi A gồm 21 axit amin và chuỗi B có 30 axit amin nối với nhau nhờ 3 liên kết disulfur. Sản phẩm đầu tiên do gen mã hoá được tổng hợp là pre- proinsulin. Phân tử pre- proinsulin được cắt bỏ đoạn peptid tín hiệu gồm 24 acid amin tạo thành phân tử tiền insulin (proinsulin).



Hình 10.1. Cấu trúc phân tử pre- proinsulin.

Trong tế bào, phân tử proinsulin bị cắt bỏ khoảng 35 acid amin ở đoạn giữa (đoạn C), một liên kết disulfur giữa 2 acid amin Cystein của chuỗi A và 2 liên kết disulfur nối các acid Cystein của chuỗi A và chuỗi B, tạo nên phân tử insulin hoàn chỉnh.

Năm 1963 - 1965 người ta đã thành công tổng hợp hoá học hai chuỗi polypeptid A và B và tạo được insulin nhân tạo đầu tiên, quá trình tổng hợp rất phức tạp với hơn 170 phản ứng, giá thành rất đắt. Sau đó insulin từ tụy bò và tụy lợn được tách chiết để chữa bệnh cho người bị tiểu đường, tuy nhiên một số người bị bệnh tiểu đường dị ứng với insulin bò và lợn, gây nên các phản ứng loại thải insulin bò và lợn như loại thải các protein lạ.



Hình 10.2. Sơ đồ tổng hợp insulin người bằng kỹ thuật gen.

Năm 1978 lần đầu tiên insulin người được tổng hợp nhờ vi khuẩn *E. coli* bằng kỹ thuật gen. Insulin người là sản phẩm protein tạo dòng đầu tiên, có giá trị chữa bệnh tiểu đường cho con người được bán trên thị trường. Đầu tiên, tổng hợp nhân tạo hai đoạn DNA mã hoá chuỗi polypeptid A và chuỗi polypeptid B. Tạo các vectơ tái tổ hợp để mỗi đoạn DNA được gắn vào plasmid pBR322 ở đoạn cuối của gen lacZ (gen mã hoá enzym β-galactosidase). Mỗi vectơ tái tổ hợp chuyển vào một dòng vi khuẩn *E. coli*. Trong một dòng vi khuẩn *E. coli* tổng hợp nên phân tử protein lai *β-gal- chuỗi A*, một dòng tổng hợp phân tử protein *lai β-gal- chuỗi B*. Các chuỗi polypeptid A và B được tách và tinh chế bằng kỹ thuật đặc trưng có sự tham gia của cyanua bromid. Kết hợp chuỗi polypeptid A và chuỗi polypeptid B trong điều kiện thích hợp để hình thành các liên kết disulfur, tạo nên phân tử insulin hoạt tính dùng trong chữa bệnh.

2. Sản xuất interferon

Interferon được phát hiện năm1957, interferon là một protein kháng thể được hình thành khi tế bào bị nhiễm virus, có tác dụng giúp tế bào chống lại sự xâm nhiễm của các loại virus khác. Interferon không có tính đặc hiệu virus, có tính đặc hiệu loài cao, interferon do tế bào của loài nào sinh ra chỉ có thể giúp cơ thể của loài đó chống lại virus. Từ năm 1980, interferon được sản xuất bằng kỹ thuật gen.

Trước đây, interferon được phân loại dựa vào tính bền vững với acid. Ngày nay phân loại interferon theo loại tế bào sản xuất, gồm hai nhóm với các loại interferon α, interferon β và interferon γ.

Các interferon nhóm I gồm interferon α do các tế bào bạch cầu sản sinh, interferon β do các tế bào fibroblasts sản xuất, khi có sự xâm nhiễm của virus. Các Interferon nhóm II là interferon γ do các tế bào lympho T sản xuất. Interferon α do 22 gen khác nhau trên nhiễm sắc thể số 9 mã hoá. Các interferon β do một gen nằm trên nhiễm sắc thể số 2 mã hoá, interferon γ do một gen nằm trên nhiễm sắc thể số 12 mã hoá.

Interferon α (IFN- α) là protein có 166 acid amin, interferon β (IFN- β) có 187 acid amin còn interferon γ (IFN- γ) có 220 acid amin. Các interferon có tác dụng kháng virus, điều hoà miễn dịch, chống lại sự tăng sinh của các tế bào khối u, chống ung thư...

Các bước chủ yếu trong công nghệ sản xuất interferon:

- Tách mRNA từ các gen mã hoá interferon của tế bào bạch cầu người (tuỳ theo yêu cầu sản xuất cần tách mRNA của gen mã hoá interferon α, interferon β hoặc interferon γ), thực hiện kỹ thuật phiên mã ngược tạo cDNA tương ứng.

- Sử dụng vectơ tách dòng là phage λ tạo các vectơ tái tổ hợp giữa cDNA với vectơ tách dòng.

- Chuyển vectơ tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli*, nuôi cấy tạo sinh khối để thu interferon.

- Tách chiết, tinh sạch interferon, bào chế với các phụ gia như NaCl, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, dextan... dùng kỹ thuật đông khô và đóng gói chế phẩm interferon.

3. Sản xuất kích tố hormon sinh trưởng người (Human growth hormone)

Hormon sinh trưởng người (hGH) là một protein có 191 axit amin, được sản xuất ở tuyến yên. Tuyến yên quyết định sự phát triển của mô xương và tốc độ phát triển của người. Một số trẻ em bị giảm chức năng tuyến yên phát triển không bình thường, do quá ít hormon sinh trưởng. Trước đây, trẻ em còi cọc được điều trị bằng hormon sinh trưởng tách chiết từ tuyến yên người chết. Điều trị cho một trẻ em thiếu năng tuyến yên rất tốn kém, trong một năm cần lượng hormon từ hơn 70 não người chết. Mặt khác hGH thu được bằng từ não người chết có thể bị lây nhiễm các bệnh ở não, nên kém hiệu quả. Đoạn peptid tín hiệu của hormon sinh trưởng người gồm 24 acid amin ở đoạn đầu của phân tử protein, peptid tín hiệu qui định vị trí nào trong tế bào protein được đưa đến hoặc tiết ra ngoài tế bào.

Các bước cơ bản trong công nghệ tổng hợp hormon sinh trưởng người bằng kỹ thuật gen:

- Tách chiết $mRNA_{hGH}$ từ các tế bào tuyến yên đang hoạt động

- Tổng hợp phân tử DNA bổ sung (cDNA) nhờ enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase) và DNA- polymerase

- Sử dụng cặp enzym giới hạn Eco RI và Hind III cắt cDNA, và loại bỏ đoạn gen điều khiển đoạn peptid tín hiệu.

- Tổng hợp nhân tạo đoạn gen mã hoá 24 acid amin có sự khác biệt một hoặc hai nucleotid so với đoạn gen mã hoá peptid tín hiệu và gắn đoạn gen này vào cDNA tạo nên gen mã hoá hGH.

- Tạo các plasmid tái tổ hợp giữa gen mã hoá hGH và plasmid pBR322.

- Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli*, nuôi cấy tạo sinh khối để thu hGH, sau đó tách và tinh chế hGH để tạo chế phẩm.

4. Tổng hợp Somatostatin

Somatostatin là hormon được tạo ra ở vùng não điều khiển thân nhiệt. Bằng kỹ thuật gen somatostatin có thể tạo ra trong *E. coli* giống như kỹ thuật tổng hợp các polypeptid ngắn.

Các bước chủ yếu của công nghệ sản xuất somatostatin:

- Tổng hợp hoá học một phân tử DNA sợi đơn có 51 base, có trình tự: TAC - 42 base (mã hoá somatostatin) - ACTATC.

- Phiên mã tạo mRNA tương ứng là: AUG - 42 base - UGAUAG. Phân tử mRNA này có một bộ ba AUG không được sử dụng cho sự khởi đầu, một trình tự gồm 42 base mã hoá somatostatin và hai bộ ba stop.

- Sử dụng kỹ thuật phiên mã ngược tạo cDNA tương ứng.

- Vectơ tách dòng là plasmid pBR322 được biến đổi có promoter lac và một phần của gen lacZ. Đoạn cuối gen lacZ mã hoá đoạn peptid có nhóm - NH_2 của enzym β-galactosidase. Tạo vectơ tái tổ hợp giữa cDNA với vectơ tách dòng.

- Biến nạp vectơ tách dòng vào tế bào chủ, trong tế bào biến nạp tạo thành một phân tử protein lai có đoạn peptid có nhóm - NH_2 của enzym β-galactosidase và đoạn peptid của somatostatin.

- Tách và tinh chế protein và xử lí với cyanua bromid, tạo nên somatostatin.

IV. LIỆU PHÁP GEN

Liệu pháp gen là kỹ thuật đưa một gen lành vào cơ thể thay thế cho gen bệnh, hoặc đưa gen cần thiết nào đó thay vào vị trí của gen bị sai hỏng. Do gen mới đưa vào cơ thể có thể biểu hiện một cách tuỳ tiện hoặc không được biểu hiện. Gen mới đưa vào có thể gây ra hiệu quả không mong muốn, có thể gắn vào vị trí gây hoạt hoá một gen tiền ung thư, dẫn đến sự biểu hiện quá độ của gen gây ra ung thư... nên khó khăn lớn nhất của kỹ thuật gen là sự kiểm soát các gen cần đưa vào cơ thể. Liệu pháp gen thành công tuỳ thuộc vào các vectơ tái tổ hợp và điều kiện kỹ thuật hiện đại.

Vectơ tách dòng sử dụng trong liệu pháp gen thường sử dụng là các virus. Nhóm retrovirus gồm các virus RNA có enzym phiên mã ngược, thường được sử dụng trong chuyển gen vào tế bào người. Retrovirus cho phép cài DNA vào tế bào chủ, và biểu hiện DNA trong tế bào. Tuy nhiên, sử dụng retrovirus làm vectơ chuyển gen có nhiều hạn chế: retrovirus là nhóm virus gây ung thư; bộ gen retrovirus gắn vào bộ gen tế bào chủ một cách ngẫu nhiên không kiểm soát được, dễ gây các đột biến không không định hướng trên bộ gen của tế bào chủ, mặt khác retrovirus chỉ lây nhiễm nhanh ở những tế bào đang phân chia, nên sử dụng retrovirus làm vectơ chuyển gen không thể áp dụng để sửa chữa ở những tế bào đã được biệt hoá tận cùng.

Nhóm adenovirus là virus DNA, có khả năng xâm nhiễm nhiều loại tế bào (không cần ở giai đoạn tế bào phân chia), thích hợp cho việc chuyển gen vào tế bào biểu bì ở đường hô hấp.

Một số ý kiến cho rằng việc sử dụng liệu pháp gen ở người tác động trực tiếp vào vốn di truyền của nhân loại, do vậy cần phải bị kiểm soát chặt chẽ. Một số nước còn đề nghị nghiêm cấm sử dụng liệu pháp gen chữa bệnh ở người. Hiện nay,

liệu pháp gen là một phương pháp điều trị bệnh mới đầy hứa hẹn, ngày càng có nhiều người được chữa bệnh bằng liệu pháp gen.

1. Liệu pháp gen chữa các bệnh di truyền

Bệnh thiếu hụt miễn dịch gây ra bởi một khiếm khuyết trong gen mã hoá enzym adenosine deaminase (ADA) liên quan đến sự chuyển hoá purin. Người đồng hợp tử gen ADA bị hỏng có một hệ miễn dịch rất yếu, có nguy cơ tử vong do nhiễm một số bệnh, mà những người có gen ADA bình thường không bị. Trẻ em bị bệnh này phải nuôi cách li thường xuyên trong nhà kính, để tránh sự nhiễm các tác nhân gây bệnh. Năm 1990, French Anderson và cộng sự thành công sử dụng liệu pháp gen chữa bệnh thiếu hụt ADA cho một em gái 4 tuổi. Anderson và cộng sự đã lấy một số tế bào máu trắng khiếm khuyết, cấy vào tế bào một vectơ retrovirus chứa một gen ADA bình thường. Sau một đến hai tháng tế bào này được cấy lại vào người cháu bé, trong khi vẫn tiếp tục điều trị cho cháu bằng enzym ADA. Năm 1992, cháu bé đã phục hồi được chức năng của hệ thống miễn dịch và sinh hoạt như người bình thường.

Bệnh cầu hình liềm là bệnh thiếu máu di truyền, người bị bệnh hồng cầu hình liềm do gen β- globin bị đột biến. Liệu pháp gen có thể thay các tế bào tủy xương mang gen đột biến bằng các tế bào tuỷ xương mang gen bình thường.

Các bước cơ bản của liệu pháp gen:

- Tách một số tế bào tủy xương của người bệnh, sau đó chuyển gen β-globin bình thường đã được tách dòng vào các tế bào tủy xương này, chọn lọc các tế bào tuỷ xương tái tổ hợp mang gen β-globin bình thường.

- Nuôi tế bào các tế bào tuỷ xương tái tổ hợp mang gen β-globin bình thường trong điều kiện thích hợp để tạo sinh khối.

- Chiếu xạ tia X với một liều lượng cao cho bệnh nhân, để giết các tế bào tủy xương mang gen đột biến.

- Cấy các tế bào tuỷ xương tái tổ hợp mang gen β-globin bình thường vào cơ thể người bệnh, các tế bào này sẽ sinh trưởng và phục hồi dần số lượng tế bào tủy xương, bệnh thiếu máu dần dần được khắc phục.

Điều trị liệu pháp gen với các tế bào bệnh được xử lí ở bên ngoài cơ thể gọi là điều trị ex vivo.

2. Liệu pháp gen trong điều trị bệnh AIDS

Năm 1983 tại hai phòng thí nghiệm Viện nghiên cứu Pasteur (Pháp) và Viện nghiên cứu Ung thư Quốc gia (Mỹ) đồng thời phát hiện virus gây suy giảm khả năng miễn dịch của cơ thể người (HIV).

Năm 1996, Mery Kerington nữ bác học người Mỹ đã phát hiện hai gen là CD_4 và CCR_5 có khả năng giúp cho các tế bào kháng virus HIV. Người bị nhiễm virus HIV tiến triển thành bệnh nhân AIDS, do gen CCR_5 ở dạng bình thường không biến dị. Trong tế bào virus HIV tiếp cận gần tế bào miễn dịch, gen CCR_5 điều khiển tế bào tổng hợp protein CCR_5, protein này kết hợp với protein CD_4 (do gen CD_4 mã hoá) tạo thành điểm thụ cảm cho virus HIV tiếp xúc với tế bào miễn dịch. Bộ gen của virus HIV được gắn với bộ gen tế bào ở vị trí trong gen CCR_5, được tồn tại và nhân lên cùng với các tế bào trong quá trình phân chia, đây là giai đoạn ủ bệnh. Một số người có gen CCR_5 bị biến dị, không tạo các điểm thụ cảm trên bề mặt tế bào, virus HIV không thể tiếp cận được với tế bào miễn dịch, những người có gen CCR_5 biến dị dù tiếp xúc trực tiếp với virus HIV cũng không bị lây bệnh.

Phát hiện của Mery Kerington mở ra triển vọng mới chữa khỏi được bệnh AIDS theo hướng tạo một loại kháng nguyên có thể kết hợp với gen CCR_5, hoặc chuyển các gen CCR_5 biến dị vào cơ thể người để vô hiệu hoá virus HIV. Đây là biện pháp triển vọng nhất để chữa bệnh AIDS trong tương lai.

V. KỸ THUẬT GEN ỨNG DỤNG TRONG CHUẨN ĐOÁN CÁC BỆNH DI TRUYỀN

Kỹ thuật gen được tiến hành nghiên cứu và triển khai tại Việt Nam trong hàng loạt các ứng dụng: ứng dụng PCR phát hiện đoạn DNA đặc hiệu của vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* trong chuẩn đoán bệnh lao, ứng dụng RT- PCR phát hiện *Virus Dengue* (DHF) gây sốt xuất huyết tại các bệnh viện nhi, ứng dụng PCR

phát hiện đoạn DNA đặc hiệu của vi khuẩn *Helicobacter pylori* từ các mẫu sinh thiết để xác định các trường hợp viêm loét dạ dày, tá tràng do vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Ung thư gan là loại ung thư do virus viêm gan HBV, HCV gây nên. Có thể chuẩn đoán ung thư gan bằng xét nghiệm phản ứng huyết thanh tìm kháng nguyên HBsAg. Sử dụng kỹ thuật gen chẩn đoán ung thư gan, có thể chuẩn đoán chính xác loại ung thư gan nguyên phát do HBV hoặc định lượng RNA của virus HCV trong huyết thanh nhờ sử dụng phản ứng PCR đã được sử dụng ở một số bệnh viện nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Molecular Biology - Robert F. Weaver
   2002, International Edition
2. Genetics - Robert F. Weaver, Philip W. Hedrick
   1997, Wm. C. Brown Publishers, USA.
3. Advanced Molecular Biology - Richard M. Twyman
   1998, BIOS Scientific Publishers, Cambridge, UK
4. Molecular cloning - T. Maniatis, E.F. Fristch, J. Sambrook
   1989, 2000, Cold Spring Harbor
5. Molecular Biotechnology - Bernard R. Glick and Jack J. Pasternak
   1994, ASM Press D.C. Washington
6. Di truyền học - Phan Cự Nhân, Nguyễn Minh Công, Đặng Hữu Lanh
   1999, NXB Giáo dục
7. Cơ sở Công nghệ sinh học - N. P. Elinov
   1995, NXB Khoa học, (Bản tiếng Nga)
   (Osnovư Biotexnologiy- Nauka)
8. Di truyền học đại cương - N. P. Dubinin
   1981, NXB Thế giới, Matxcơva (Bản tiếng Nga)
   (Obsaia Genetika - Mir)
9. Di truyền học và cơ sở chọn giống- D. Ph. Petrov
   1984, NXB Mir, Matxcơva, (Bản dịch tiếng Việt)
10. Biologie moleculaire - G. Barroso
    1988, NXB KHKT, Hà Nội, (Bản dịch tiếng Việt)

CƠ SỞ DI TRUYỀN PHÂN TỬ
VÀ KỸ THUẬT GEN

Tác giả: KHUẤT HỮU THANH
Chịu trách nhiệm xuất bản: PGS. TS. TÔ ĐĂNG HẢI
Biên tập: ThS. NGUYỄN HUY TIẾN
Sửa bài: NGỌC LINH
Trình bày bìa: HƯƠNG LAN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 TRẦN HƯNG ĐẠO - HÀ NỘI

In 700 cuốn, khổ 16 x 24cm, tại Xưởng in NXB Văn hoá Dân tộc
Quyết định xuất bản số: 136-2006/CXB/140-06/KHKT ngày 7/9/2006
In xong và nộp lưu chiểu Quý III năm 2006.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

50 NĂM XÂY DỰNG VÀ PHÁT TRIỂN

1956 - 2006

Giá: 33.000đ